

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent



Institut des sciences

Département des sciences de la nature et de la vie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques

Option : Biochimie

Présenté par :

M^{elle} BELKADDAR Rania

M^{elle} BENHAMOU Asmaa

**Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits
bruts et de l'huile essentielle du *Citrus reticulata***

Soutenu le : 30 juin 2020

Devant le jury composé de :

President: Mr. BENYAMINA Sofiane

« MCB » C.U.B.B.A.T

Examinatrice: Mme ZERRIOUH Meriem

« MCB » C.U.B.B.A.T

Encadrant : Mme BRIXI-GORMAT-BENMANSOUR Nassima

« MCB » C.U.B.B.A.T

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

En tout premier lieu, nous tenons à remercier infiniment et profondément notre Dieu le tout puissant pour nous avoir donné le courage, la volonté, la santé et surtout la patience durant nos 5 ans d'études pour achever ce travail.

Nous voudrions tout d'abord remercier notre promotrice, Dr BRIXI GORMAT-BENMANSOUR Nassima, Maître de conférences classe B au centre universitaire d'Ain Témouchent, pour avoir accepté de nous encadrer et dirigé ce travail par excellence. Aussi bien pour ces conseils judicieux, sa disponibilité tout au long de ce travail.

Nos remerciements les plus sincères et les plus profonds sont adressés aux membres de jury :

Dr. BENYAMINA Sofiane, Maître de conférences classe B au centre universitaire d'Ain Témouchent qui nous a honorées en acceptant d'être président de jury.

Dr. ZERRIOUH Meriem, Maître de conférences classe B au centre universitaire d'Ain Témouchent de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Aussi, nous remercions Mlle ATTOU Amina, qui nous a aidées durant notre travail, pour ses conseils, ses qualités humaines et professionnelles.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre gratitude à tous nos enseignants qui nous ont transmis leur savoir, ce qui nous a permis d'acquérir les connaissances indispensables pour réaliser ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent aussi aux personnels du laboratoire de biochimie du centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain Temouchent en particulier Mr TIRES Nour Eddine, Mr MHAMEDI Walid, Mme AMRAOUI Bahria, Mme MEFTAHI Choukria, Mr RAHMANI Khaled, d'avoir mis à notre disposition le matériel et les moyennes nécessaires à la réalisation de ce travail.

À tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.

Nous témoignons enfin notre reconnaissance à tous ceux et celles ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire de fin de cycle.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

Aux être les plus chères au monde « mes parents »

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être. Vous m'avez inculquée le sens du devoir, de la responsabilité et de la dignité. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitte jamais assez. Puisse Dieu, le très haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie.

À mes très chers frères Housseem et Djawed, à ma très chère belle-sœur Asmaa,

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous, que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

À toute ma famille paternelle BELKADDAR, et maternelle KHERACHI.

A mon cher Encadrant Dr BRIXI GORMAT.N

À ma très chère copine, Hanane

En souvenir de notre sincère et profonde amitié.

À mon cher binôme Asmaa,

Avec qui j'ai passé des moments inoubliables.

À toute mes copines, Kamila, Sarra, Ferdaous, Ahlem ainsi que tous mes amis et ma promotion Biochimie « 2019/2020 ».



Rania

Dédicace

C'est avec un très grand honneur, sincérité et fierté que

Je dédie ce travail :

A mes parents qui se sont sacrifiés pour que je grandisse avec un savoir faire

Et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui,

Que dieux les protèges et leur accorde une longue vie pleine.

A ma sœur Sarra Ikram et mon frère Abderraouf, que j'adore et je leur souhaite

La réussite dans leur vie.

*A toute ma famille paternelle **BENHAMOU** et maternelle **CHACOR ROUBA**.*

A mon fidèle amie Hanane et mon binôme Rania,

*À mon cher encadreur Mme **BRIXI-GORMAT**.*

A l'ensemble des enseignants de la biochimie qui ont contribué à ma

Formation scientifique.

A mes amis chacun par son nom, pour leur aide et leur soutien moral.

À tous ceux qui sont proches de mon cœur.

Et dont je n'ai pas cité les noms. Je dédie ce modeste travail.

Asmaa

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction..... 01

Synthèse bibliographique

I. Les agrumes 03

I.1. Origine et production dans le monde et en Algérie 03

I.2. Classification botanique 06

II. L'espèce *Citrus reticulata* (Mandarine) 07

II.1. Description et identification botanique 07

II.2. Morphologie 08

II.3. Valeur nutritive 09

II.4. Utilisation et effet thérapeutique 09

III. Les huiles essentielles 10

III.1. Définition 10

III.2. Composition chimique 10

III.3. Méthodes d'extraction des huiles essentielles 11

III.4. Toxicité..... 13

IV. Activités biologiques 14

IV.1. Activité antioxydante 14

IV.1.2. Généralités 14

IV.1.3. Les antioxydants 14

IV.1.3.1. Les antioxydants endogènes 14

IV.1.3.2. Les antioxydants synthétiques 15

IV.1.3.3. Les antioxydants naturels 15

IV.1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant *in vitro*..... 16

IV.1.5. Activité antioxydante des Citrus 18

Partie II : Matériel et méthodes

I. Matériel végétal	19
I.1. L'échantillonnage	19
I.2. préparation de l'échantillon	19
II. Méthodes	20
II.1. Extraction des polyphénols totaux	20
II.1.1. Préparation des extraits bruts	20
II.1.1.2. Rendement d'extraction	20
II.2. Extraction de l'huile essentielle	21
II.2.1. Hydrodistillation	21
II.2.1.1. Taux d'extraction	22
II.2.2. Détermination des indices physiques	23
II.3. Etude phytochimique	25
II.3.1. Screening phytochimique	25
II.3.2. Dosage de polyphénols	26
II.3.3. Dosage des flavonoïdes	27
II.4. Evaluation de l'activité antioxydante par l'effet scavenger du radical DPPH ...	28

Partie III : Résultats et discussion

I. Rendement des extraits de <i>Citrus reticulata</i>	30
II. Caractéristiques de l'huile essentielle	33
II.1. L'indice de réfraction	33
II.2. La densité	34
III. Etude phytochimique	34
III.1. Screening phytochimique	34
III.2. Teneurs en polyphénols	36
III.3. Teneurs en flavonoïdes	40
IV. Evaluation de l'activité antioxydante par l'effet scavenger du radical DPPH	43

Conclusion et perspectives	50
Références bibliographiques	52
Glossaire et annexes	68

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques espèces de <i>Citrus</i> et leurs origines.....	03
Tableau 2 : Classification des principaux pays producteurs d'agrumes et leurs taux en % durant l'année 2016-2017.....	05
Tableau 3 : L'occupation des superficies et le taux de production d'agrumes en Algérie.....	06
Tableau 4 : Les caractéristiques du Mandarinier.....	08
Tableau 5 : Les composants antioxydants des agrumes, leurs structures et leurs activités antioxydant.....	15
Tableau 6 : Les caractères organoleptiques des extraits du <i>Citrus reticulata</i>	30
Tableau 7 : Rendement d'extraction de l'huile essentielle et les extraits bruts du <i>Citrus reticulata</i> exprimé en %.....	31
Tableau 8 : Valeur des Indices physiques de l'huile essentielle (<i>Citrus reticulata</i>).....	33
Tableau 9 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les différents extraits bruts du <i>Citrus reticulata</i>	35

Liste des figures

Figure 1 : Le taux de la production mondiale (%) des variétés d'agrumes.....	04
Figure 2 : Fruit du mandarinier ; l'arbre (A), fleurs et feuilles (B) et pépins (C).....	07
Figure 3 : Une coupe longitudinale (a) et transversale (b) de la mandarine.....	09
Figure 4 : Les composants chimiques de l'huile essentielle du <i>Citrus reticulata</i>	11
Figure 5 : Schéma du processus d'hydrodistillation.....	12
Figure 6 : Les écorces fraîches épluchées du <i>Citrus reticulata</i>	19
Figure 7 : Les échantillons écorces (A), feuilles (B) et pépins (C) du <i>Citrus reticulata</i> après le séchage	20
Figure 8 : Evaporateur rotatif sous vide.	21
Figure 9 : Le montage d'hydrodistillation.....	22
Figure 10 : Réfractomètre.....	24
Figure 11 : Forme libre et réduite de DPPH•.....	28
Figure 12 : Les extraits bruts des écorces (A), feuilles (B) et pépins (C) du <i>Citrus reticulata</i> respectivement.....	30
Figure 13 : La phase d'extraction de l'huile essentielle.....	34
Figure 14 : Teneur en polyphénols des écorces, feuilles et pépins du <i>Citrus reticulata</i>	37
Figure 15 : Teneur en flavonoïdes des écorces, feuilles et pépins du <i>Citrus reticulata</i> ...	41
Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.....	44
Figure 17 : Pourcentage d'inhibition des extraits bruts (écorces, feuilles, pépins) et de l'huile essentielle du <i>Citrus reticulata</i> et l'acide ascorbique.....	45
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des écorces et des pépins du <i>Citrus reticulata</i> et de l'acide ascorbique.....	46

Annexes

Annexe 1 : Dosage des polyphénols et des flavonoïdes des extraits bruts du <i>Citrus reticulata</i>	68
Annexe 2 : La gamme d'étalonnage d'acide gallique.....	68
Annexe 3 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	68
Annexe 4 : La gamme d'étalonnage du Catéchine.....	69
Annexe 5 : La courbe d'étalonnage du Catéchine.....	69
Annexe 6 : 50% d'inhibition du radical libre DPPH des extraits bruts des écorces, feuilles, pépins et l'huile essentielle du <i>Citrus reticulata</i> et de l'acide ascorbique.....	69
Annexe 7 : La gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique.....	70

Liste des abréviations

ABAP : 2,2'-Azo-bis (2-amidinopropane hydrochloride).

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzthiozoline-6) sulfonique.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ALCL₃ : Trichlorure d'aluminium.

Av. J.-C : Avant Jésus Christ.

DMPD : N, N-diméthyl-p-phénylènediamine.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

DPPHH : 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine.

EAG : Equivalant acide gallique.

ECAT : Equivalent catéchine.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

ERN : Espèces réactives de l'azote.

ÉUA : États-Unis d'Amérique.

FAO : Food and Agriculture Organisation.

FC: Folin-Ciocalteu.

Fe²⁺ : Oxyde ferreux.

Fe³⁺ : Oxydeferrique.

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power Assay.

Ha : Hectare.

HE : Huile essentielle.

HPLC: High-performance liquid chromatography.

IC₅₀ : Concentration correspondante à 50% d'inhibition.

ITAFV : Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne.

MS : Matière sèche.

NFT 75 : Indice de classement dans AFNOR.

ORAC : The Oxygen Radical Absorbance Capacity.

PS : Poids sèche.

Qx : Quintaux.

R² : Le carré du coefficient de corrélation linéaire.

USDA : Le département de l'Agriculture des États-Unis.

Introduction

Depuis l'antiquité, les plantes constituent la principale source de substances thérapeutiques, utilisées dans les pratiques médicales en tant que principal remède dans la médecine traditionnelle **(Bernstein et al., 2018)**.

A l'heure actuelle où l'humanité fait face à des maladies de toutes sortes, la prise en charge des questions sanitaires se révèle être un véritable problème de société surtout dans les pays en voie de développement. Selon l'organisation mondiale de la santé, plus de 80% des populations font recours à la médecine et la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de santé **(Mangambu et al., 2014)**.

Malgré les progrès de la biologie et de la médecine de l'heure, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire, à l'égard de leurs effets toxiques sur la santé, plusieurs personnes se sont orientées vers les plantes médicinales **(Mangambu et al., 2014)**. L'un des exemples actuels de ces plantes médicinales sont les citrus, l'une des cultures primordiales, étant cultivé du 21ème siècle av. J.-C **(Yaqoob et al., 2020)**.

Récemment, les fruits du genre citrus (*Citrus reticulata*), ont suscité un vif intérêt biomédical car leur utilisation à l'état brut est principalement associée à un faible risque de maladies gastriques, colorectales, œsophagiennes et cancéreuses grâce à leurs teneurs en métabolites secondaires notamment en composés phénoliques (vitamine C et flavonoïdes), auxquels ils sont impliqués dans le traitement de nombreuses maladies liées aux effets toxiques des oxydants **(Rauf et al., 2014 ; Bouterfas et al., 2016 ; Rafiq et al., 2016)**.

En effet, dans l'industrie agro-alimentaire, les agrumes sont consommés le plus souvent sous forme fraîche ou sous forme de jus en raison de leur valeur nutritive et la saveur particulière. **(Ghfar et al., 2010)**.

Récemment la valorisation des déchets a suscité un intérêt scientifique considérable pour les utiliser comme antioxydants naturels, principalement dans les aliments, afin de prévenir le rancissement et l'oxydation des lipides, et pour des raisons médicales et cosmétiques **(Khan et al., 2010 ; Justin et al., 2014 ; Khiya et al., 2018)**.

C'est dans cet axe de recherche globale sur les plantes douées de propriétés thérapeutiques, que s'insère l'objectif de notre thème, en proposant un moyen de valorisation des sous-produits de la mandarine (*Citrus reticulata*) ; écorces, feuilles , pépins et l'huile essentielle, en

déterminant la richesse de la mandarine en polyphénols ainsi que l'évaluation des pouvoirs antioxydants des différentes parties étudiés : écorces, feuilles, pépins et huile essentielle.

De ce fait, notre travail sera réparti en trois parties :

- L'extraction de l'huile essentielle et les composés phénoliques d'écorces, feuilles et pépins.
- Les tests phytochimiques des extraits bruts (écorces, feuilles et pépins).
- L'évaluation de l'apport en substance à activité antioxydante (composés phénoliques, flavonoïdes...).
- La détermination du potentiel antioxydant (activité antiradicalaire au DPPH).

Synthèse bibliographique

I. Les agrumes :

Le mot « agrume » provient du latin « acrumen », qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (**Ladaniya, 2008**), dites hespéridés regroupant les fruits des végétaux de la famille des Rutacées (**Jardin Musée Balaguier, 2015**). Le terme agrumes été utilisé dans les pays méditerranéens et le terme Citrus dans les pays anglo-saxons (**Barrère, 1954**).

I.1. Origine et production dans le monde et en Algérie :

- **Origine :**

Différentes hypothèses ont été élaborées sur l'origine géographique des agrumes (**Khan et Kender, 2007**). Selon **Loussert (1989)** les agrumes sont originaires des pays du Sud-Est asiatique mais leurs dispersion dans cette région restent flous, comme cela a été récemment montré (**Guohong et al., 2018**). Les agrumes ont été disséminés lentement au cours des siècles dans différentes régions du monde (**Aubert et Vullin, 1997 ; Loussert, 1989**) (tableau1).

Quant à leur origine génétique qui été décrite par **Stone (2017)**, presque tous les agrumes ont la rare combinaison génétique d'être sexuellement compatibles et très sujets aux mutations, de tels traits permettent à leurs gènes de se mélanger pendant des milliers d'années par eux-mêmes et éventuellement aux mains des humains.

Tableau 1 : Quelques espèces de *Citrus* et leurs origines
(**Fred et al., 2007 ; Gmitter et al., 2007**).

Nom d'espèce	Nom scientifique	Origine
Citron	<i>C.medica</i>	Inde et chine
Pamplemousse	<i>C.grandis</i>	Sud-est Asiatique
Mandarine	<i>C.reticulata</i>	Est d'Inde
Lime	<i>C.aurantifolia</i>	Chine
Bigarade (Pamplemousse× mandarine)	<i>C.aurantium</i>	Chine
Orange (Pamplemousse × mandarine)	<i>C.sinensis</i>	Malaisie et Onde
Limon (Citron × Lime).	<i>C.limon</i>	Iles Barbade
Pomelo (Pamplemousse × orange)	<i>C.pardisi</i>	Inconnu, possible origine de Chine
Clémentine	<i>Citrus Clémentina</i>	Algérie

- **Production dans le monde et en Algérie :**

Les agrumes sont l'un des fruits les plus populaires dans le monde, Ils ont été cultivés avec succès dans plus de 140 pays (Shan, 2016), leur production a connu une période de forte croissance depuis le milieu des années 80 et un développement notable de taux de production des oranges, de clémentine tangerines, de citrons et de pamplemousses (Spreen, 2001) dont chacune de ces dernières est réparties à part selon le taux de production mondiale comme suite dans la figure 1 :

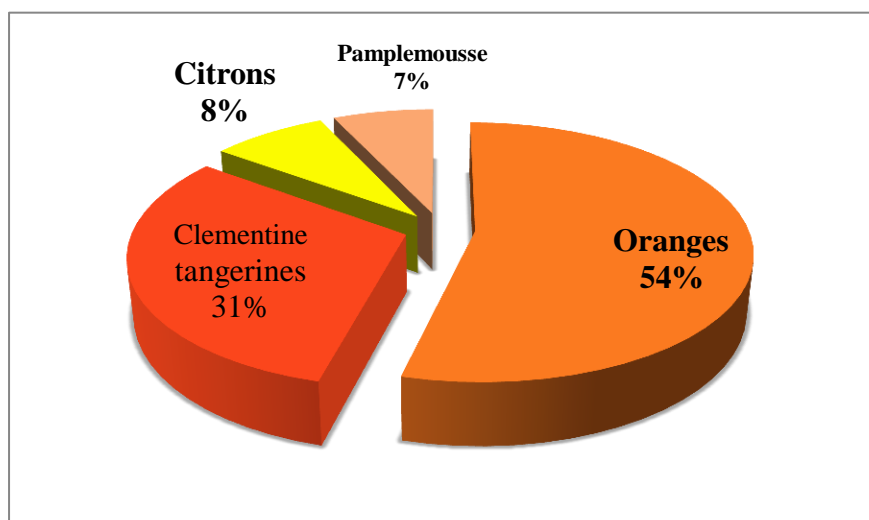


Figure 1 : Le taux de la production mondiale (%) des variétés d'agrumes (USDA, 2016).

Bien que l'aire moderne de culture des agrumes soit très vaste, la Chine occupe la première position de pays producteurs d'agrumes suivis du Brésil qui vient en 2ème lieu, puis l'UE en 3ème rang suivi à son tour par le Mexique, l'ÉUA et l'Égypte. Le Maroc occupe le 7ème rang, suivi par la Turquie (USDA, 2016) (tableau 2). Quant à l'Algérie, elle occupe la 18ème place dans le rang mondial, avec une production de 1,2 millions de tonnes par ans (FAO, 2013).

Récemment, une étude effectuée en 2019 par USDA a révélé que la production mondiale augmenterait de 4,2 millions de tonnes par rapport en 2018 pour atteindre 51,8 millions de tonnes en 2019 (USDA, 2019).

Tableau 2 : Classification des principaux pays producteurs d'agrumes et leurs taux en % durant l'année 2016-2017 (USDA, 2016).

Pays	Production en tonne	Taux en %
1-Chine	29500000	34%
2-Brésil	19217000	22%
3-Union Européen	10766101	13%
4-Mexique	6775000	7,9%
5-ÉUA	4601311	5,4%
6-Egypte	3000000	3,5%
7-Maroc	2315040	2,7%
8-Turquie	139900	1,6%

En Algérie, la culture des agrumes remonte à une époque lointaine. Son développement a pris de l'ampleur à partir du XIVème siècle avec l'arrivée des musulmans d'Andalousie (ITAFV, 2011). Elle reflète un revêtement d'une importance stratégique comme source d'approvisionnement en fruits et des débouchés sur le marché international des produits agrumicoles.

Selon leurs exigences pédoclimatiques, notamment les besoins en eau, les agrumes sont essentiellement localisés dans les zones irrigables, dans la partie nord du pays, où elle trouve la température clémente qui assure sa réussite (Karboa, 2001), dans la plaine de la Mitidja (Rebour, 1948), à périmètre de la Mina et Bas Chélif (Relizane), le périmètre de Habra (Mascara), périmètre de Bounamoussa (Annaba) et la plaine Saf-Saf (Skikda et Guelma) (ITAFV, 2017).

En effet, le verger agrumicole national, s'étend sur une superficie de 67,190 ha, dont 59,935 ha en rapport. La production totale des agrumes est de 13.417.540 qx avec un rendement moyen de 224 qx/ha (ITAFV, 2017). L'occupation des superficies est mentionnée dans le tableau 3 (ITAFV, 2017).

Tableau 3 : L'occupation des superficies et le taux de production d'agrumes en Algérie (ITAFV, 2017).

Agrumes	Superficie(Ha)	Taux de production en %
L'oranger (<i>Citrus sinensis</i>)	94,201	73,2
Le clémentinier (Clémentine)	11,082	16,5
Le mandarinier (Mandarine commune)	2,623	04
Le Citronnier (Eureka)	4,193	06,2
Pomélo	91	0,1

I.2. Classification botanique :

Selon l'étude de **Tanaka, 1961** et **Swingle et Reece, 1967**, les citrus sont composés de 156 ou de 16 espèces selon que les auteurs ont pris ou n'ont pas pris en considération les hybrides.

En 2002, une étude **Ortiz** a démontré que le genre *Citrus* est subdivisé en fonction de leur mode de consommation en 2 sous-genres : *Citrus Papeda* et *Eucitrus*. Le sous-genre *Papedare* regroupe des espèces au fruit non comestible très acide, parmi lesquelles : *C. celebica*, *C. combra*, *C. excelsa*, *C. hytrix*, *C. Kerri*, *C. macrophylla*, *C. macropetra* et *C. micrantha*. Alors que le sous genre *Eucitrus* regroupe des espèces comestibles, telles que : *C. aurantium*, *C. aurantiifolia*, *C. clémentina*, *C. grandis*, *C. limon*, *C. médeca*, *C. paradisi*, *C. reticulata Blanco* et *C. sinensis* (**Ortiz, 2002**).

D'après **Guignard (2001)**, la position systématique des agrumes est comme suite :

- **Règne** : Végétal.
- **Embranchement** : Spermaphyte.
- **Sous-embranchement** : Angiosperme.
- **Classe** : Eudicotylédon.
- **Ordre** : Rutele.
- **Sous-classe** : Rosidée.
- **Famille** : Rutaceae.
- **Sous famille** : *Aurantoideae*.
- **Tribu** : *Citreae*.
- **Sous-tribu** : *Citrinae*.
- **Genre** : *Poncirus*, *Fortunella*, et *Citrus*.

II. L'espèce *Citrus Reticulata* (Mandarine) :

II.1. Description et identification botanique :

L'oranger mandarinier est un petit arbuste au port arrondi d'un parfum exotique à cause de ses fleurs, il peut atteindre 3-5 m de hauteur et largeur avec de nombreux rameaux épineux (**Lime, 2012**), produisant le fruit mandarine qui peut se distinguer des autres agrumes par sa couleur rougeâtre attrayante et sa peau lisse facile à pelée (**Ladaniya, 2008**) (figure 2). Le tableau qui suit montre les caractéristiques du mandarinier (tableau 4).



Figure 2 : Fruit du mandarinier ; l'arbre (A), fleurs et feuilles (B) et pépins (C)

(**Lim, 2012 ; photo original, 2020**).

Tableau 4 : Les caractéristiques du Mandarinier (**Lime, 2012 ; Ladaniya, 2008**).

Fruit	Le fruit est sous-globuleux, oblat ou pyriforme légèrement aplatie, sa taille est estimée entre 5–9 cm de diamètre, croûte verte virant au jaune brillant au moment de la récolte et d'une couleur, orange rougeâtre pendant la maturation.
Feuilles	Les feuilles sont unifoliolées, de 6–8cm, ovales, elliptiques-lancéolées, marge crénelée, base largement cunéiforme, et pétiole à ailes étroites persistante, lisse d'une couleur verte foncé.
Fleurs	Les fleurs sont blanches parfumées, bisexuées, d'un calice irrégulier 3–5 lobes, pétales blancs, fleurit deux fois par an en hiver et au printemps.
Ecorce	L'écorce est mince ou épaisse, facilement séparable du sarcocarpe, d'une surface relativement lisse parfois caillouteuse qui enferme des glandes oléifères remplies d'huiles essentielles.
Pépins	La mandarine renferme une quantité assez importante de pépins, 3-7 pépins.

II.2. Morphologie :

Le fruit est composé de deux parties: la peau (écorce) également appelée péricarpe et la pulpe appelée endocarpe. Le péricarpe est composé d'un exocarpe qui correspond au flavédo et d'un mésocarpe qui correspond à l'albédo. L'endocarpe, quant à lui, est la partie inférieure où se trouve la columelle qui est l'axe centrale du fruit entouré par des vésicules à jus (sac à jus).

Le flavédo (épicarpe) représente la partie externe ayant l'épiderme couvert de cuticules et des cellules de parenchyme colorée (vert, jaune, orange...) contenant les glandes à huiles essentielles. L'albédo quant-à-lui représente la partie incolore interne, composée de tissus spongieux de couleur blanchâtre ou parfois teintée (comme dans le pamplemousse rouge ou les oranges sanguines) (figure 3) (**Ladaniya, 2008**).

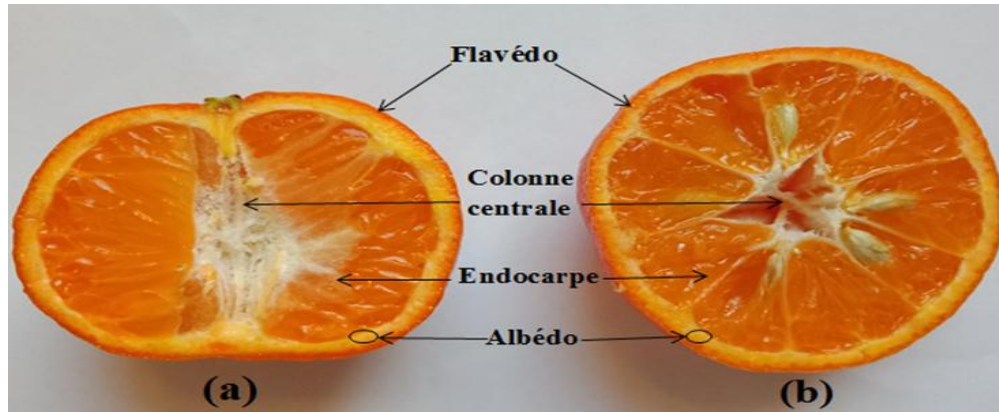


Figure 3 : Une coupe longitudinale (a) et transversale (b) de la mandarine
(Photo originale, 2020).

II.3. Valeur nutritive :

Citrus reticulata est considérée comme une source abondante de polysaccharides bioactifs qui contribuent à la santé (Yang *et al.*, 2018). En plus, elle est riche en protides, fibres, pectines, sels minéraux et en acides organiques tel que l'acide malique, tartrique et citrique, ainsi les vitamines les phénols, les flavonoïdes, contenue dans le jus (Gattuso *et al.*, 2007).

II.4. Utilisation et effet thérapeutique :

Depuis longtemps, le genre *Citrus reticulata* a été utilisé comme herbes médicinales traditionnelles pour soigner plusieurs maladies grâce à leurs teneurs en métabolites secondaires (Lv, 2015) tels que les flavonoïdes (les flavones et les flavonols) (Liu, *et al.*, 2013), de ce fait ils sont connus d'avoir des activités anti-inflammatoires et anti-tumorales, activité antimicrobienne et forte activité antioxydante (Aruoma, 2012) qui contribuent au traitement des voies respiratoires comme la toux et les mucosités (Xu *et al.*, 2014), ils facilitent la digestion (Zhu *et al.*, 2013) et inhibe la croissance des champignons (Wu *et al.*, 2014), Ils sont aussi impliqués dans la modulation de la densité osseuse chez les femmes et la régulation du taux sanguins des lipides (Adelina *et al.*, 2008).

De plus, la teneur des agrumes en vitamine B9 (acide folique) et en hespéridine permet de prévenir les maladies cardiovasculaires en réduisant le taux sanguin d'homocystéine ; qui est considéré comme facteur de risque de ces maladies (Turati *et al.*, 2015 ; Kurowska *et al.*, 2000). Il est d'ailleurs conseillé de consommer quotidiennement 750 ml de jus d'orange, afin d'augmenter le taux de cholestérol HDL chez les personnes souffrant d'hypercholestérolémie (Kurowska *et al.*, 2000 ; Cesar *et al.*, 2010).

III. Les huiles essentielles :

III.1. Définition :

Pour désigner le composé actif d'un remède naturel, le terme « huile essentielle » a été inventé au 16^{ème} siècle par le médecin Suisse Parascelsus Von Hohenheim (**Burt, 2004**). Selon **Durvelle (1930-1893)**, les huiles essentielles dites essences ; sont des produits odorants, généralement de composition complexe, obtenus à partir d'une matière première végétale définie botaniquement. Elles pourraient être biosynthétisés dans différents organes végétaux comme métabolites secondaires et extraites par différentes méthodes (**Svoboda et Greenaway, 2003**).

Les essences sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides souvent colorées, volatiles à température ordinaire, inflammable, de nature hydrophobe, plus légère que l'eau, d'une densité estimée entre 0,750 à 0,990 (**Fabrice, 2009 ; Nieves Criado et al., 2008**). Ils sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (**Svoboda et Greenaway, 2003**).

III.2. Composition chimique :

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables (**Couic-Marinier et Lobstein, 2013**), de ce fait les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 80 % de l'huile, tandis que d'autres composants sont présentés seulement comme trace (**Sharopov et al., 2015**). Les composés contenus dans une huile essentielle sont :

III.2.1. Les terpènes :

Ce sont les composants les plus répandues dans les huiles essentielles ; des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte, caractérisées par la présence d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone ($C_5 H_8$), (**Hernandez-Ochoa, 2005**). Les terpènes sont classés selon leurs fonctions en : alcools (géraniol, linalol), aldéhydes (citral, citronellal)... etc, et selon leur structure : linéaire (farnésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène) (**Couic-Marinier et Lobstein, 2013 ; Feitosa et al., 2017**) (figure 4).

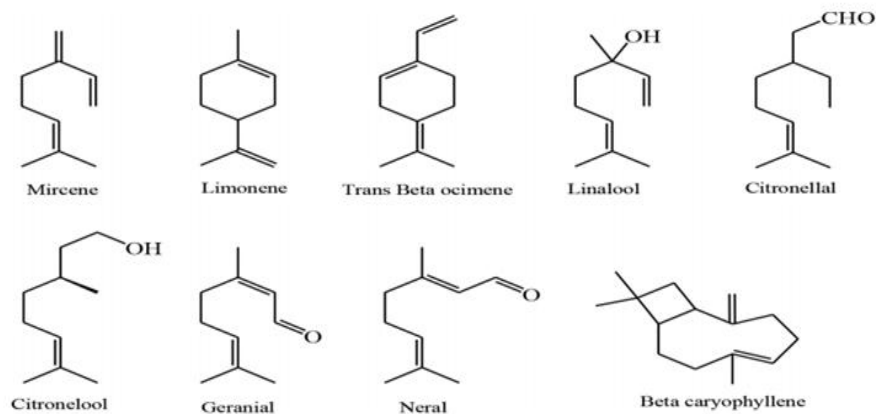


Figure 4 : Les composants chimiques de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* (Feitosa et al., 2017).

III.2.2. Les composés aromatiques :

C'est les dérivés du phénylpropane, Ils sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les terpénoïdes. Citons l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle)... Les lactones dérivées des acides cinnamiques, comme les coumarines, sont, pour la plupart, entraînaables par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans certaines huiles essentielles (HE de céleri) (Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

III.2.3. Autres composés :

Ils sont présents en faibles fréquences et en proportion similaire (Pibiri, 2005), on distingue les composés azotés (peu courants au sein des HE) et les composés soufrés (se rencontrent souvent à l'état de traces dans les HE) (Pibiri, 2005 ; Faucon, 2015).

III.3. Méthode d'extraction des huiles essentielles :

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour récupérer les huiles essentielles de la matrice végétale. Cependant, elles sont classées en deux catégories qui répondent aux besoins et selon le résultat souhaité (qualité, rendement...) (Asbahani et al., 2015).

➤ Méthodes conventionnelles :

- **L'enfleurage :** est menée d'un procédé basé sur l'adsorption en utilisant la graisse comme adsorbant, qui peut adsorber l'huile essentielle sans changer ses

caractéristiques, par accumulation à l'interface entre la phase où se trouvait l'huile essentielle et la phase séparée (Soe'eib et al., 2017).

- **Extraction par solvant** : méthode adaptée aux matériaux floraux fragiles à la chaleur, utilise différents solvants, notamment l'acétone, l'hexane, l'éther de pétrole, le méthanol ou l'éthanol (Koşar et al., 2005), dont le solvant est mélangé avec le matériel végétal, chauffé, filtré, puis le filtrat est mélangé avec de l'alcool pur et distillé par la suite à basse température, duquel l'alcool absorbe le parfum et lorsque l'alcool s'évapore, l'huile absolue aromatique est récupérée (Li et al., 2009).
- **Hydrodistillation** : Cette méthode consiste à l'immersion complète des matières végétales dans l'eau, portée à l'ébullition à un point inférieur, près de 100°C (Tongnuanchan et Benjakul, 2014), suivie d'une condensation de la vapeur et de l'huile essentielle formant deux phases hétérogènes, phase aqueuse et phase organique qui est l'huile essentielle (figure 5) (Asbahani et al, 2015).

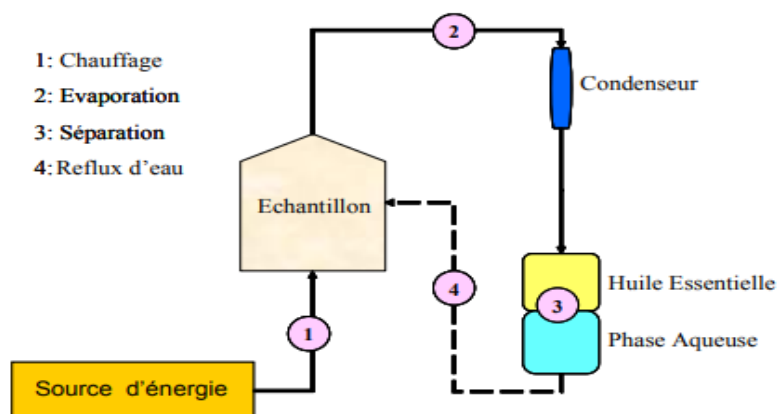


Figure 5 : Schéma du processus d'hydrodistillation (Bousbia, 2011).

- **Expression à froid** : une méthode, réservée uniquement pour extraire les huiles essentielles d'agrumes. Elle est basée sur la rupture des parois des sacs oléifères pour obtenir l'essence d'HE, cette dernière est entraînée par un courant d'eau froide formant une émulsion aqueuse, puis récupérée par décantation (Ferhat et al., 2007).

- **Distillation par entraînement à la vapeur** : basée sur le même principe que l'hydrodistillation sauf qu'il n'y a pas de contact direct entre la plante et l'eau dont la vapeur est introduite dans la partie inférieure de l'extracteur et passe donc à travers la charge de matière première. Cette technique évite certains artefacts par rapport à l'hydrodistillation (**Masango, 2005**).

➤ **Méthodes innovantes :**

- **Extraction au CO₂ supercritique** : une technique économiquement viable que la distillation à la vapeur (**Pereira et Meireles, 2007**), dont le CO₂ se transforme en liquide, pour être utilisé comme un milieu d'extraction des molécules aromatiques de la matière première. Aucun résidu de solvant ne reste dans le produit final, depuis là le CO₂ liquide redevient simplement un gaz et s'évapore dans des conditions normales (**Tongnuanchan et Benjakul, 2014**).

Le choix de la méthode se fait selon des critères influençant l'extraction tels que la volatilité; la solubilité; la taille et la forme des molécules constitutives et l'adsorption (**Bousbia, 2011**).

III.4. Toxicité :

Bien que les huiles essentielles sont naturelles et bénéfiques, elles pourraient entraîner des conséquences dévastatrices pour la santé des consommateurs (**Radulović et al., 2013**).

- Une ingestion accidentelle d'huile essentielle à une dose létale 50 (DL50) peut générer une toxicité élevée voire un coma puis la mort à cause de leurs constituants biochimiques tels que les phénols qui sont (dermatotoxiques- hépatotoxiques), cétones et lactones (neurotoxiques- épiléptisantes) (**Hilan et al., 2009**).
- L'HE d'agrumes (mandarine, orange douce, bergamote, pamplemousse et citron) riches en coumarines, sont sédatives et hypnotiques, très appréciées en diffusion et en olfaction et photosensibilisantes. Il faut éviter l'exposition au soleil dans les six heures qui suivent leur utilisation cutanée (**Solari, 2019**).

Cependant, en théorie, il n'est pas sûr de l'utiliser pendant la grossesse ou lactation, dans la population pédiatrique ou chez les patients souffrant de troubles thyroïdiens (**Ulbricht et al., 2005**). Il est donc important de connaître les composés les plus pertinents, mais aussi d'envisager les contre-indications et précautions d'emploi des HE. Cette connaissance permet

de choisir les voies d'utilisation et de poser les limites pour un usage sécuritaire (**Solari, 2019**).

IV. Activité Biologique :

IV.1. Activité antioxydante :

IV.1.2. Généralités :

Le concept selon lequel l'oxygène, molécule indispensable pour la vie, peut entraîner des dommages cellulaires importants, à cause du dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, (ischémie-re-perfusion, vieillissement), où l'oxygène n'est pas réduit en molécule d'eau, mais en espèces réactives de l'azote (ERN) ou en (ERO) espèce réactives de l'oxygène particulièrement réactionnelles (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'oxygène singulet O , le radical hydroxyle HO^\cdot , l'acide hypochloreux, des dérivés nitrés...), générant ainsi un stress oxydant, qui est un déséquilibre profond entre les antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers (**Pincemail et al., 2002**). Or, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant, à cet effet, il est conseillé de renforcer l'organisme en antioxydant provenant de source végétale pour s'échapper à ce dernier (**Lagha-Benamrouche et Madani, 2013**).

IV.1.3. Les antioxydants :

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

IV.1.3.1. les antioxydants endogènes :

Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes (la glutathion peroxydase), de protéines (la ferritine) et même d'un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases et ligases et de macroxyprotéinases ; qui empêche l'accumulation de lipides, d'ADN et de protéines oxydés dans la cellule et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques. En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ERO (**Pincemail et al., 2002**).

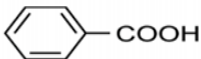
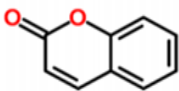
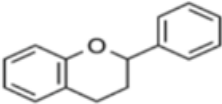
IV.1.3.2. Les antioxydants synthétiques :

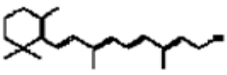
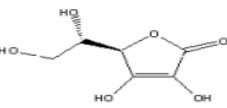
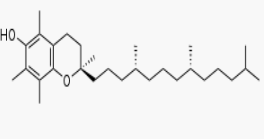
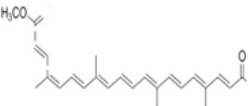
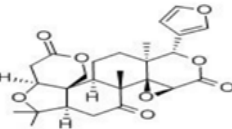
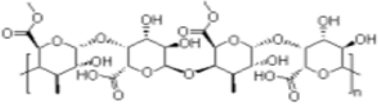
Les antioxydants synthétiques, tels que l'hydroxyanisolebutylé, l'hydroxytoluènebutylé et la butylhydroquinone tertiaire, ont été largement utilisés dans les aliments pour prévenir l'oxydation. Cependant, l'utilisation de ces antioxydants synthétiques dans les aliments est déconseillée en raison de leur toxicité et carcinogénicité (Sun et Fukuhara, 1997 ; Hiros et al., 1998).

IV.1.3.3. Les antioxydants naturels :

Ce sont des composés naturels que l'on trouve principalement dans les fruits, les légumes, les céréales et les boissons, (Alfano et al., 2018), tels que les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, les curcuminoïdes, les xanthons, les phénoliques et les terpénoïdes, ayant une forte activité antioxydante que celle des antioxydant synthétiques (Jeong et al., 2004) (tableau 5).

Tableau 5 : Les composants antioxydants des agrumes, leurs structures et leurs activité antioxydante (Zou et al., 2016).

Antioxydants naturels		Structure	Activité antioxydante
Composés Phénoliques	Acide Phénolique		<ul style="list-style-type: none"> • Ayant différents niveaux de piégeage des radicaux libres. • La capacité de déshydrogénation du groupement hydroxyle.
	Coumarine		<ul style="list-style-type: none"> • les coumarines possèdent une forte activité antioxydante en raison de leur groupement hydroxyle phénolique.
	Flavonoïde		<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe les enzymes oxydantes du corps. • Inhibition directe des ERO. • Oxydation anti-lipidique in vitro. • Améliore l'activité enzymatique antioxydante du corps.

Vitamines	Vitamine A		<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition des radicaux libres et les radicaux peroxylysés.
	Vitamine C		<ul style="list-style-type: none"> • Réduit les radicaux soufrés • Donneur d'acide semi-déhydroascorbique.
	Vitamine E		<ul style="list-style-type: none"> • Réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+}. • Empêche l'oxydation des caroténoïdes, en améliorant leur capacité antioxydante.
Térpénoïdes	Caroténoïdes		<ul style="list-style-type: none"> • Elimination des radicaux libres.
	Limonoïdes		<ul style="list-style-type: none"> • Piégeage des radicaux libres • L'élimination de 1O_2 (oxygène singulet).
Eléments Minérales	Sélénium	$Se \equiv Se$	<ul style="list-style-type: none"> • Favorisent l'action enzymatique du glutathion peroxydase. • effet synergique avec la vitamine E pour protéger les mitochondries contre les dommages des ERO par peroxydation.
	Zinc	Zn	
	Cuivre	Cu	
	Fer	Fe	
Pectine			<ul style="list-style-type: none"> • Renforce les enzymes antioxydants endogènes. • Inhibition des radicaux libres.

IV.1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* :

L'activité antioxydante ne doit pas être conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant, plusieurs méthodes ont été adaptées pour l'évaluation de la capacité antioxydante d'échantillons de plantes, dont chaque méthode est nommée d'après le nom de la substance utilisée comme source de radicaux libres (Zhang *et al.*, 2014).

- **Méthode des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) :**
Elle consiste à la réduction du radical DPPH• en DPPHH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazine) en présence des substances antioxydantes dans le milieu réactionnel qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm (Do *et al.*, 2014).
- **Méthode à l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzthiozoline-6) sulfonique (ABTS) :**
Basée sur la décoloration qui se produit lorsque le cation radicalaire ABTS^{•+} est réduit en ABTS en présence d'antioxydants. Cette dernière est mesurée par spectrophotométrie à 734 nm. Elle est standardisée par rapport au Trolox (Rivero-pérez, 2007).
- **Méthode ferrique réductrice / pouvoir antioxydant (FRAP) :**
Elle est basée sur la présence des réducteurs dans les extraits des plantes qui provoquent la réduction de Fe³⁺, complexe ferricyanure à la forme ferreux Fe²⁺, dont ce dernier peut être évalué en mesurant la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 595 nm (Conteras-Calderón *et al.*, 2011).
- **Méthode de la capacité d'absorption des radicaux d'oxygène (ORAC) :**
Méthode évaluée par la fluorescence d'un pigment extrait d'algues, basée sur l'action d'antioxydants qui inhibent les radicaux peroxy, en présence des ABAP responsables de la décomposition du pigment ce qui empêche la réduction de la fluorescence (Rivero-pérez, 2007).
- **N, N-diméthyl-p-phénylenediamine (DMPD) :**
Basée sur la décoloration produite, lorsque le radical DMPD^{•+} de couleur rose est réduit à la forme DMPD incolore, cette décoloration est mesurée par spectrofluorimètre en utilisant des longueurs d'onde d'émission et d'excitation de 584 et 544 nm respectivement (Rivero-pérez, 2007).

Les méthodes DPPH et ABTS sont pratiques et indépendants d'équipements coûteux, elles sont donc largement utilisées (Zhang *et al.*, 2018).

IV.1.5. Activité antioxydante des *Citrus* :

Une alimentation riche en fruits et légumes représente un des meilleurs moyens de protection des différentes maladies. En effet, l'intérêt principal des agrumes pour la santé réside dans leur richesse en substances bioactives (**Lagha-Benamrouche et Madani, 2013**). En outre, il a été démontré que l'activité antioxydante des Citrus réside dans leur teneur en polyphénols, en acide ascorbique y compris les pectines et surtout les flavonoïdes (hespéridine, narirutin, eriocitrin, naringin) ; les principaux composants phénoliques des Citrus surtout au niveau de leurs pelures et feuilles (**Zhang et al., 2014 ; Zhang et al., 2018**) grâce à leur structure en position hydroxyle étant donneur d'électron (**Siddhuraju et Becker, 2007**), leur confère un rôle primordiale dans la prévention de troubles cardiovasculaires, le diabète (**Graf et al., 2005**), en plus de leur propriété anticancéreuse et anti-inflammatoire (**Liu et al., 2013 ; Kim et al., 2004**).

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal :

I.1. L'échantillonnage :

La récolte de la mandarine (*Citrus reticulata*) s'est faite manuellement au hasard à partir d'une exploitation agrumicole privée située à Ain-kihal, wilaya d'Ain Temouchent durant le mois de Décembre 2019 ; tandis que les fruits mandarine destinés à l'extraction de l'huile essentielle ont été achetés d'un marché local à Ain Témouchent, du mois de Janvier au mois de Février 2020. Les fruits étaient bien murs et ne présentaient aucun signe de blessure ou d'infection.

L'identification des espèces végétales a été faite par Dr Amara M., maître de conférences classes A, à l'université Belhadj Bouchaib de Ain Témouchent.

I.2. Préparation de l'échantillon :

Toutes les mandarines ont subi un nettoyage et lavage à l'eau du robinet pour éliminer les traces de poussière puis sécher à l'air libre. Les mandarines destinées à l'extraction d'HE, ont été soigneusement épluchées à l'aide d'un couteau en évitant d'inclure l'albédo, la matière blanche (figure 6).



Figure 6 : Les écorces fraîches épluchées du *Citrus reticulata* (Photo originale, 2020).

Les écorces, les feuilles et les pépins ont été mis au séchage à l'air libre pendant une semaine puis dans l'étuve à 40°C pendant 2 jours (figure 7). Une fois séchés, ils ont été pulvérisés au broyeur électrique puis tamisés pour obtenir une poudre fine. Cette dernière a été ensuite conservée hermétiquement dans des récipients en verre et stockée à l'abri de la lumière pour les prochaines utilisations.



Figure 7 : Les échantillons écorces (A), feuilles (B) et pépins (C) du *Citrus reticulata* après le séchage (**Photo originale, 2020**).

II. Méthodes :

II.1. Extraction des polyphénols totaux :

II.1.1. Préparation des extraits bruts :

Les conditions de l'extraction conventionnelle par solvant (ECS) ont été choisies selon les données de la littérature (**Zia-ur-Rehman, 2006 ; Li et al., 2006 ; Sawalha et al., 2009 ; Tumbas et al., 2010 ; M'hiri et al., 2014**) avec quelques modifications. Pour chaque extrait, 10 g de matière sèche d'écorces, feuilles et pépins ont été macérés dans un volume de 100 ml de solvant (80% éthanol, 20% d'eau distillé) sous agitation douce pendant 1h à 30°C. L'opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant (ce procédé est nécessaire pour éviter la dégradation des composés phénoliques et obtenir plus de 95% de la teneur en composés phénoliques).

Les trois fractions sont réunies et filtrées sur papier filtre Wattman, l'éthanol est éliminé du filtrat par évaporation à 45-50°C en utilisant un évaporateur rotatif sous vide de type (Stuart) (figure 8), puis séché dans l'étuve à 40°C. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la matière initiale après pesée d'un ballon préalablement taré.

II.1.1.2. Rendement d'extraction :

Le rendement d'extraction est déterminé par le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu après l'évaporation du solvant et la masse de la poudre végétale utilisée. Selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = (m/m_0) \times 100$$

Rdt : Rendement (en %).

m : Quantité d'extrait obtenue après l'évaporation (g).

m₀ : Masse de la poudre végétale utilisée (g).

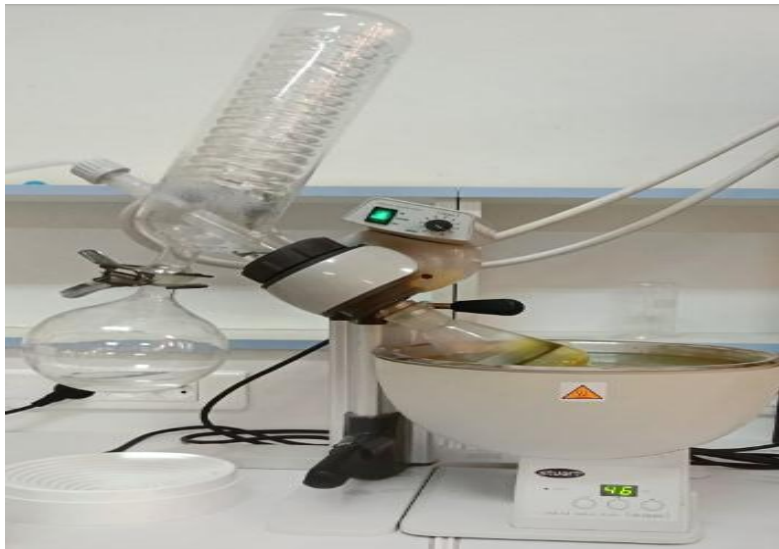


Figure 8 : Evaporateur rotatif sous vide (Photo originale, 2020).

II.2. Extraction de l'huile essentielle :

II.2.1. Hydrodistillation :

- **Principe :**

L'hydrodistillation est la méthode la plus simple et la plus utilisée pour la l'extraction des HEs. Elle consiste à l'immersion complète du matériel végétal dans l'eau porté à l'ébullition à pression atmosphérique. Sous l'action de la chaleur, les cellules contenant les essences s'éclatent et donc elles libèrent leurs molécules odorantes, ces dernières sont entraînées mécaniquement par la vapeur d'eau et condensées en traversant un système de refroidissement. Les gouttelettes d'eau-HE sont récupérées dans une ampoule à décanter. Deux phases non miscibles apparaissent : une phase huileuse surnageant et une phase aqueuse

(hydrolat), celles-ci sont séparées par leurs différences de densité (**Herzi, 2013 ; Tongnuanchan et Benjakul, 2014 ; Asbahani et al., 2015**).

- **Mode opératoire :**

L'huile essentielle de *Citrus reticulata* a été extraite à l'aide d'un hydrodistillateur où 100 g d'écorces fraîches (zests) sont introduites avec l'eau distillé dans un ballon de 500 ml. Après l'installation et la fermeture du montage (figure 9), la mise en marche du chauffe ballon est effectuée avec un réglage optimum du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constante et bien maîtrisée. Le mélange est porté à l'ébullition jusqu'à 3h après l'obtention de la première goutte d'huile essentielle. Une fois terminé, l'huile essentielle extraite est récupérée par décantation puis conservée dans des flacons fermés dans un endroit frais (4°C) à l'abri de la lumière pour une utilisation ultérieure (**Bousbia, 2011**).

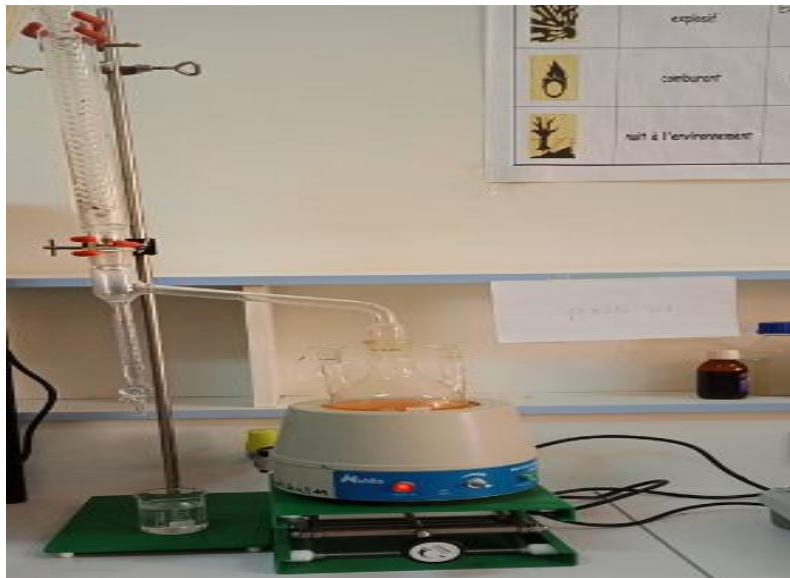


Figure 9 : Le montage d'hydrodistillation (**Photo originale, 2020**).

II.2.1.1. Taux d'extraction :

le rendement en huiles essentielles est définit comme étant le rapport entre le poids d'huile essentielle extraite et le poids de la biomasse végétale traité (**Ndoye Foe et al., 2016**). Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{R (\%) = (P_{HE} / P_{mv}) \times 100}$$

R (%): rendement en HE (%).

P_{HE} : poids de l'HE extraite (g).

P_{mv} : poids du matériel végétal traité (g).

II.2.2. Détermination des indices physiques :

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (**AFNOR**).

➤ Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112 :

Pendant la réfractométrie, l'indice de réfraction du matériel étudié est déterminé en mesurant l'indice de réfraction de la lentille de contact par rapport à l'indice de réfraction du prisme utilisé dans le réfractomètre. Cette méthode est basée sur la propriété que la réfraction d'une solution simple, est étroitement liée à sa concentration (**Gonzalez-Meijome et al., 2006**).

• Mode opératoire :

Le réfractomètre a été étalonné à l'aide d'une solution étalon d'eau distillé en mesurant l'indice de réfraction de ce dernier à 20°C, mettant en marche la lampe au sodium pour la lecture. Ce calibrage est important pour assurer le bon fonctionnement du réfractomètre.

Une fois la mesure effectuée, nous avons soulevé le prisme mobile et essuyer délicatement, les deux prismes avec du papier propre.

À l'aide d'une pipette pasteur, nous avons déposé quelques gouttes d'huile essentielle délicatement sur la face horizontale du prisme réfractométrique. Une fois ceci effectué, nous avons regardé dans l'oculaire et placer le cercle bicolore au centre du réticule puis effectuer la mesure en lisant la valeur de l'indice de réfraction sur l'échelle supérieure (figure 10).

- **Expression des résultats :**

L'indice de réfraction est donné par la loi suivante :

$$N_{d20} = n_{dt} + 0.00035 (t - 20)$$

N_{d20} : Indice de réfraction à la température 20°C.

n_{dt} : Indice à la température ambiante ou de mesure.

T : La température ambiante de lecture.



Figure 10 : Réfractomètre (photo originale, 2020).

➤ **Mesure de la densité selon la norme NFT 75 - 111:**

La densité relative de l'H.E est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile et la masse égale de volume d'eau distillée à 20°C. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est d_{20} . La densité est mesurée à l'aide d'un pycnomètre ou un densimètre, elle est donnée par la formule suivante :

$$D_{20} = m_H / V_H$$

D₂₀ : la densité d'huile essentielle à 20°C.

m_H : la masse volumique d'huile essentielle en (g).

V_H : le volume d'huile essentielle en (ml).

II.3. Etude phytochimique :

II.3.1. Screening phytochimique :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les extraits bruts des écorces, feuilles et pépins du *Citrus reticulata* selon les auteurs (Wagner, 1983 ; Karumi et al., 2004 ; Justin et al., 2014 ; Bentabet Lasgaa, 2015 ; El Haoud et al., 2018) avec quelques modifications.

- **Les flavonoïdes :**

2 ml de chaque extrait végétal sont traités avec quelques gouttes d'HCL (37%) avec 0,5 g de tournure de magnésium (Mg). La présence de flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange.

- **Les tanins :**

A 1 ml d'extrait, ajouter 2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ à 2%. Après deux minutes d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire ou verte et un précipité.

- **Les saponosides :**

Pour chaque 5 ml d'extraits on ajoute 10 ml d'eau distillée, la solution est agitée pendant deux minutes. La présence des saponosides est confirmée par l'apparition d'une mousse qui persiste en moins 15 minutes et le test est considéré comme positif si l'épaisseur de la mousse dépasse 1cm.

- **Les stéroïdes : réaction de Liebermann**

2 ml d'anhydride acétique ont été ajoutés aux résidus des extraits avec 2 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄). L'apparition de la couleur violet ou vert bleuté indique la présence de stéroïdes.

- **Les térpenoïdes : test de Salkowski**

5 ml de chaque extrait ont été mélangés à 2 ml de chloroforme suivi par l'addition de 3 ml de H₂SO₄ concentré. Une coloration brune rougeâtre du précipité à l'interface formé indique la présence de térpenoïdes.

- **Les alcaloïdes :**

Ils sont caractérisés à partir de réactif de Wagner. Une quantité des résidus de chaque extrait est solubilisée dans l'eau distillée. Quelques gouttes de réactif sont ajoutées aux

solutions des extraits. La formation d'un précipité rouge orangé à brun indique la présence des alcaloïdes.

▪ **Les composés réducteurs :**

Leur détection consiste à introduire 2 ml de l'extrait aqueux dans un tube à essai, puis 2 ml de la liqueur de Fehling (1 ml de la liqueur de Fehling A + 1 ml de la liqueur Fehling B) sont ajoutés. Ensuite, l'ensemble est porté au bain-marie bouillant à 40°C durant 8 min. L'obtention d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

▪ **Les mucilages :**

Pour chaque 1 ml d'extrait, une quantité de 5 ml d'alcool absolu a été ajouté. L'obtention d'un précipité floconneux d'une couleur bleue ou violet après agitation indique la présence de mucilages.

▪ **Les quinones :**

La présence de quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

II.3.2. Dosage de polyphénols :

Slinkard et Singleton, (1977) ont rapportés que la méthode Folin-Ciocalteu (FC) est la meilleure méthode d'estimation de la teneur totale en phénols, permettant de caractériser, tester rapidement et quantifier facilement un grand nombre de composés phénoliques contenus dans les extraits (**Chapuis-Lardy et al., 2002 ; Derkyi et al., 2011**).

• **Principe :**

La méthode FC dépend de l'oxydation sélective des substances similaires facilement oxydables et contribuent à la teneur total en phénol apparent (**Chen et al., 2015**). Elle est basée sur la réduction chimique du réactif (**Rover et Brown, 2013**).

Le Folin-Ciocalteu est un mélange de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il est réduit en présence des phénols totaux en un mélange d'oxydes bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleu produite est proportionnelle au taux des composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (**Singleton et al., 1999**).

- **Mode opératoire :**

Le dosage a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**), modifiée par **Wong et al., (2006)**.

Une quantité de 100 µl d'extrait est mélangée avec 2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) et laissée réagir pendant 5 min. 2,5 ml d'une solution saturée de Na₂CO₃ sont ensuite ajoutés, après une heure à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 725 nm.

- **Expression des résultats :**

La concentration des polyphénols totaux contenus dans les extraits bruts a été calculée à partir d'une équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage ($y = a x + b$) utilisant l'acide gallique comme référence à différentes concentration. La concentration des polyphénols est exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes de matière végétale sèche (mg EAG/g MS).

II.3.3. Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été effectué par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude selon la méthode décrite par **Kim et al., (2003)**.

Le principe, repose sur la capacité des flavonoïdes à former des complexes avec le trichlorure d'aluminium (AlCl₃), résultant de l'apparition d'une coloration jaunâtre ; tandis que les complexes flavonoïdes-Soude (NaNO₂) gardent la couleur rose ; Capables d'absorber dans le visible à 510 nm.

- **Mode opératoire :**

Une quantité de 100 µl de chaque extrait est mélangée avec 0,4ml d'eau distillée et 0,03 ml de solution de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5%. Après 5 minutes, une quantité de 0,02 ml de solution d'AlCl₃ à 10% est additionnée. Après 5 min, on ajoute au mélange 0,2 ml de solution de Na₂CO₃ (1M) et 0,25 ml d'eau distillée. L'ensemble est agité à l'aide d'un vortex, l'absorbance est mesurée à 510 nm.

- **Expression des résultats :**

Une courbe d'étalonnage établie par le standard (la catéchine) obtenue à différentes concentrations et dans les mêmes conditions opératoires, servira à la quantification des

flavonoïdes (annexe 5). Les résultats sont exprimés en milligramme-équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (mg ECAT/g MS).

II.4. Evaluation de l'activité antioxydante par l'effet scavenger du radical DPPH :

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH•. Les antioxydants réduisent le DPPH• (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) de la couleur violette en 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune en acceptant un atome d'hydrogène (**Brand-Williams et al., 1995**) (figure 11) selon la réaction suivante :

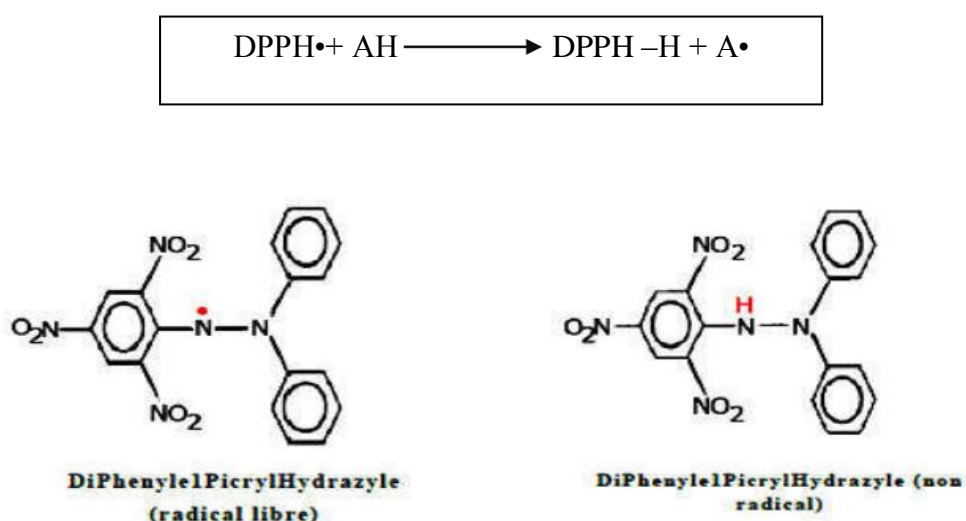


Figure 11 : Forme libre et réduite de DPPH• (**Molyneux, 2004**).

- **Mode opératoire :**

L'effet scavenger du DPPH de chaque extrait est mesuré par le procédé décrit par **Sanchez-Moreno et al., (1998)**.

Pour préparer la solution de DPPH, une quantité de 2,4 mg de DPPH en poudre est solubilisée dans 100 ml de méthanol. Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait et du standard acide ascorbique est ajouté à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH. Le contrôle négatif est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl de méthanol avec 1950 µl de solution méthanolique de DPPH. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

- **Expression des résultats :**

L'activité réductrice est définie par l'indice de réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage I% (d'inhibition) ou RSA% (Radical Scavenger Activity) (**Jing et al., 2011 ; Molyneux, 2004**). Elle est déterminée par la relation suivante :

$$I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / (Abs_0)] \times 100$$

(Abs₀) : l'absorbance du blanc (contrôle).

(Abs₁) : l'absorbance de l'échantillon testé à différentes concentrations.

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC50) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation des courbes tracées qui déterminent le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations. Elle a été exprimée en mg/ml et comparée avec celle de l'acide ascorbique (**Andzi Barhé et Feuya Tchouya, 2015**).

Résultats et discussion

I. Rendement des extraits de *Citrus reticulata* :

L'huile essentielle a été extraite des écorces fraîches de *Citrus reticulata*, par une hydrodistillation, alors que les extraits bruts, d'écorces, pépins et feuilles ont été extraits par une macération conventionnelle en utilisant un solvant d'éthanol à 80%.

L'examen organoleptique de l'huile essentielle et les extraits bruts des différentes parties de *Citrus reticulata*, a donné les résultats suivants, (tableau 6 et figure 12).

Tableau 6 : les caractères organoleptiques des extraits du *Citrus reticulata* :

Les caractères organoleptiques des extraits	Couleur	Aspect	Odeur
Huile essentielle	Transparente	Liquide	caractéristique, fraîche, persistante, aromatique.
Ecorces	Orange	Pâteux, caramélisé	Caractéristique, sucrée
Feuilles	Vert foncé	Pâteux.	Aucune
Pépins	Vert clair jaunâtre	Pâteux huileux	Aucune

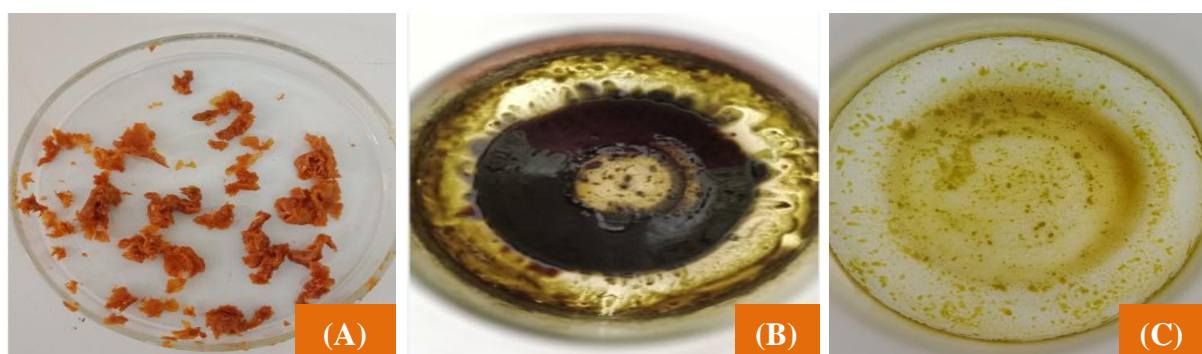


Figure 12 : Les extraits bruts des écorces (A), feuilles (B) et pépins (C) du *Citrus reticulata* respectivement (Photo originale, 2020).

Classiquement, les composés phénoliques sont extraits par macération avec un mélange hydro-alcoolique (Gourguillon et al., 2016), l'eau d'une polarité de (1,000) et l'éthanol de polarité (0,654) ; l'éthanol est le plus souvent utilisé, il représente l'avantage d'une très faible

toxicité par rapport aux autres alcools (**Anuchapreeda et al., 2020 ; Murga et al., 2000 ; Bartnick et al., 2006**).

Néanmoins, le développement des techniques plus respectueuses vis-à-vis de l'environnement devient un enjeu majeur. En effet, le recours à des méthodes plus efficaces en termes de rendement, de temps et de coût, mais aussi qui limitent la consommation de solvants sont plus envisageables (**Azmir et al., 2013**).

Le rendement de l'huile essentielle à partir de 100 g d'écorces fraîches et les rendements des extraits bruts à partir de 10 g de poudre du *Citrus reticulata*, exprimés en pourcentage sont représentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Rendement d'extraction de l'huile essentielle et les extraits bruts du *Citrus reticulata* (exprimé en %).

Les extraits	Rendement en %
Huile essentielle	1,20 ± 0,440
Ecorces	39,13 ± 2,695
Feuilles	14,70 ± 1,539
Pépins	13,65 ± 3,889

Les pourcentages enregistrés sont compris entre 1,20 et 39,13%. Le rendement de l'huile essentielle à partir de l'écorce du *Citrus reticulata* est estimé à 1,20 %. Tandis que pour les extraits bruts, le rendement le plus élevé a été enregistré dans l'extrait d'écorce (39,13%), suivi par les feuilles (14,70%) et les pépins (13,65%) respectivement.

Par comparaison aux autres études qui ont été faites sur les huiles essentielles extraites à partir de l'écorce du *Citrus reticulata*, le résultat obtenu est supérieur à ceux rapportés sur *Citrus reticulata* chinoise (0,689 ± 0,01%) obtenue par pressage mécanique (**Yi et al., 2018**) et sur la mandarine indienne (1,10%) (**Ajikumaran Nair et al., 2017**), mais reste inférieur aux résultats de la mandarine brésilienne et chinoise rapportés par **Fouad et Da Camara, (2017)** et **Guo et al., (2018)** qui sont de 2,04% et 1,34% respectivement.

Dans une étude connexe (**Bourgou et al., 2012**), le rendement des huiles essentielles obtenu par la technique d'hydrodistillation des écorces s'est avéré être le plus élevé pour la mandarine avec un pourcentage de 2,70% par rapport aux autres agrumes : le citron (1,30%), l'orange (0,74%) et l'orange amère blanche (0,46%). Ces auteurs ont exhibés que les rendements en huiles essentielles peuvent atteindre des valeurs maximales au stade intermédiaire de la maturité.

Plusieurs auteurs mentionnent que la variabilité du rendement en huiles essentielles est due à la localisation géographique, la saison, l'organe, et l'espèce (**Fadel, 1991 ; Lota et al., 2001**), d'autres études avaient montrés l'influence de la technique d'extraction et du cycle végétatif (**Gomes et al., 2004**).

Concernant le rendement d'extraction en extraits bruts, l'extrait d'écorce du *Citrus reticulata* estimé dans la présente étude (39,13%) est différent de celui rapporté par **Zia-ur-Rehman, (2006)**, qui ont testé l'effet de plusieurs solvants d'extraction sur l'écorce de la mandarine et ont montré que la quantité maximale d'extrait d'écorce estimée à 19,87 % a été repérée dans l'extrait méthanolique, 15% dans l'acétone et un taux de 11% dans l'éthanol, ce qui est largement inférieur par rapport à celui obtenu dans la présente étude.

Lors de l'examen du profil phénolique des feuilles de *Citrus reticulata* indonésienne, **Fadhilah et ses collaborateurs, (2019)** ont enregistré un taux modéré de composés phénolique dans l'extrait aqueux et l'extrait éthanolique à 96% soit en moyenne (6,30%, 5%) respectivement. Ces résultats sont largement inférieurs aux nôtres.

En général, le rendement d'extraction augmente avec l'augmentation de la teneur en eau dans le système éthanol, acétone et méthanol. Cela peut être dû à la combinaison du solvant organique avec l'eau qui facilite l'extraction de tous les composés qui étaient solubles à la fois dans l'eau et dans les solvants organiques (**Do et al., 2014**).

En fait, il y a un consensus sur le fait qu'il existe plusieurs paramètres influençant le rendement d'extraction, à savoir la méthode d'extraction choisie liée à l'appareillage utilisé (**Boulilla et al., 2015 ; Marzouki et al., 2009**), la plante étudiée ainsi que sa préparation (conservation, séchage et broyage) (**Da Silveira et al., 2014 ; Marzouki et al., 2009 ; Ouibrahim et al., 2013 ; Ebadi et al., 2015**), le solvant utilisé et sa concentration (**Singh et al., 2020**).

II. Caractéristiques de l'huile essentielle :

Auparavant, les caractéristiques organoleptiques (couleur, aspect, odeur) étaient les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces derniers ne donnent que des informations très limitées et incomplètes sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres moyens de vérification et de contrôle de qualité plus précises. Récemment, les moyens qui répondent à ce besoin sont constituées par des examens physico-chimiques tels que: l'indice de réfraction, la densité, l'indice d'ester..., définis par des normes admises par AFNOR (**Taleb-Toudert, 2015**).

Les résultats des indices physiques de notre essence sont consignés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Valeur des indices physiques de l'huile essentielle (*Citrus reticulata*).

Indices physico-chimiques	Valeur pratique	Normes AFNOR
Indice de réfraction	1,473±0,0014	/
La densité	0,7854 ± 0,060	< 0,876

II.1. Indice de réfraction :

Calculer à une température de 20°C à l'aide d'un réfractomètre, l'indice de réfraction de l'huile essentielle du *Citrus reticulata* déterminé dans notre analyse (1,472), est supérieure par rapport à l'indice de réfraction de l'eau à 20°C (1,333).

L'indice de réfraction est un paramètre d'identification qualitative qui renseigne sur le degré de pureté des huiles essentielles. Il varie selon la composition chimique : une forte teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés donnerait un indice élevé. Il augmente aussi avec l'instauration ou la présence de fonctions secondaires (**Hellal, 2011**).

Le faible indice de réfraction de l'HE dévoile leur faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques (**Koba et al., 2004 ; Boukhatem et al., 2010**). On ressort de ses résultats que notre huile essentielle est de bonne qualité.

II.2. La densité :

Elle renseigne sur la pureté de l'HE, c'est le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à la masse d'un volume égal d'eau dans la même température (20°C) (**Boukhatem et al., 2010**).

Notre résultat de l'ordre de 0,7854 est conforme aux normes internationales, selon l'Association Française de Normalisation des HEs (**AFNOR NF T. 75-202**), appartenant aux espèces *Citrus*, dont elle est inférieure à 1, ce qui rend l'essence flottante sur l'eau formant une couche non miscible (figure 13).

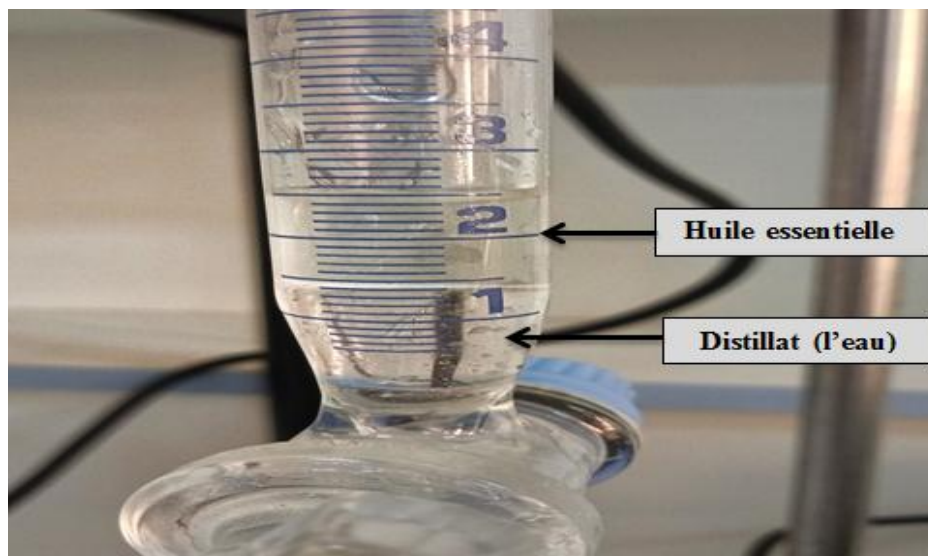


Figure 13 : La phase d'extraction de l'huile essentielle (**Photo originale, 2020**).

La densité peut être mesurée relativement à 20°C avec un pycnomètre appelé aussi densimètre. Ce paramètre est lié à la composition chimique de l'huile essentielle et influencé par d'autres paramètres tels que le phénotype, le moment de récolte, le type de terrain, la conservation, le processus d'extraction et ces conditions (**Tenscher et Lobstein, 2005**).

III. Etude phytochimique :

III.1. Screening phytochimique :

Le screening phytochimique est l'ensemble des méthodes et techniques de dépistage phytochimique des substances organiques naturelles, pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée (**El-Haoud et al., 2018**).

Les tests préliminaires du dépistage phytochimique sont utiles dans la détection des principes bioactifs qui peuvent conduire par la suite à la découverte ainsi au développement des médicaments. De plus, ces tests facilitent leur estimation quantitative et la séparation qualitative de composés chimiques pharmacologiquement actifs (**Bhandray et al., 2012**) soit par la formation d'un complexe insoluble en utilisant des réactions de précipitation, soit par la formation d'un complexe coloré par des réactions de coloration (**El-Haoud et al., 2018**).

La présente étude a été conçue pour étudier la présence de divers composés phytochimiques dans les trois différents extraits d'écorce, feuilles et pépins du *Citrus reticulata*, une plante qui évoque divers effets thérapeutiques.

De ce fait, un criblage phytochimique qualitatif par réactions a été élaboré pour l'ensemble des parties du fruit étudié, en vue d'une caractérisation des substances chimiques susceptibles d'être exploités à plusieurs échelles (pharmaceutique, alimentaire, cosmétique). Les résultats sont mentionnés dans le tableau ci-dessous (tableau 9).

Tableau 9 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les différents extraits bruts du *Citrus reticulata*.

Tests Extraits	Ecorces	Feuilles	Pépins
Flavonoïdes	+	+	+
Tanins	+	+	-
Saponosides	-	-	-
Stéroïdes	-	-	+++
Terpénoïdes	+	-	+++
Alcaloïdes	+	+	++
Mucilage	-	-	-
Quinone	+	-	+

+ : Présence en quantité faible.

- : Absence totale.

++ : Présence en quantité moyenne.

+++ : Présence en quantité abondante.

Nous remarquons que tous les extraits testés sont riches en alcaloïdes et démunis des saponosides et mucilage. Les flavonoïdes, les tanins et les terpénoïdes sont abondants dans les extraits écorce et feuilles sauf que ce dernier est dépourvue des terpénoïdes et quinones. Quant à l'extrait de pépins, il a enregistré la présence des terpénoïdes et quinones, par rapport l'écorce et une forte présence en stéroïdes et terpénoïdes par rapport aux autres extraits.

Le criblage phytochimique du *Citrus reticulata*, a montré des résultats qui sont confirmés avec d'autres (Justin et al., 2014 ; Rauf et al., 2014 ; Baba et al., 2016), à savoir la présence ou l'absence de certaines familles chimiques. Ceci peut être expliqué par une différence au niveau de plusieurs paramètres soit géographiques, physicochimiques ou biologiques tels que: la différence du site de récolte y compris l'environnement de la plante, la lumière, les précipitations, la topographie, la saison, type de sols, période de récolte, le patrimoine génétique, la procédure d'extraction utilisée, la partie de la plante étudiée ou leurs produits phytochimiques (El-Haoud et al., 2018).

III.2. Teneur en polyphénols :

Les polyphénols sont des antioxydants naturels dans les plantes, largement distribués dans les agrumes y compris notre espèce d'étude *Citrus reticulata*. Ils contribuent aux qualités nutritionnelles et sensorielles des fruits et légumes (couleur, flaveur et goût) (Safdar et al., 2018 ; Li et Sun, 2017).

L'analyse quantitative des polyphénols est déterminée par la méthode de FolinCiocalteu (Wong et al., 2006) à partir d'une équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage ($y = 2,249x - 0,000$) d'un R^2 de 0,964 (annexe 3), utilisant l'acide gallique comme référence à différentes concentration. La gamme d'étalonnage d'acide gallique est présentée dans (annexes 2). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (écorce, feuilles et pépins) (mg EAG/gMS).

Les taux relatifs des polyphénols contenus dans les différents extraits du *Citrus reticulata* sont représentés dans la figure ci-dessous (figure 14).

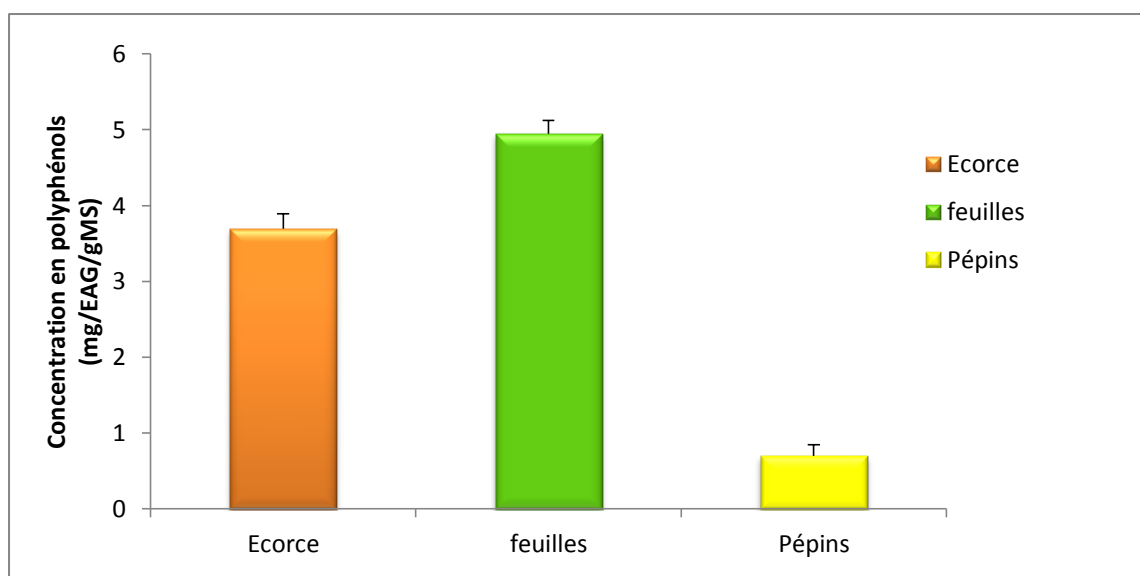


Figure 14 : Teneur en polyphénols des écorces, feuilles et pépins du *Citrus reticulata*.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne des deux essais (n=2). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES, EAG : équivalent d'acide gallique.

A l'issue des dosages effectués, il s'est avéré que les trois extraits étudiés renferment des teneurs en composés phénoliques (figure 14). Cependant, l'extrait brut des feuilles (EBF) représente la teneur la plus élevée en polyphénols estimée à $4,95 \pm 0,169$ mg EAG/gMS, suivi par l'écorce et les pépins avec des teneurs de $3,697 \pm 0,193$ et $0,695 \pm 0,154$ mg EAG/gMS respectivement.

En fait, peu de travaux concernant les teneurs en composés phénoliques des feuilles du *Citrus reticulata* ont été réalisés. Cependant d'autres études (**Lagha-Benamrouche et Madani, 2013**) portées sur les feuilles de 7 variétés d'oranges algériennes à savoir la bigarade, l'orange portugaise, les oranges douces (Thomson et Washington) ont enregistré des valeurs largement supérieures en polyphénols par rapport nos résultats estimées à $44,41 \pm 0,49$; $20,42 \pm 0,90$, $19,59 \pm 0,59$; $19,54 \pm 0,39$ mg EAG/gMS respectivement.

Au regard des résultats obtenus, la teneur en polyphénols totaux des écorces extraites du *Citrus reticulata* de notre région (Ain-Temouchent) estimée à $3,697 \pm 0,193$ mg EAG/gMS est supérieure à celle déclarée par l'écorce du *C. reticulata* Saoudienne ($1,695$ mg EAG/gMS) (**Al-Juhaimi, 2014**), mais reste largement inférieure à celle des extraits d'écorces du *C.*

reticulata Pakistanaise (24,80 mg d'EAG/gMS) (**Safdar et al., 2017**) et indienne (107,30 mg EAG/gMS) (**Justin et al., 2014**).

En outre, une étude récente réalisée par **ŞekerKaratoprak et ses collaborateurs. (2020)** sur l'écorce de la lime turque (*Citrus aurantifolia*) à partir des solvants d'extractions (éthanol, méthanol et eau), révèle des teneurs en polyphénols de $25,91 \pm 6,86$; $24,41 \pm 0,90$ et $21,59 \pm 0,37$ mg EAG/g MS respectivement. Ces valeurs sont supérieures à nos résultats.

L'extrait des pépins du *C. reticulata* de notre région a révélé la teneur la plus basse par rapport aux autres extraits, avec une teneur modique de $0,695 \pm 0,154$ mg EAG/gMS, beaucoup moins importante que celle obtenue par les travaux de **Inan et al., (2017)** avec une valeur de $248,646 \pm 11,53$ mg EAG/gMS.

En comparant nos résultats à ceux obtenus pour les autres espèces d'agrumes. **Inan et al., (2017)** ont trouvé des teneurs en composés phénoliques des extraits de pépins de 0,198 mg EAG/g MS pour l'orange et de 0,194 mg EAG/gMS pour le citron turque. Aussi une autre étude réalisée par **Brixi Gormat et al., (2015)** sur la bigarade de la région de Tlemcen a révélé des teneurs de $2,126 \pm 0,0018$ mg EAG/g MS.

L'extraction de principes actifs à partir de la matière végétale, comme les polyphénols, qui suscitent actuellement beaucoup d'intérêt grâce à leur pouvoir antioxydant, est une étape très importante dans l'isolement aussi bien que dans l'identification des composés phénoliques. En conséquence, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence de différentes conditions d'extraction sur les rendements d'extraction des composés phénoliques de source végétale (**Mahmoudi et al., 2013**).

La différence observée entre les résultats des différents travaux et ceux obtenus dans la présente étude peuvent être liées selon **Inan et al., (2017)** aux conditions de culture, au moment de la récolte, le type de fruit, sa composition, la saison, la méthode d'extraction, le degré de maturation ainsi qu'aux facteurs de croissance et aux conditions climatiques.

De même, la variabilité de la teneur en polyphénols est largement dépendante aussi de plusieurs autres facteurs tels que la partie de la plante étudiée, le rapport soluté/solvant et la température. Le temps et les cycles d'extraction sont des paramètres importants qui déterminent le rendement élevé des composés phytochimique; permettant ainsi un processus assez laborieux pour comprendre le meilleur solvant et le plus efficace pour l'extraction (**Yaqoob et al., 2020**).

En effet, la variation des teneurs en polyphénols dépendent des polarités des solvants utilisés ainsi que de leur niveau de concentration, aqueux ou absolu. Entre autre, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (**Mahmoudi et al., 2013**). Ces résultats rejoignent ceux trouvés par **Safdar et al., (2017)** qui constatent que la faible solubilité des composés phénoliques dans les solvants absolus, est probablement dû à la forte liaison d'hydrogène entre les protéines et les polyphénols, et que la solubilité augmente lors de l'ajout d'eau à des solvants organiques (**Safdar et al., (2017)**).

Eventuellement, la discordance des teneur en polyphénols, peut être liée aux différentes méthodes d'extraction adaptées, (**Ghafar et al., 2010**). L'extraction des polyphénols par macération, bien que généralement longue et exige des solvants organiques qui sont chers et dangereux pour la santé, est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles (**Mahmoudi et al., 2013**).

Cependant, **Safdar et ses collaborateurs. (2017)** ont étudié l'effet de deux méthodes d'extraction ; la méthode assistée par ultrason et l'extraction conventionnelle par solvant pour l'extraction des composés phénoliques à partir 5g de poudre d'écorce du *Citrus reticulata* pakistanaise dans 80% de méthanol , ils ont démontré que la méthode d'extraction par ultrason permettait une extraction en quelques minutes avec une reproductibilité élevée en polyphénols ($32,48 \pm 0,36$ mg EAG/gMS) par rapport à l'extraction classique ($24,80 \pm 0,28$ mg EAG/gMS) dans les même conditions, ce qui justifie que l'estimation des polyphénols dépend la méthode d'extraction adaptée.

La méthode d'évaluation du contenu en composés phénoliques utilisant le réactif de FolinCiocalteu n'est pas spécifique pour estimer la teneur en polyphénols, étant donné que le réactif Folin-Ciocalteu peut être réduit par de nombreux composés non phénoliques tels que la vitamine C, les sucres et les acides organiques, vu qu'il mesure la capacité de réduction de l'échantillon grâce à la capacité antioxydante à base de transfert électronique (**Li et al., 2006 ; Huang et al., 2005**). Il est à noter également que ces mêmes composés chimiques en réagissant avec le réactif FolinCiocalteu induisent à une surestimation des polyphénols (**Ghafar et al., 2010**). Afin d'éviter toute interférence des composés phénoliques avec d'autres substances (cires, chlorophylles, terpènes et composés non phénoliques) il est

préférable de procéder à un traitement préalable des échantillons avec un solvant non polaire (hexane, benzène, chloroforme ou éther) puis extraire les composés phénoliques avec un solvant polaire (acétone, méthanol, éthanol, eau,....ou un mélange de ces solvants) (**Ribereau Gayon, 1968 ; Boizot et Charpentier, 2006**).

III.3. Teneur en flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent la grande classe des composants poly-phénoliques présents chez les végétaux ayant des effets bénéfiques sur la santé. Et comme la majorité des effets pharmacologiques des plantes est due à ces substances, un dosage des flavonoïdes des extraits a été effectué pour estimer leurs teneurs.

L'étude quantitative des extraits brutes (écorces, feuilles, pépins) du *Citrus reticulata* au moyen des dosages spectrophotométriques, selon la méthode de trichlorure d'aluminium avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des flavonoïdes.

Une courbe d'étalonnage a été tracée pour cet objectif, établie avec la catéchine à différentes concentration. Des mesures de densité pour chaque fraction réalisées à 510 nm. La gamme d'étalonnage de catéchine et présentée dans l'annexe 4.

Les quantités des flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent milligramme de catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg ECAT/gMS) et déterminés par l'équation de type: $y = a x + b$ ($y = 0,5789x + 0,0055$) avec R^2 de 0,9972 (annexe 5).

Les taux relatifs de flavonoïdes contenus dans les extraits sec du *Citrus reticulata* sont représentés dans la figure ci-dessous (figure 15).

Nos résultats ont montré que les teneurs en flavonoïdes des différentes parties du *C. reticulata* (écorces, feuilles et pépins) sont estimées à $5,77 \pm 0,491$ mg ECAT/gMS ; $5,082 \pm 1,464$ mg ECAT/gMS et $4,631 \pm 0,436$ mg ECAT/gMS respectivement. Nous remarquons que la teneur la plus élevée a été observée dans le cas des feuilles par rapport aux autres parties de l'orange.

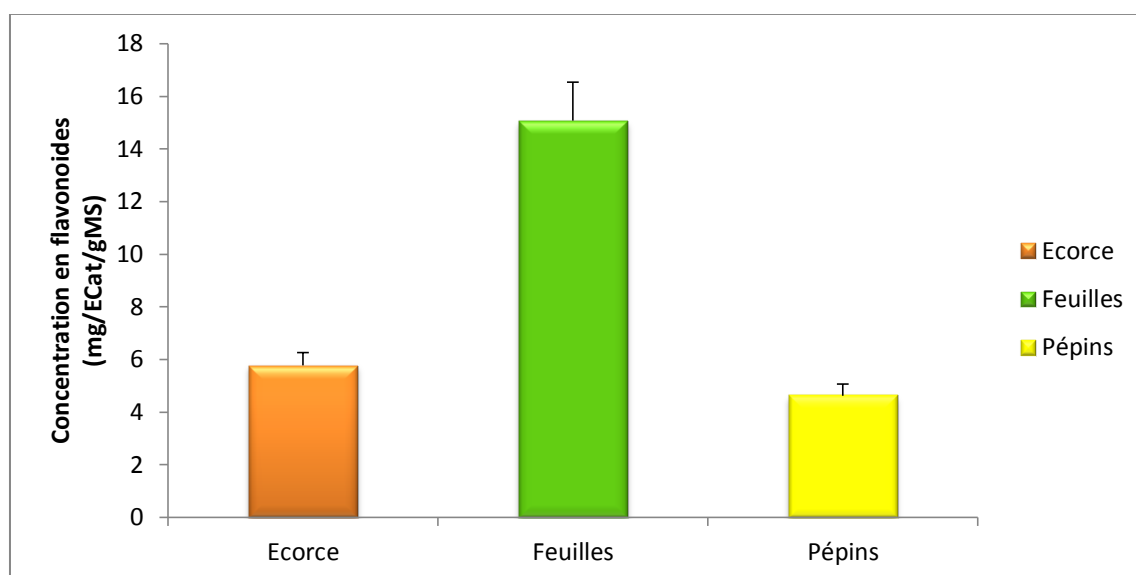


Figure 15 : Teneur en flavonoïdes des écorces, feuilles et pépins du *Citrus reticulata*.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne des deux essais (n=2). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES, ECAT : équivalent de catéchine.

Peu d'études ont été réalisées pour l'évaluation des teneurs en flavonoïdes des feuilles de la mandarine. Cependant, en comparant nos résultats à d'autres agrumes, comme la bigarade, Thomson navel, Washington navel et l'orange portugaise qui ont enregistré des taux de l'ordre de (3,25 \pm 0,07 ; 2,67 \pm 0,05 ; 2,27 \pm 0,03 ; 1,35 \pm 0,02) mg ECAT/gMS respectivement **Lagha-Benamrouche et Madani, (2013)**, nous remarquons qu'ils sont largement supérieures.

La teneur en flavonoïdes des écorces extraites de la mandarine de notre région est estimée à 5,77 \pm 0,491 mg ECAT/gMS, inférieure à celles rapportés par **Justin et al., (2014)** sur la mandarine indienne (99 mg ECAT/gMS, 92,4 mg ECAT/gMS, 16,5 mg ECAT/gMS respectivement), selon les variétés des solvants ; méthanol, éthanol et acétone.

Comparées à d'autres genre de *Citrus*, les teneurs en flavonoïdes renfermés dans l'écorce du fruit étudié, sont légèrement inférieures à celle rapportées pour le citron vert (*Citrus aurantiofaulia*) (7,83 \pm 2,66 mg ECAT/gMS) **ŞekerKaratoprak et ses collaborateurs. (2020)**.

La teneur la plus faible a été enregistrée par les pépins avec une valeur de $4,631 \pm 0,436$ mg ECAT/g MS. Cependant, notre résultat reste supérieur par rapport à l'étude d'autres agrumes comme la bigarade. En effet, D'après l'étude de **Brixi Gormat et al., (2015)**, la concentration des pépins de la bigarade algérienne (région de Tlemcen) en flavonoïdes des deux fractions acétate d'éthyle et n-butanol est de $0,033 \pm 0,004$ mg ECAT/gMS et $0,043 \pm 0,005$ mg ECAT/gMS respectivement, et celle de **Moulehi et al., (2012)** $1,31-1,50$ mg ECAT/gMS pour les pépins de la même espèce.

Le taux d'extraction des métabolites secondaires est influencé par plusieurs paramètres, à savoir la partie de la plante utilisée, le solvant d'extraction tenant compte de la polarité, la méthode et le temps d'extraction. La diversité des teneurs en flavonoïdes peut être due aux conditions environnementales (la lumière, le climat, la saison, le soleil, la température), du rapport échantillon/solvant ainsi que de la composition chimique et les caractéristiques physiques des extraits. C'est ce qui a été démontré dans les études de **(Xu et al., (2008) ; El-Haoud et al., (2018) et Yaqoob et al., (2020)**.

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques. Ceci est logique étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols.

Beaucoup d'auteurs ont étudiés l'influence de différentes conditions d'extraction sur le profil phénolique, ainsi que la composition chimique qui varie d'une espèce à l'autre (**Andzi Barhé et Feuya Tchouya, 2015**).

En effet, lors d'une étude sur l'écorce de mandarine, **Safdar et al., (2017)** ont quantifié les composés phénoliques totale par HPLC qui étaient estimés à $371,16 \pm 6,79$ $\mu\text{g/g}$ de poids sec, parmi lesquelles l'acide férulique et l'hespéridine étaient les plus abondants ($65,21 \pm 1,16$, $92,94 \pm 1,23$ $\mu\text{g/g}$ PS respectivement). Comparant ces résultats avec ceux de **Khan et al., (2010)** qui ont enregistré un taux de $205,20$ mg/100g et $70,30$ mg/100g de poids frais, respectivement en hespéridine et naringine dans les extraits de peau d'orange. Ces auteurs ont déduit que la variance de ces composants bioactives influence l'activité antioxydante qui varie d'une espèce à une autre.

Cependant, la méthode spectrométrique du dosage des flavonoïdes totaux sous-estime la teneur réelle des flavonoïdes et cela peut être expliqué par le fait que certains composés

phénoliques peuvent ne pas réagir avec le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) comme l'hespéridine qui est présente en grande quantité dans les écorces de l'orange (124,489 mg/100g) de poids frais (**Khan et al., 2010**).

L'extraction des flavonoïdes au moyen des solvants consomme beaucoup de temps, ce qui peut entraîner la dégradation de composés thermosensibles de même qu'elle nécessite de grandes quantités de solvant. En outre, dans les applications industrielles, l'éthanol est moins dangereux vis-à-vis à l'environnement, par rapport à d'autres solvants et le mieux adapté dans le processus d'extraction des composés phénoliques y compris les flavonoïdes (**Yaqoob et al., 2020**). En effet, dans une étude connexe, **SekerKaratoprak et al., (2020)** ont étudié la teneur en métabolites secondaires du citron vert (*Citrus aurantifolia lime*), en utilisant différents solvants d'extraction ; l'eau, méthanol et l'éthanol à 70% dans les mêmes conditions (24h-37°C). Différentes teneurs en flavonoïdes ont été récupérées, la teneur la plus importante a été récupérée dans l'éthanol soit une moyenne de $7,83 \pm 2,66$ mg ECAT/g d'extrait, alors que celle traitée par l'eau et le méthanol est estimée à $6,52 \pm 0,77$; $6,27 \pm 0,39$ mg ECAT/g d'extrait respectivement.

Ces résultats s'accordent avec ceux rapportés par **Mahmoudi et al., (2013)** sur la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus.L*), qui ont exhibés que l'éthanol est le meilleur extracteur des flavonoïdes par rapport à l'acétone, méthanol et l'eau soit d'un ordre de $(25,75 \pm 0,32$; $24,60 \pm 0,14$; $21,08 \pm 1,20$; $12,40 \pm 0,47)$ mg ECAT/g PS respectivement.

En fait, des études antérieures ont montré que l'utilisation du méthanol produisait un rendement élevé en phytochimie d'agrumes, par contre la nature toxique de ce solvant pour notre environnement ne soutient pas son utilisation dans les applications alimentaires (**Yaqoob et al., 2020**).

De ce fait, l'éthanol et l'eau sont les plus privilégiés dans l'extraction car ils ont l'avantage d'être moins chères, non polluants, et non toxiques pour la santé (**Mahmoudi et al., 2013**), ce qui a justifié notre choix d'utiliser l'éthanol comme solvant d'extraction dans la présente étude.

IV. Evaluation de l'activité antioxydante par l'effet scavenger du radical DPPH :

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picarylhydrazyl) est l'une des méthodes qui relient la quantité des radicaux piégés à celles d'antioxydant. Le DPPH• est largement utilisé dans l'analyse de l'activité antioxydante vu qu'il est caractérisé par sa capacité à produire des radicaux libres

stables due à la délocalisation des électrons libres au sein de la molécule. (Hartman et al., 2007 ; Epifano et al., 2007).

Afin de justifier l'utilisation des sous-produits de la mandarine dans la pharmacopée pour le traitement des maladies liées à l'oxydation, un test de DPPH a été élaboré pour l'ensemble des extraits, pour évaluer l'activité antioxydante.

L'activité antiradicalaire des extraits de *Citrus reticulata* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement, en suivant la réduction de ce radical qui est menée d'un virage de couleur, de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515nm (annexe 7). La cinétique de décoloration de ce radical a été suivie après l'addition de 50µl de chacune des concentrations d'extrait ; écorce, feuilles, pépins et huile (Sanchez-Moreno et al., 1998).

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes (figure 16) et (figure 17) du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations qui montrent que l'activité antiradicalaire est proportionnelle aux concentrations des extraits dans le milieu réactionnel.

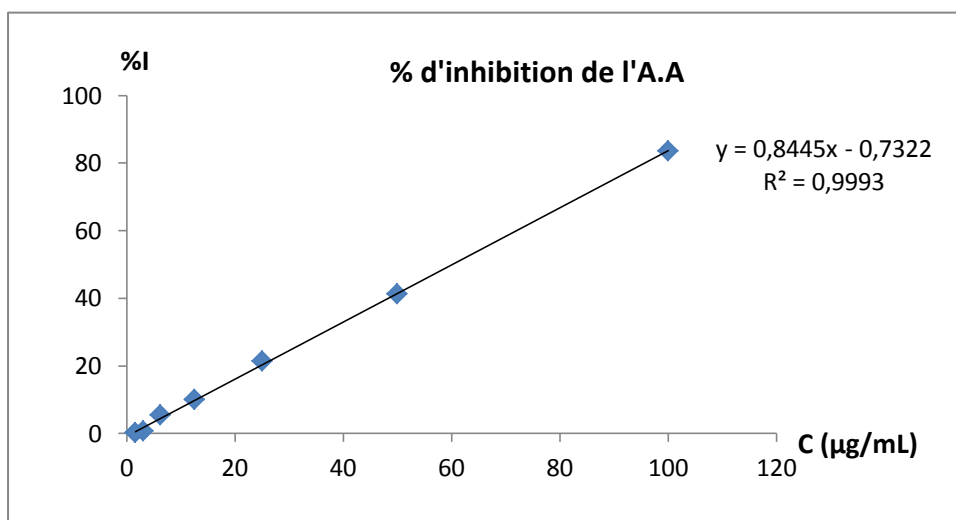


Figure 16 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.

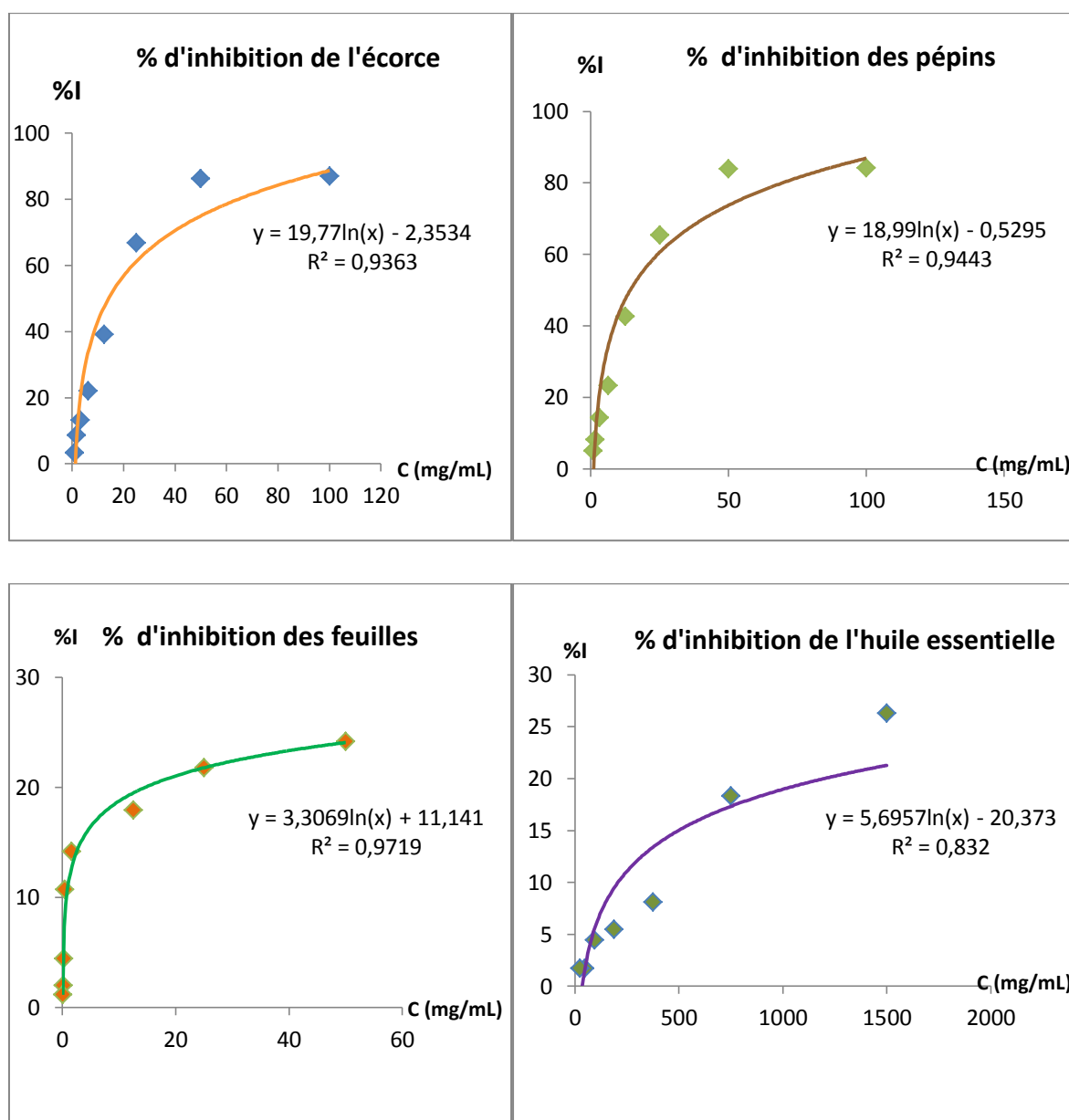


Figure 17 : Pourcentages d'inhibitions des extraits brutes (écorces, feuilles, pépins) et de l'huile essentielle du *Citrus reticulata*.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que tous les extraits possèdent une activité antiradicalaire à dose dépendante déduite graphiquement d'IC₅₀ (mg/ml) à partir de la courbe des taux d'inhibitions (figure17). Ce paramètre est utilisé pour estimer l'activité antioxydante, qui détermine la concentration requise en extrait pour réduire 50% de l'activité du radical libre DPPH. Plus la valeur de l'IC₅₀ est petite, plus l'activité antiradicalaire de l'extrait est grande (Safdar et al., 2017 ; Li et Sun, 2017).

L'extrait d'écorce possède l'effet scavenger le plus puissant parmi les quatre extraits étudiés avec une valeur de IC_{50} de 14,127 mg/ml, suivi par l'extrait de pépins de 14,308 mg/ml, cependant, leurs potentielle antiradicalaire restent largement inférieur à celle de l'acide ascorbique qui est de (60,073 μ g/ml) présentant ainsi une IC_{50} la plus faible (figure 18). En revanche, la concentration utilisée de l'huile essentielle et des feuilles n'était pas aussi suffisante pour inhibé (50%) de l'activité du radical DPPH présentant ainsi un faible potentiel antiradicalaire et donc une faible activité antioxydante de l'ordre de (26%) et (24%) respectivement vis-à-vis du radical DPPH par rapport aux autres extraits (écorces, pépins) (figure17). Ces résultats peuvent être en corrélation avec la concentration d'extrait utilisée, car plus la concentration en extrait est élevée, plus le taux d'inhibition est grand, plus l'activité antiradicalaire est importante (Kumaran et Joel Karunakaran, 2007 ; AndziBarhé et FeuyaTchouya, 2015).

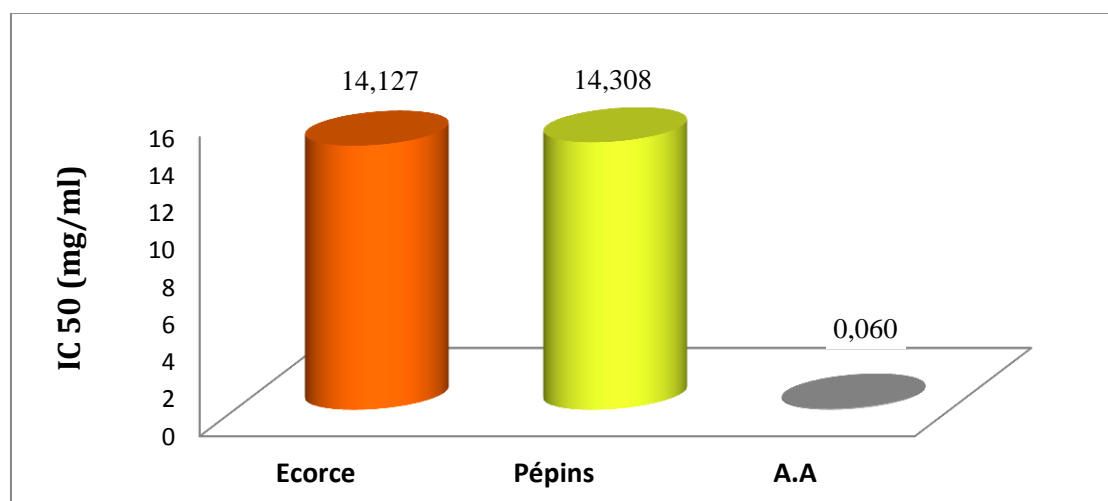


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des écorces et des pépins du *Citrus reticulata* et de l'acide ascorbique.

Comparant nos résultats à d'autres, l'activité antiradicalaire d'extrait d'écorce est plus importante que celle repérée dans l'étude de Saffdar et al., (2017), qui ont indiqué un potentiel antioxydant soit une moyenne ($69,74 \pm 1,97\%$; $61,37 \pm 1,63\%$; $25,82 \pm 1,15\%$) dans l'extrait éthanolique, et un effet scavenger plus important dans l'extrait méthanolique pour les différents tests ; DPPH, Superoxyde, FRAP respectivement ($72,83 \pm 1,12\%$; $64,80 \pm 1,57\%$; $27,67 \pm 1,91\%$). Il ressort de ces résultats également que la méthode de DPPH est la meilleure

dans l'estimation du potentiel antiradicalaire auquel le radical DPPH se dissout facilement dans le solvant (éthanol et méthanol).

Dans la même investigation, il a été rapporté que la pulpe d'orange présentait une activité de piégeage des radicaux puissante (69,31%), suivie par l'écorce de mandarine (68,57%), tandis que l'écorce de citron avait la plus faible activité de piégeage des radicaux (46,98%) (**Safdar et al., 2017**).

Al-Juhaimi et ses collaborateurs. (2014), dans leur étude menée sur l'écorce d'agrumes, ont rapporté un potentiel antioxydant modéré (46,98% ; 67,58% ; 68,57% ; 69,31%) pour le citrons, oranges, mandarines et la pulpe d'oranges respectivement. Toutefois, le potentiel antioxydant de la présente étude reste le meilleur (86%). Ce même auteur a déduit que la teneur en vitamine C contribue plus que les composés phénoliques à l'établissement du pouvoir antioxydant des agrumes vu que les agrumes sont souvent appréciés en raison de leur teneur élevée en vitamine C qui présente de multiples avantages pour la santé en prévenant et en guérissant certaines maladies (**Anuchapreeda et al., 2020**).

Cependant, les résultats obtenus pour l'extrait des pépins sont moins importants que ceux repérés dans l'étude d'**Oikeh et al., (2013)** qui ont rapporté une valeur d'IC50 d'un extrait éthanolique à 70% plus faible que la nôtre pour les pépins d'orange douce (*Citrus sinensis*) avec une moyenne de 0,18 mg/ml, et donc une forte activité de piégeage des radicaux. Plusieurs études ont été consignées dans l'évaluation de l'activité antioxydante d'HE de *Citrus reticulata* auxquels différents résultats ont été obtenus.

(Bouzouita et al., (2008) dans leur étude ont justifié que la variance des résultats de l'activité antioxydante des HEs pourrait être liée à la teneur totale en composés phénoliques testée dans certains espèce de citrus. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de **Guo et al., (2018)** et **López-Alarcón et Denicola, (2013)** qui ont rapporté que l'activité antioxydante peut être affecter par la présence d'autres molécules que les composants phénoliques contenus dans les HEs ou la synergie entre ceux-ci contribuent à l'activité antioxydante, à cause de la biodiversité de la composition chimique d'HE dans l'espèce elle-même dans différentes régions ainsi que les différents mécanismes d'actions des différents tests d'activité antioxydante.

Fadhlillah et al., (2019), dans leur étude menée sur les feuilles de la mandarine, ont montré une activité antiradicalaire puissante vis-à-vis du radical DPPH, et un potentiel antioxydant

similaire que celui de l'antioxydant standard (vitamine C) soit en moyenne de (61%) ce qui est largement supérieur à celui de la présente étude (24%).

L'effet scavenger des feuilles détecté dans notre analyse, est plus faible comparé à celui de certaines espèces du genre Citrus dans l'étude de **Lagha Benamrouche et Madani (2013)** ; qui ont donné de faibles concentrations inhibitrices soit en moyenne $0,604 \pm 0,211$; $0,621 \pm 0,242$; $0,624 \pm 0,138$; $0,641 \pm 0,144$ mg/ml d'extrait pour une variété d'orange douce (Portugaise, Thomson navel, Washington navel, Sanguinelli) respectivement.

Dans la même approche, **DO et ses collaborateurs. (2014)** ont étudié l'effet du solvant d'extraction sur la teneur totale en composés phénoliques et sur l'activité antioxydante, et ont rapporté que l'acétone a enregistré le meilleur taux d'extraction des composés phénoliques et le meilleur potentiel antiradicalaire. Ils ressorts de ces résultats que la teneur en polyphénol est proportionnelle à leurs activité antioxydante et que plus de 95% de la capacité antioxydante des extraits est due aux composants phénoliques (**Do et al., 2014 ; Ghafar et al., 2010 ; Li et al., 2006 ; AndziBarhé et FeuyaTchouya, 2015**).

L'activité antiradicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes (**Lagha Benamrouch et Madani, 2013**). Cependant l'extrait des feuilles qui représente la fraction la plus riche en polyphénols dans notre étude, possède un effet scavenger moins important par rapport aux autres extraits qui ont présenté une faible teneur en composé phénoliques (écorces, pépins). Ce résultat peut être expliqué par le fait que les composants bioactifs contenus dans les feuilles possèdent une faible contribution à l'activité antioxydante et que particulièrement pour le test DPPH, les flavanones sont exceptés d'avoir une faible participation (**Khan et al., 2010**).

De même, le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant ; c'est ce qui été rapporté dans l'étude de **Li et Sun, (2017)** qui ont exhibés que les polyphénols polymériques possèdent une activité antioxydante meilleure que les polyphénols oligomériques et que ses derniers agissent en tant qu'agents donneurs d'hydrogène ou d'électrons dans le milieu réactionnel (**Ghafar et al., 2010 ; Huang et al., 2005**).

Enfin, l'activité antioxydante ne peut pas être mesurée directement en observant seulement l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs affectent le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment la maturité de la plante ou du fruit, la matrice végétale, le solvant

d'extraction ainsi que les conditions d'extraction (température et temps), la méthode analytique utilisée, et le profil phénolique. Plus l'extrait est riche en composés phénoliques contenant un nombre plus élevé en groupes hydroxyles, plus il possède une activité antioxydante puissante (Li et *al.*, 2006 Al-Juhaimi et *al.*, 2014 ; Do et *al.*, 2014 ; AndziBarhé et FeuyaTchouya, 2015).

Conclusion et perspectives

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

Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes du genre *Citrus* représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs, et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. Les extraits naturels issus des agrumes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue des capacités antioxydantes.

L'objectif primordial assigné par cette étude englobe le même contexte afin d'évaluer les propriétés antioxydantes des extraits bruts éthanolique (écorces, feuilles, pépins) ainsi que l'huile essentielle de *Citrus reticulata*, plante largement utilisée en médecine traditionnelle à travers le monde.

Dans le premier volet, l'extraction et la détermination des rendements en extraits bruts a montré une rentabilité importante en extrait éthanolique chez les trois parties étudiées de la mandarine allant de 13,56%, 14,7% et 39,13% respectivement pour les extraits de pépins, feuilles et les écorces. L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation a permis d'obtenir un rendement plus faible de l'ordre de 1,20%, une densité de 0,78, un indice de réfraction de 1,473 et des propriétés organoleptiques comparables à plusieurs études antérieures révélant ainsi que notre huile essentielle est de bonne qualité.

Dans le deuxième volet, notre attention s'est accordée aux dosages des métabolites secondaires. Les résultats obtenus nous ont révélé que les différents compartiments étudiés (écorces, feuilles, pépins) respectivement constituent une source prometteuse en polyphénols totaux ($3,697 \pm 0,193$, $4,95 \pm 0,169$ et $0,6955 \pm 0,154$ mg EAG/gMS) et présentent des teneurs en flavonoïdes de ($5,77 \pm 0,491$, $15,082 \pm 1,464$ et $4,631 \pm 0,436$ mg ECAT/gMS).

La dernière partie a été consacrée à l'étude des propriétés antioxydantes de l'huile essentielle et les extraits bruts de *Citrus reticulata* par la méthode DPPH. Les résultats obtenus ont révélé que les écorces et les pépins possèdent le meilleur effet scavenger vis-à-vis du DPPH allant jusqu'à 84,2% et 86,94% pour une concentration de 14,1274 mg/ml et 14,3083 mg/ml, respectivement, alors que l'extrait de feuilles et l'huile essentielle extraite à partir des écorces, ont enregistré une faible activité inhibitrice en inhibant 25% de l'activité du DPPH.

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires approfondies à différents niveaux de l'approche à travers une caractérisation fine et poussée sur d'autres composés de *Citrus reticulata* par d'autres techniques, notamment une chromatographie en phase gazeuse et une HPLC pour les extraits bruts et une GC-MS pour l'huile essentielle dans le but d'exploiter le profil biochimique de ces derniers, afin d'établir une relation structure activité. Les activités antioxydantes doivent être évaluées par plusieurs tests dans d'autres systèmes *in vitro* (cellulaires et enzymatiques), tout comme *in vivo* (modèle animal) pour mieux cerner les interactions moléculaires de ces composés vis-à-vis de leurs cibles dans le domaine pharmaceutique.

Dans les perspectives souhaités, il serait donc intéressant d'élargir le panel des activités biologiques notamment l'activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques : antitumorale, anti-infectieuse, antifongique, antibactérienne et anti-analgésique, et de caractériser et isoler les principes actifs responsables à ces propriétés pharmacologiques.

Références bibliographiques

-A-

- AFNOR NF T-75- 111 & 112 : (Association Française de Normalisation, Norme) « Huiles essentielles ». Paris, France.
- Adelina, R., Supriyati, M.D., Nawangsari, D.A, Jenie, R.I., Meiyanto, E. (2008). *Citrus reticulata*'s Peels Modulate Blood Cholesterol Profile and Increase Bone Density of Ovariectomized Rats. *International Journal of Biotechnology*, 1092-1097.
- Ajikumaran Nair, S., Rajani Kurup, S. R., Akhila Nair, S., Sabulal, B. (2017). Citrus peels prevent cancer. *Phytomedicine*, doi: 10.1016/j.phymed.2017.08.011.
- Alfano, A., Corsuto, L., Finamore, R., Savarese, M., Ferrara, F., Falco, S., Schiraldi, C. (2018). Valorization of Olive Mill Wastewater by Membrane Processes to Recover Natural Antioxidant Compounds for Cosmeceutical and Nutraceutical Applications or Functional Foods. *Antioxidants*, 7(6), 72.
- Al-Juhaimi, F. Y. (2014). Citrus fruits by-products as sources of bioactive compounds with antioxidant potential. *Pak. J. Bot.*, 2014. 46(4): 1459-1462.
- Andzi Barhé, T., Feuya Tchouya, G.R. (2015). Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arabian Journal of Chemestr*, 2-8.
- Anuchapreeda, S., Chueahongthong, F., Viriyaadhammaa, N., Panyajai, P., Anzawa, R., Tima, S., Okonogi, S. (2020). Antileukemic Cell Proliferation of Active Compounds from Kaffir Lime (*Citrus hystrix*) Leaves. *Molecules*, 25(6), 2-16.
- Aruoma, O. I., Landes, B., Ramful-Baboolall, D., Bourdon, E., Neergheen-Bhujun, V., Wagner, K.-H., & Bahorun, T. (2012). Functional benefits of citrus fruits in the management of diabetes. *Preventive Medicine*, 54, S12–S16.
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220–243.
- Aubert, B et Vullin, G. (1997). Pépinières et plantations d'agrumes. Montpellier, France : CIRAD.
- Azmir, J., Zaidul, I. S.M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F.Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Food Engineering*, 117(4), 426-436.

-B -

- Baba, H., Headman, G. B., Okpako, E. (2016). Phytochemical screening, free radical scavenging and phenolic content evaluation of aqueous- ethanol extract of seeds of citrus sinensis (L) osbeck (Rutaceae). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2016, 8(9):244-248.
- Barrère, P. (1954). Les agrumes dans le monde. Premier article. Dans : *Cahiers d'outre-mer*. (N° 26 - 7e année, pp. 155-194).
- Bartnick, D.D., Mohler, C.M., Houlihan, M. (2006). Methods for the production of food grade extracts. United States Patent Application. 20060088627.
- Bentabet Lasgaa N. *Étude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes Fredoliaaretioides et echiumvulgare de l'ouest algérien*. Thèse de doctorat 2015, P 20-21.
- Bernstein, N., Akram, M., Daniyal, M., Koltai, H., Fridlender, M., & Gorelick, J. (2018). Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites. *Advances in Agronomy*, 131–183.
- Bhandary, S. K., Kumari, S. N., Bhat, V. S., Sharmila, K. P., Bekal, M. P. (2012). Preliminary phytochemical screening of various extracts of Punica granatum peel, whole fruit and seeds. *Nitte University Journal of Health Science*, (Vol. 2), 2249-7110.
- Boizot, N., Charpentier, J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cah. Tech. INRA*, 79-82.
- Boukhatem, M.N., Hamaidi, M. S., Saidi F., et Hakim, Y. (2010). Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (Pelargonium graveolens L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & technologie*, 37-45.
- Boulila, A., Hassen, I., Haouari, L., Mejri, F., Ben amor, I., Casabiancaci, H., Hosni, K. (2015). Enzyme-assisted extraction of bioactive compound from bay leaves (Laurus nobilis L.). *Industrial Crops and Products*, 74, 485 – 493.
- Bourgou, S., Rahali, F. Z., Ourghemmi, I., & Saïdani Tounsi, M. (2012). Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–10.
- 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. 128p.

- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Elaoufi, M. M., Latreche, A., & Benchiha, W. (2016). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 74(6), 453–462.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., Chaabouni, M. M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide et de l'Huile essentielle de *Juniperus phœnicea*. *La Société Chimique de Tunisie*, 10 :119-125.
- Brand-Williams, W., M. Cuvelier & C. Berset (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- BRIXI GORMAT, N., BELARBI, M., MAMI, Z., DJAZIRI, F. A. (2015). Physico-Chemical Characteristics and antioxidant Activity of Phenolic compounds and oil of *Citrus aurantium* Seeds from Northwest Algeria. *International Journal of Phytomedicine* 7, 370- 378.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

-C-

- Cesar, T. B., Aptekmann, N. P., Araujo, M. P., Vinagre, C. C., & Maranhão, R. C. (2010). Orange juice decreases low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic subjects and improves lipid transfer to high-density lipoprotein in normal and hypercholesterolemic subjects. *Nutrition Research*, 30(10), 689–694.
- Chapuis-Lardy, L., Contour-Ansel, D., et Bernhard-Reversat, F. (2002). High-performance liquid chromatography of water-soluble phenolics in leaf litter of three *Eucalyptus* hybrids (Congo). *Plant Science*, 163 (2), 217-222.
- Chen, L. Y., Cheng, C. W. & liang, J.Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Chimie alimentaire*, 170, 10-15.
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047–2053.

- Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013). Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, 52(525), 22-25.

-D-

- Da Silveira, S. K., Luciano, F. B., Fronza, N., Jr, A. C., Scheurmann, G. N., Virira, C. R. W. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards food borne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C. *LWT - Food Science and Technology*, 59 : 86 - 93.
- Derkyi, N. S. A., Adu-Amankwa, B., Sekyere, D., Darkwa, N. A. (2011). Rapid prediction of extractives and polyphenolic contents in *Pinus* carriage bark using near infrared reflectance spectroscopy. *International Journal of Applied Science*, 2(1).
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302.
- Durville, J.P. (1893). *Fabrication des essences et des parfums*. Editeur J. FRITSCH, Paris.
- Durville, J.P., (1930). *Fabrication des essences et des parfums*. Ed. Desforges, Girardot et Cie, 807 p.

-E-

- Ebadi, M. T., Azizi, M., Sefidkon, F., Ahmadi, N. (2015). Influence of different drying methods on drying period, essential oil content and composition of *Lippia citriodora* Kunth. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.06.001>.
- El-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., Bengueddour, R. (2018). Screening phytochimique d'une plante médicinale: *Mentha spicata* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 226-233.
- Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M. (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*. 68:939 - 953.

-F-

- Fabrice, B. (2009). *Les huiles essentielles*. Edition Lanore. Paris.

- Fadel, H. (1991). Comparative studies on leaf oils of Egyptian Citrus varieties. *Food Chem J Islam Acad Sci*, 4 : 196–9 11.
- Fadhlillah, F. M., Oktaviani, W., Mariani, R. (2019). Antioxidant activity of Ethanol Extract, n-Hexane fraction, Ethyl Acetate fraction and Water fraction of Garut Orange Leaves (*Citrus reticulata* Blanco). *Journal of Physics : Conference Series*, 1402, 055083. doi:10.1088/1742-6596/1402/5/055083.
- FAO (2013). FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- Faucon, M. (2015). *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription*. Édition sang de la terre, Paris, pp: 39-455.
- Feitosa, C. M., de Freitas, R. M., Silva, V. L., Araujo, L. da S., de Melo, C. H. S., & Santos, F. P. D. S. (2017). Citrus: A Perspective for Developing Phytomedicines for Neurodegenerative Diseases. *Citrus Pathology*.
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 494–504.
- Fouad, H. A., Da Camara, C. A. G. (2017). Chemical composition and bioactivity of peel oils from *Citrus aurantiifolia* and *Citrus reticulata* and enantiomers of their major constituent against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera : Curculionidae). *Stored Products Research*, 73 : 30-36.
- Fred, G., Gmitter, Jr., Chen, C., Nageswara-Rao, M. Soneji, J. R. (2007). Citrus Fruits. In *Genom Mapping and Molecular Breeding in plants: Fruits And Nuts*, (ed. Chittaranjan Kole, 265-279).USA, Springer Berlin Heidelberg.

-G-

- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., & Caristi, C. (2007). Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*, 12(8), 1641–1673. doi:10.3390/12081641.
- Ghafar, M. F, Prasad, K. N, Weng, K. K, Ismail, A. (2010). Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(3), 326-330.
- Gmitter, G. Chunxian Jr., Chen, Nageswara M. Rao. Et Jaya R. Soneji. (2007). *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Fruits and Nuts*.C. Kole. Florida.
- Gomes, P. B., Mata, V.G., Rodrigues, A.E. (2004). Characterization of Portuguese grown geranium oil (*Pelargonium* sp.). *Essent. Oil Res*, 16, 490–49.

- Gonzalez-Meijome, J. M., Lira, M., Lopez-Aleman, A., Almeida, J. B., Parafita, M. A., & Refojo, M. F. (2006). Refractive index and equilibrium water content of conventional and silicone hydrogel contact lenses. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 26(1), 57–64.
- Gourguillon, L., Destandau, E., Lobstein, A., Lesellier E. (2016). Comparaison de différentes méthodes d'extraction d'acides dicaféoylquiniques à partir d'une plante halophile. *Compte Rendus Chimie*, 19 : 1133-1141.
- Graf, B. A., Milbury, P. E., & Blumberg, J. B. (2005). Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8(3), 281–290.
- Guignard, J., L. (2001). *Botanique, Systématique moléculaire*. Ed. Masson, 290.
- Guo, J. j., Gao, Z. p., Xia, J.l., Ritenour, M. A., Li, G.y., Shan, Y. (2018). Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. *LWT - Food Science and Technology*.
- Guohong, A. W., Javier, T., Victoria, I., Antonio, L.G., Estela, P.R., Carles, B. ... & Manuel, T. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Journal of Nature*, 554(6), 311 – 316.

-H-

- Hartmann, T., (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68: 2831 – 2846.
- Hellal, Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Applications sur la sardine (*Sardina pilchardus*) (Mémoire de Magister), Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- Hernandez-Ochoa L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale (Thèse de Doctorat), l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.
- Herzi, N. (2013). *Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO2-supercritique et des techniques conventionnelles*. Thèse en vue de l'obtention de doctorat de l'université de Toulouse. Université de Toulouse. 185p.

- Hilan, C., Bouaoun, D., Aoun, J., Sfeir, R., & Garabeth, F. (2009). Propriétés antimicrobiennes et toxicité par détermination de la DL50 de l'huile essentielle de Prangos asperula Boissier. *Phytothérapie*, 7(1), 8–14.
- Hirose, M. (1998). Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *Carcinogenesis*, 19(1), 207–212.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6), 1841-1856.

-I-

- İnan, Ö., Özcan, M. M., & Aljuhaimi, F. (2017). Effect of location and Citrus species on total phenolic, antioxidant, and radical scavenging activities of some Citrus seed and oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), 1-8.
- ITAFV (2011). La culture des agrumes. Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne, Birtouta-Alger. : www.itafv.dz.
- ITAFV (2017). Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière de la Vigne : www.itafv.dz.

-J-

- Jardin Musée Balaguier. (2015), CANOPE édition.
- Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S.-C., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S. C. (2004). Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3389–3393.
- Jing, D., Wangyuan, C. H., Guangzhong, Y. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125, 1430–1435.
- Justin, J. S., Milton, A., Natesan, G. (2014). Phytochemical evaluation of peel of Citrus reticulata Blanco using various solvent extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Business Management*, 26-35.

-K-

- Karboa, M. (2001) L'agrumiculture en Algérie. Option méditerranéenne n°43. Ed : CIHEAM. p 21-26.

- Karumi Y., Onyeyili P.A., Oyuugbuaja V.O. (2004). Identification of active principals of *M. Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *J.Med.SCI*, 4(3) : 179-182.
- Khan, A. I., Kender, W.J. (2007). *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*.CABI,1-7(370p).
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851,8.
- Khiya, Z., Hayani, M., Gamar, A., Kharchouf, S., Amine, S., Berrekhis, F., Elhilali, F. (2018). Valorization of the *Salvia officinalis* L of the Morocco bioactive extracts: Phytochemistry, antioxidant and anticorrosive activities. *Journal of King Saud University – Science*, 1-44.
- Kim D.O., Chun O.K., Kim Y. J., MoonH.Y. et Lee C.Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums, *J. Agric. Food Chem* Vol. 51(22), 6509-6515
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96(3), 229–245.
- Koba, K., Sanda, K., Raynaud, C., Nenoneme, Y.A., Millet, J., Chaumont, J.P. (2004). Activités antimicrobiennes d’huiles essentielles de trois *Cytopogon* sp vis á vis des germes pathogènes d’animaux de compagnie. *Annales de médecine vétérinaire*, 148, 202-206.
- Koşar, M., Dorman, H. J. D., & Hiltunen, R. (2005). Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chemistry*, 91(3), 525–533.
- Kumaran, A., Joel Karunakaran, R. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 344–352.
- Kurowska, E. M., Spence, J. D., Jordan, J., Wetmore, S., Freeman, D. J., Piché, L. A., & Serratore, P. (2000). HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(5), 1095–1100.

-L-

- Ladanya, M., S. (2008). Citrus fruit biology, technology and evaluation. Elsevier, 1-585-576.
- Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723–730.
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182–188.
- Li, L. Sun, B. (2017). Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-18.
- Li, X.-M., Tian, S.-L., Pang, Z.-C., Shi, J.-Y., Feng, Z.-S., & Zhang, Y.-M. (2009). Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chemistry*, 115(3), 1114–1119.
- Lim, T., K. (2012). *Citrus reticulata*. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*, 695–720. doi:10.1007/978-94-007-4053-2_86(Springer Link).
- Liu, E. H., Zhao, P., Duan, L., Zheng, G. D., Guo, L., Yang, H., & Li, P. (2013). 403 Simultaneous determination of six bioactive flavonoids in *Citri reticulatae* 404 Pericarpium by rapid resolution liquid chromatography coupled with triple 405 quadrupole electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 141(4), 406 3977-3983.
- López-Alarcón, C., Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10.
- Lota, M.L., De Rocca Serra, D., Tomi, F.L, et al. (2001). Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochem Syst Ecol*, 29 : 77–104.
- Loussert R. (1989). *Les agrumes*. 2. Production Edition Lavoisier, Paris, 157.
- Loussert, R. (1989). *Les agrumes, arboriculture*. Ed. Technique agricoles méditerranéennes, Lavoisier, Paris, 113p.
- Lv, X., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., Liu, Y. (2015). Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chemistry Central Journal*, 9(1), 2-14.

-M-

- M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., Mihoubi Boudhrioua, N. (2014). Extraction methods of citrus peel phenolic compounds: a review. *Food Reviews International*. 30, 265-290.
- Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, 2013,9, 35–40.
- Mangambu, M., Mushagalusa, K., & Kadima, N. (2014). Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, R.D.Congo). *Journal of Applied Biosciences*, 75(1): 6211–6220.
- Marzouki, H., Khaldi, A., Chamli, R., Bouzid, S., Piras, A., Falconieri, D., Marongiu, B. (2009). Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*, 23(3), 230 - 237.
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833–839.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyle (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science of Technology*, (26) : 211-219.
- MOULEHI, I., BOURGOU, S., OURGHEMMI, I., TOUNSI, M. S. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39, 74-80.
- Murga, R., Ruiz, R., Beltrán, S., Cabezas, J. L. (2000). Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins From Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. *Agric Food Chem*, 48(8):3408-12.

-N-

- Ndoye Foe, F. M. C., Tchingang, T. F. K., Nyegue, A. M., Abdou, J. P., Yaya, A. J. G., Tchinda, A. T., Etoa, F. X. (2016). Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). 1-12.

- Nieves Criado, M., Paz Romero, M., Casanovas, M. et Motilva, M. J. (2008). Pigment profile and Color of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. *Food Chemistry*, 110: 873–880.

-O-

- Oikeh, E. I., Oriakhi, K., Omoregie, E. S. (2013). Proximate Analysis and Phytochemical Screening of Citrus sinensis Fruit Wastes. *The Bioscientist Journal*. 1(2):164-170.
- Ortiz, J., M. (2002). Citrus. Botany taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. Taylor & Francis, 2 : p 16-35.
- Ouibrahim, A., Tlili-Ait-kaki, A., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A.G., Djabar, M. R. (2013). Evaluation of antibacterial activity of Laurus nobilis L., Rosmarinus officinalis L. and Ocimum basilicum L. from Northeast of Algeria. *Afr. Microbiol. Res*, 7 (42), 4968 - 4973 pp.

-P-

- Pereira, C. G., Meireles, M. A. A. (2007). Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(5), 407–413. doi:10.1002/ffj.1813.
- Pibiri M.C. (2005). *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle* (Thèse de doctorat). Polytechniques Fédérale de Lausanne. Suisse.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16(4), 233–239.

-R-

- Radulović, N. S., Randjelović, P. J., Stojanović, N. M., Blagojević, P. D., Stojanović-Radić, Z. Z., Ilić, I. R., & Djordjević, V. B. (2013). Toxic essential oils. Part II: Chemical, toxicological, pharmacological and microbiological profiles of Artemisia annua L. volatiles. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 37–49.
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Ahmad Nayik, G. (2016). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.

- Rauf, A., Uddin, G., & Ali, J. (2014). Phytochemical analysis and radical scavenging profile of juices of *Citrus sinensis*, *Citrus anrantifolia*, and *Citrus limonum*. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 4(1), 1-3.
- Rebour, H. (1948). La culture des agrumes en Algérie. Documents Algériens (49 éd., vol. 4). Série économique. Agrumiculture.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). Applications aux produits naturels. In : Les composés phénoliques des végétaux Editions Dunod, Paris 254 pp.
- Rivero-Pérez, M. D., Muñiz, P., & González-Sanjosé, M. L. (2007). Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5476–5483.
- Rover, M. R., Brown, R. C. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Analytical and Applied Pyrolysis*, 104,366-371.

-S-

- Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500.
- Sanchez-Moreno C. A Larrauri , J., Saura-Calixto, F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *International Journal of Food Science Agricultural* 76; p: 270- 276.
- Sawalha, S.M.S., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE-MS/MS. *Food Chemistry*. 116, 567-574.
- Şeker Karatoprak, G., Yücel Aşık, Ç., Çakır, A., & Köngül Şafak, E. (2020). In vitro pharmacological screening of antioxidant, cytotoxic and enzyme inhibitory activities of *Citrus aurantifolia* Linn. Dried fruit extract. *International Journal of Environmental Health Research*, 1–10.
- Shan, Y. (2016). *Comprehensive Utilization of Citrus By-Products* (1^{er}, éd). Academic Press.

- Sharopov, F., Santhosh Braun, M., Gulmurodov, I., Khalifaev, D., Isupov, S. et Wink, M. (2015). Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from Tajikistan. *Foods*, 4(4): 645-653.
- Siddhuraju, P., Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10–19.
- Singh, B., Pal Singh, J., Kaur, A., Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, Vol. (299), page: 152-178.
- Slinkard, K., Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enol. Vitic.* 2,8, 49-55.
- Soe'eib, S., Nyoman Puspa Asri, A. S Dwi Saptati N.H. , Diah Agustina (2017). ENFLEURAGE ESSENTIAL OIL FROM JASMINE AND ROSE USING COLD FAT ADSORBENT. *Jurnal Ilmiah Widaya Teknik*, Vol 15, 58-61.
- Solari, M.-A. (2019). Stress et anxiété, recours aux huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, 58(590), 29–3.
- Spreen, T., H. “The Free Trade Area of the Americas and the Market for Processed Citrus Products.” Exposé devant être présenté lors de la 13ème Réunion intergouvernementale sur les agrumes, FAO, Beijing, Chine, mai 2001.
- Stone, D. (2017). The Citrus Family Tree. *National Geographic Magazine*.
- Sun, B., Fukuhara, M. (1997). Effects of co-administration of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole and flavonoids on the activation of mutagens and drug-metabolizing enzymes in mice. *Toxicology*, 122(1-2), 61–72.
- Svoboda, K. P., Greenaway, R. I. (2003). Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. *International Journal of Aromatherapy*, 13(4), 196–202.
- Swingle, W. T., Reece, P. C., (1967). The botany of citrus and its wild relatives. In: Reuther, W., Batchelor, L. D., Webber, H. J., (Eds.). *The Citrus Industry* (Vol. 1). University of California Berkeley. Pp: 130-190.

-T-

- Taleb-Toudert, K. (2015). *Extraction Et Caractérisation Des Huiles Essentielles De Dix Plantes Aromatiques Provenant De La Région Kabylie* (thèse de doctorat), Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.
- Tanaka, T. (1961). *Citologia: Semi-centennial commemoration papers on Citrus studies*, Osaka.
- Tenscher, E., Anton, R., Lobstein, A., (2005). *Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Edition Tec&doc, p3-50/121-124.
- Tongnuanchan,P., Benjakul, S. (2014). *Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation*.*Journal of Food Science*, 1231-1249.
- Tumbas, V.T., Četkovic, G.S., Djilas, S.M., Canadanovic-Brunet, J.M., Vulic, J.J., Knez, Z. (2010). *Antioxidant activity of mandarin (Citrus reticulata) peel*. *Biblid*. 40, 195-203.
- Turati, F., Rossi, M., Pelucchi, C., Levi, F., & La Vecchia, C. (2015). *Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies*. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), 102–110.

-U-

- Ulbricht, C., Brendler, T., Gruenwald, J., Kligler, B., Keifer, D., Abrams, T. R., Woods, J.,Boun, H.,Kirkwood, C.D., Hackman, D.A. Basch, E., Lafferty, H.J. (2005). *Lemon Balm (Melissa officinalisL.): an evidence-based systematic review by the natural standard Research collaboration*. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 5(4), 71–114.
- USDA (2016). *National Agricultural Statistics Service*. In: <https://www.nass.usda.gov>
- USDA (2019). *National Agricultural Statistics Service*. In: <https://www.nass.usda.gov>

-W-

- Wagner H., 1983. *Drogen analyse, Dünnschicht chromatographische Analyse von Arzneidrogen*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 522 pp.
- WONG S. P., LEONG L. P. et KOH J.H.W. (2006) *Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants; Food Chemistry* 99; p: 775–783.
- Wu, T., Cheng, D., He, M., Pan, S., Yao, X., Xu, X. (2014). *Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavones from Citrus reticulata Blanco peel against Aspergillus niger*. *Food Control*, 35(1), 354-359.

-X-

- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106(2), 545–551.
- Xu, J. J., Wu, X., Li, M. M., Li, G. Q., Yang, Y. T., Luo, H. J., Huang, W. H., Chung, 440 H. Y., Ye, W. C., Wang, G. C., & Li, Y. L. (2014). Antiviral activity of MANUSCRIPT ACCEPTED ACCEPTED MANUSCRIPT 22 441 polymethoxylated flavones from "Guangchenpi", the edible and medicinal 442 pericarps of *Citrus reticulata* 'Chachii. *Journal of Agricultural and Food 443 Chemistry*, 62(10), 2182-2189.

-Y-

- Yang, J., Wen, L., Zhao, Y., Jiang, Y., Tian, M., Liu, H., Yang, B. (2018). Structure identification of an arabino-galacturonan in *Citrus reticulata* Blanco "Chachiensis" peel. *Food Hydrocolloids*, 84, 481–488.
- Yaqoob, M., Aggarwal, P., Aslam, R., & Rehal, J. (2020). Extraction of bioactives from citrus. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, 357–377.
- Yi, F., Jin, R., Sun, J., Ma, B., Baoa, X. (2018). Evaluation of mechanical-pressed essential oil from Nanfeng mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Kinokuni) as a food preservative based on antimicrobial and antioxidant activities. *LWT - Food Science and Technology*, 95 : 346-353.

-Z-

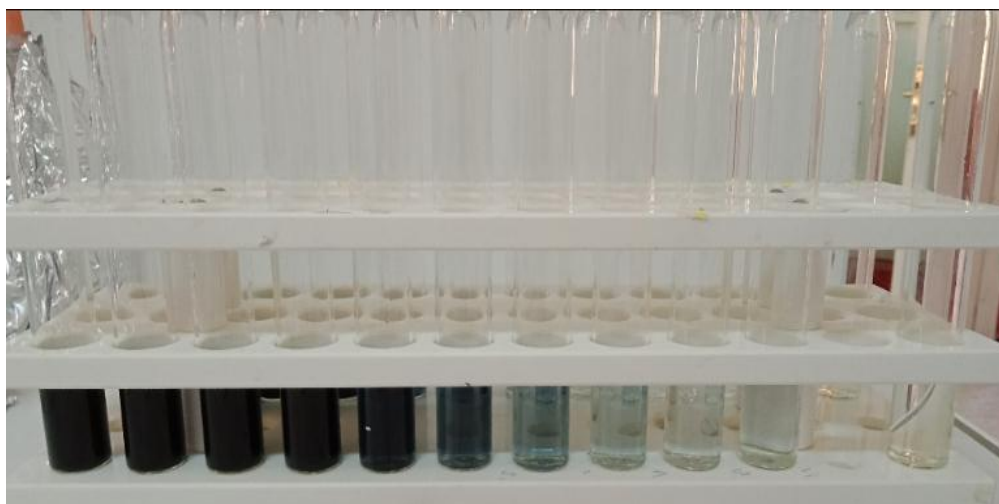
- Zhang, H., Yang, Y., & Zhou, Z. (2018). Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1), 256–263.
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., Zhou, Z. (2014). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, 145, 674–680. doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.012.
- Zhu, Q. Q., Jiang, Y. M., Lin, S., Wen, L. R., Wu, D., Zhao, M. M., Chen, F., Jia, Y. X., & Yang, B. (2013). Structural Identification of (1→6)-alpha-D-glucan, a key responsible for the health benefits of longan, and evaluation of anticancer activity. *Biomacromolecules*, 14(6), 1999-2003.

- Zia-ur-Rehman. (2006). Citrus peel extract – A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*, 99(3), 450–454.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885–896.

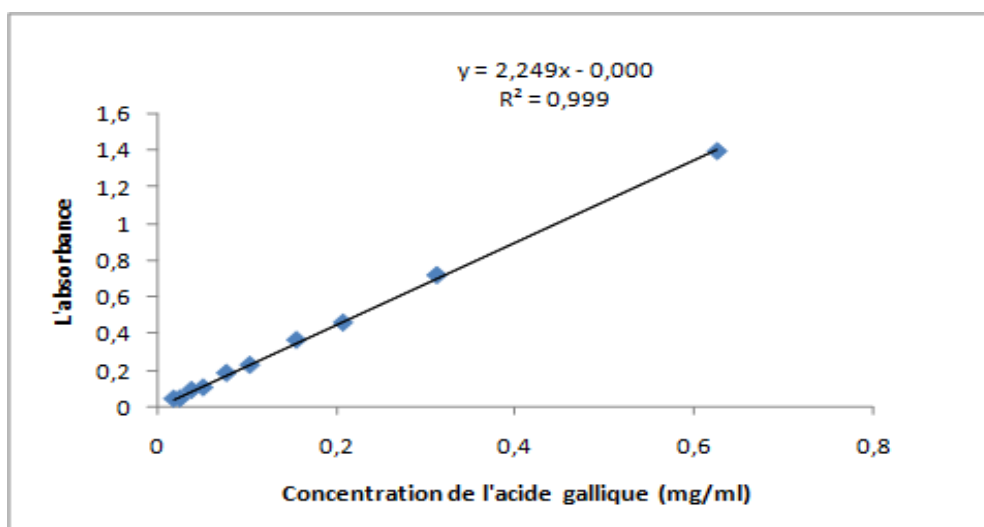
Glossaire et annexes

Annexe 1 : Dosages des polyphénols et des flavonoïdes des extraits bruts de *Citrus reticulata*.

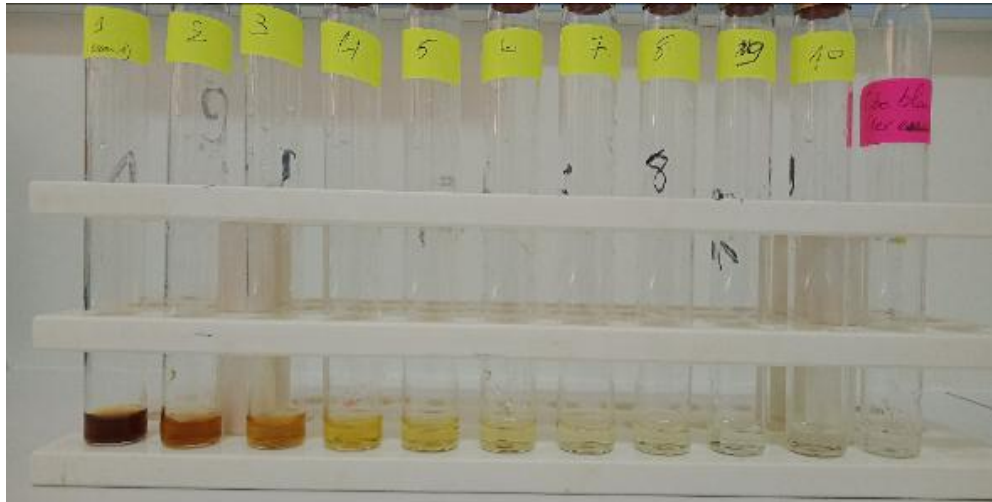
Les extraits bruts	Ecorces	Feuilles	Pépins
Polyphénols mg EAG/g MS	3,69 ± 0,19	4,95 ± 0,169	0,69 ± 0,15
Flavonoïdes mg ECAT/g MS	5,77 ± 0,491	15,08 2 ± 1,464	4,631 ± 0,436



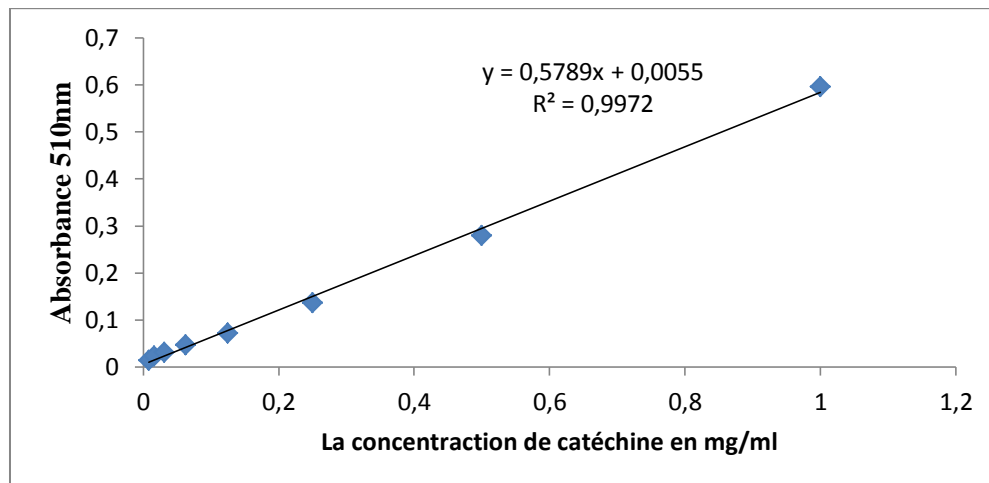
Annexe 2 : La gamme d'étalonnage d'acide gallique.



Annexe 3 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique.



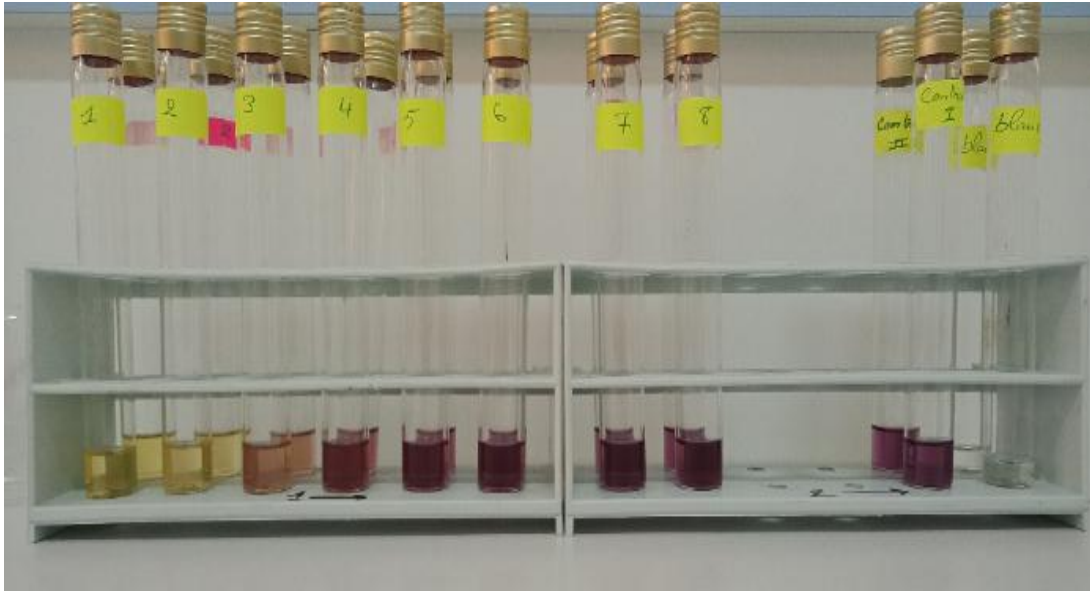
Annexe 4 : La gamme d'étalonnage du catéchine.



Annexe 5 : La courbe d'étalonnage du catéchine.

Annexe 6 : 50% d'inhibition du radical libre DPPH des extraits bruts des écorces, feuilles et pépins et l'huile essentielle du *Citrus reticulata* et de l'acide ascorbique.

Echantillon	Ecorces	Feuilles	Pépins	Huile essentielle
IC50des extraits (mg/ml)	14,12	126865,65	14,30	232224,53
IC50 Acide ascorbique (µg/ml)	60			



Annexe 7 : La gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique.

Résumé :

Les sous-produits d'agrumes nécessitent d'être valorisés du fait qu'ils représentent une source prometteuse en composés phénoliques. L'objectif de notre travail est la valorisation des déchets d'agrumes à travers l'identification phytochimique, dosage des polyphénols et flavonoïdes et l'évaluation des propriétés antioxydantes de l'huile essentielle et des extraits bruts (écorces, feuilles et pépins) du *Citrus reticulata* de la région d'Ain Témouchent. Dans un premier temps, l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation a donné un rendement de 1,20%, alors que les extraits bruts des écorces, feuilles et pépins ont montré une rentabilité de 39,13%, 14,7%, 13,56%, respectivement. Ces derniers, ont été soumis au criblage phytochimique par des méthodes standards qui ont révélé leurs abondances en flavonoïdes et en alcaloïdes. A l'issue du dosage, les taux obtenues en polyphénols totaux sont de $3,697 \pm 0,193$, $4,95 \pm 0,169$ et $0,695 \pm 0,154$ mg EAG/gMS, ces valeurs sont inférieures par rapport à celles des flavonoïdes qui sont de $5,77 \pm 0,491$, $15,082 \pm 1,464$ et $4,631 \pm 0,436$ mg ECAT/gMS respectivement pour les écorces, feuilles et pépins. L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH, a révélé des capacités antioxydantes chez tous les extraits où les écorces et les pépins ont montré un effet scavenger le plus important allant jusqu'à 84,2%, 86,94% pour une concentration de 14,127 mg/ml et 14,308 mg/ml respectivement.

Mots clés : *Citrus reticulata*, huile essentielle, extraits bruts, composés phénoliques, activité antioxydante, DPPH.

Abstract :

Citrus by-products need to be valorized as they represent a promising source of phenolic compounds. The objective of our work is the valorization of citrus waste through phytochemical identification, determination of polyphenols and flavonoids and the evaluation of the antioxidant properties of the essential oil and raw extracts (peels, leaves and seeds) of *Citrus reticulata* from the region of Ain Témouchent. Initially, the extraction of the essential oil by hydrodistillation gave a yield of 1.20%, while the crude extracts of the peels, leaves and seeds showed a profitability of 39.13%, 14.7%, 13.56%, respectively. The latter were subjected to phytochemical screening using standard methods which revealed their abundance of flavonoids and alkaloids. At the end of the assay, the levels obtained in total polyphenols are 3.697 ± 0.193 , 4.95 ± 0.169 and 0.695 ± 0.154 mg EAG/gMS, these values are lower than those of flavonoids which are 5.77 ± 0.491 , 15.082 ± 1.464 and 4.631 ± 0.436 mg ECAT/gMS respectively for peels, leaves and seeds. The evaluation of antioxidant activity by the DPPH method, revealed antioxidant capacities in all extracts where the peel and seed showed the highest scavenger effect of up to 84.2%, 86.94% for a concentration of 14.127 mg/ml and 14.308 mg/ml respectively.

Key words : *Citrus reticulata*, essential oil, crude extracts, phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH.

ملخص :

تمثل المنتجات الثانوية للحمضيات مصدرًا واعدًا للمركبات الفينولية. الهدف من عملنا هو تقييم نفايات الحمضيات من خلال التحديد الكيميائي النباتي ، وتحديد البوليفينول والفلافونويد وتقييم الخصائص المضادة للأكسدة للزيت العطري والمستخلصات الخام (اللحاء والأوراق والبذور) من حمضيات شوكية من منطقة عين تموشنت. في البداية ، أعطى استخراج الزيت العطري بالتقطير المائي عائد 1.20% ، بينما أظهرت المستخلصات الخام من اللحاء والأوراق والبذور ربحية بلغت 39.13% ، 14.7% ، 13.56% على التوالي. تم إخضاع هذه الأخيرة للفحص الكيميائي النباتي بالطرق القياسية التي كشفت عن وفرة من مركبات الفلافونويد والقلويدات. في نهاية الفحص ، المستويات التي تم الحصول عليها في البوليفينول الكلي هي 3.697 ± 0.193 ، 4.95 ± 0.169 و 0.695 ± 0.154 مغ EAG / غ ، هذه القيم أقل مقارنة بتلك الموجودة في مركبات الفلافونويد والتي تبلغ 5.77 ± 0.491 ، 15.082 ± 1.464 و 4.631 ± 0.436 مغ ECAT / غ على التوالي للحاء والأوراق والبذور. أظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة بواسطة طريقة DPPH وجود قدرات مضادة للأكسدة في جميع المستخلصات حيث أظهر اللحاء والبذور تأثير الكسح الأكثر أهمية بين المستخلصات مقابل DPPH حتى 84.2% ، 86.94% لتركيز 14.127 مغ / مل و 14.308 مغ / مل على التوالي .

الكلمات المفتاحية : شوكية الحمضيات ، الزيت العطري ، المستخلصات الخام ، المركبات الفينولية ، النشاط المضاد DPPH.