

---

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique  
Centre Universitaire Belhadj Bouchaïb d'Aïn-Témouchent



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 :

Melle.HADJ MOHAMED Rawnak

Melle .BENAMMAR Imene

---

### **Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles des pépins de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*.**

---

Encadrant : Mme BRIXI GORMAT Nassima  
Maitre de conférences "B" à C.U.B.B.A.T.

**Soutenu le : 27 juin 2019**

**Devant le jury composé de :**

---

|                                      |         |             |
|--------------------------------------|---------|-------------|
| Président : M.BENNABI Farid          | « MCB » | C.U.B.B.A.T |
| Examineur : M. SGHIR Abdelfattah     | « MCA » | C.U.B.B.A.T |
| Encadrant : Mme BRIXI GORMAT Nassima | « MCB » | C.U.B.B.A.T |

---

**Année universitaire 2018/2019**

## REMERCIEMENTS

*En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu tout puissant de nous avoir donné courage, volonté et patience pour accomplir ce modeste travail.*

Nous voudrions tout d'abord remercier Dr BRIXI GORMAT-BENMANSOUR Nassima, Maître de conférences classe B au centre universitaire d'Ain Témouchent pour avoir accepté de nous encadrer, pour son orientation et les conseils qu'elle nous a prodigué tout au long de ce travail.

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

Dr. BENNABI Farid, Maître de conférences classe B au centre universitaire d'Ain Témouchent qui nous a fait l'honneur de présider le jury.

Dr.SGHIR Abdelfatteh, Maître de conférences classe A au centre universitaire d'Ain Témouchent d'avoir accepté d'examiner notre travail.

A travers ce modeste travail, on tient à remercier l'ensemble des enseignants qui ont contribué de près ou de loin à notre formation, qu'ils retrouvent à travers ces lignes l'expression notre grande reconnaissance.

Merci également 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.

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail :*

*A Ceux qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très fière de les avoir ou tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur port « mes très chers parents», Je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, pour leur soutient morale et financier, pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris afin de me voir réussir.*

*Que dieu leur procure bonne santé et long vie.*

*A ma Sœur Hadil et Mon frère Mohamed Nadir, que j'adore et je leur souhaite la réussite dans leur vie.*

*A mes grands parents.*

*A mes très chers oncles et tantes sans oubliés BOUSSIF(MOHAMED) que Dieu l'accueil en son vaste paradis.*

*A mes cousins et cousines.*

*Chaleureusement, je dédie ce travail à mon binôme Imene, avec qui j'ai passé des moments inoubliables ainsi qu'à sa famille.*

# Rawnak

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail :*

*Aux êtres les plus chers aux monde « Mes parents» : Je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, pour leur présence permanente, leur affection, leur disponibilité et pour tout le mal qu'ils se donnent pour moi.*

*Que dieu leur procure bonne santé et long vie.*

*A mes Sœurs Yousra et Bessma Nada Yassmine, et mon frère Yassine, que j'adore et je leur souhaite la réussite dans leur vie.*

*A mes grands parents spécialement à ma chere (BEKHTA) que Dieu l'accueil en son vaste paradis*

*A mes oncles et tantes et mes cousins et cousines (Houda ;khouloud ;kawthar et Ahlem).*

*A mon cher fiancé Kadda.*

*Chaleureusement, je dédie ce travail à mes copines RAWNAK et HAYET, avec qui j'ai passé des moments inoubliables ainsi que leurs familles.*

IMENE

**Liste des tableaux**

**Liste des figures**

**Liste des abréviations**

**Introduction .....1**

**Synthèse bibliographique**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. Les agrumes (<i>Citrus aurantium et Citrus reticulata</i>) :</b> | <b>3</b>  |
| I.1 Origine et histoire des agrumes :                                  | 3         |
| I.2 Production des agrumes dans le monde et en Algérie :               | 4         |
| I.3 Classification botanique des <i>Citrus</i> :                       | 5         |
| 1.4. L'espèce <i>Citrus aurantium</i> (Bigarade) :                     | 5         |
| 1.4.1. Description et identification botanique :                       | 5         |
| 1.4.2. Utilisation et effets thérapeutiques :                          | 7         |
| I.5 L'espèce <i>Citrus réticulata</i> (mandarine) :                    | 8         |
| I.5.1 Description et identification botanique :                        | 8         |
| 1.5.2. Utilisation et effets thérapeutiques :                          | 10        |
| <b>II Les huiles végétales :</b>                                       | <b>10</b> |
| II.1 Méthodes d'extractions des huiles végétales :                     | 11        |
| II.2 La Composition des l'huiles végétales :                           | 11        |
| <b>III. Les activités biologiques :</b>                                | <b>12</b> |
| III.1. Activité antioxydante :   | 12        |
| III.1.1 Les antioxydants naturels:                                     | 13        |
| 1) Les composés phénoliques :  | 13        |
| 1.1 Les acides phénoliques :   | 14        |
| 1.2 Les flavonoïdes :  | 15        |
| 1.3 Les caroténoïdes :   | 17        |
| 1.4 La vitamine C :  | 18        |

|   |    |
|---|----|
| 1.5 La vitamine E : Tocophérols et tocotriénols ..... | 18 |
| III.1.2 Les antioxydants synthétiques: .....          | 19 |
| III.2 Activité antimicrobienne :.....                 | 19 |

### **Partie expérimentale**

|   |    |
|---|----|
| I. Lieu de l'étude : .....  | 21 |
| II. Matériel végétal : .....  | 21 |
| 1. Echantillonnage : .....  | 21 |
| 2. Traitement des échantillons : .....  | 21 |
| 3. Extraction des l'huiles : .....  | 21 |
| 4. Détermination des indices physicochimiques des huiles étudiées :.....                | 23 |
| 4.1. L'indice d'acide : .....   | 23 |
| 4.2 L'indice de densité $d_{20}$ :.....   | 24 |
| 4.3 Indice de saponification : .....  | 25 |
| 4.4 Indice d'ester :.....   | 26 |
| 4.5 Indice de réfraction (Ndt) :.....   | 27 |
| III. Dosages des métabolites secondaires :.....   | 28 |
| III.1 Dosage des polyphénols totaux (réactif de Folin Ciocalteu) : .....                | 28 |
| III.2 Dosage des Flavonoïdes :.....   | 29 |
| IV. Tests des activités biologiques :.....  | 30 |
| IV.1 Evaluation de l'activité antioxydante :.....                                       | 30 |
| IV.1.1 Evaluation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH :... | 30 |
| IV.1.2 Test du blanchissement du $\beta$ -carotène : .....                              | 31 |
| IV.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne : .....                                   | 33 |

### **Résultats et discussion**

|   |    |
|---|----|
| 1. Rendement des huiles après extraction :.....                               | 36 |
| 2. Valeurs des indices physico-chimiques de l'huile de pépins d'oranges ..... | 37 |
| ( <i>C aurantium</i> et <i>C réticulata</i> ) :.....                          | 37 |

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| 3.                                       | Dosages des métabolites secondaires :.....                                     | 41        |
| 3.1.                                     | Teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) :.....                            | 41        |
| 3.2.                                     | Teneurs en flavonoïdes : .....   | 43        |
| 4  | L'évaluation de l'activité antioxydante : .....                                | 45        |
| 1.1                                      | Piégeage du radical libre DPPH :.....  | 45        |
| 1.2                                      | Test du blanchissement du $\beta$ -carotène : .....                            | 48        |
| 5  | Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles de pépins d'oranges: ..... | 51        |
| <b>Conclusion et perspectives.....</b>   |  | <b>54</b> |
| <b>Références bibliographiques .....</b> |  | <b>56</b> |
| <b>Annexes .....</b>                     |  | <b>73</b> |
| <b>Résumé</b>                            |  |           |

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1:</b> Origine de quelques espèces de <i>Citrus</i> ( Gmitter et <i>al.</i> ,2007) .....     | 4  |
| <b>Tableau 2:</b> Les caractéristiques du bigaradier.....   | 6  |
| <b>Tableau 3:</b> Les caractéristiques du mandarinier.....  | 9  |
| <b>Tableau 4:</b> Composition en acides gras de l'huile de pépins de <i>Citrus aurantium</i> et de..... | 12 |
| <b>Tableau 5:</b> Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens .....                         | 20 |
| <b>Tableau 6:</b> Rendement d'extraction des huiles fixes de deux variétés de <i>Citrus</i> :.....      | 36 |
| <b>Tableau 7:</b> Valeurs des indices physico-chimiques des huiles de pépins .....                      | 38 |

### ANNEXES:

|   |    |
|---|----|
| <b>Annexe 1:</b> Dosages des polyphénols et des flavonoïdes des huiles de <i>Citrus aurantium</i> et <i>C. reticulata</i> .....                             | 73 |
| <b>Annexe 2:</b> la gamme d'étalonnage d'acide gallique.....  | 73 |
| <b>Annexe 3:</b> La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....  | 73 |
| <b>Annexe 4:</b> La gamme d'étalonnage du Catéchine.....  | 74 |
| <b>Annexe 5:</b> La courbe d'étalonnage du Catéchine.....   | 74 |
| <b>Annexe 6 :</b> 50% d'inhibition du radical libre DPPH et $\beta$ carotène des huiles des pépins du <i>Citrus aurantium</i> et <i>C. reticulata</i> ..... | 74 |
| <b>Annexe 7:</b> La gamme d'étalonnage du ButhylHydroxyToluène.....   | 75 |
| <b>Annexe 8:</b> Pourcentage d'inhibition du radical DPPH du BHT.....   | 75 |
| <b>Annexe 9:</b> Pourcentage d'inhibition du test du blanchiment du $\beta$ carotène d'antioxydant synthétique BHT.....                                     | 76 |

## Liste des Figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Fruits du Bigaradier .....  | 6  |
| <b>Figure 2</b> : Les fruits et les feuilles de la mandarine (Lim, 2012) .....  | 8  |
| <b>Figure 3</b> : Structure de quelques acides phénoliques (Wang et <i>al.</i> , 2007). .....   | 15 |
| <b>Figure 4</b> : Structure chimique des 5 flavonoïdes d'agrumes (Sun et <i>al.</i> , 2010). .....  | 16 |
| <b>Figure 5</b> : Structure de la $\beta$ –carotène (Léger, 2006) . .....   | 17 |
| <b>Figure 6</b> : Structure générale d'un tocophérol.....   | 18 |
| <b>Figure 7</b> : Extracteur Soxhlet.....   | 22 |
| <b>Figure 8</b> : Evaporateur rotatif sous vide (photo Originale, 2019). .....  | 23 |
| <b>Figure 9</b> : Montage saponification (photos Originale ,2019). .....  | 26 |
| <b>Figure 10</b> : Réfractomètre (photo originale, 2019). .....   | 27 |
| <b>Figure 11</b> : réaction de réduction de DPPH.....   | 30 |
| <b>Figure 12</b> : Teneur en composés phénoliques de l'huile de pépins.....   | 43 |
| <b>Figure 13</b> : Teneur en flavonoïdes de l'huile de pépins des oranges<br>( <i>C.aurantium</i> , <i>C.réticulata</i> ).....                                  | 45 |
| <b>Figure 14</b> : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des huiles des pépins de <i>Citrus<br/>aurantium</i> et <i>Citrus réticulata</i> . .....            | 47 |
| Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des huiles des pépins de<br><i>C.aurantium</i> et <i>C.réticulata</i> ainsi que le standard BHT..... | 47 |
| <b>Figure 16</b> : Pourcentage d'inhibition du test du blanchissement du $\beta$ -carotène des huiles des<br>pépins de <i>Citrus aurantium</i> . .....          | 50 |
| <b>Figure 17</b> : Pourcentage d'inhibition du test du blanchiment du <i>B</i> -carotène des huiles des<br>pépins de <i>Citrus réticulata</i> .....             | 50 |
| <b>Figure 18</b> : IC50 du test du blanchiment du <i>B</i> -carotène des huiles des pépins de <i>Citrus<br/>aurantium</i> et <i>Citrus réticulata</i> .....     | 51 |
| <b>Figure 19</b> :résultats de la méthode de diffusion des disques .....  | 53 |

## Liste des abréviations

AGE : acide gras essentiel

AGIS : acide gras insaturé

AGMI : acide gras mono insaturé

AGPI : acide gras polyinsaturé

AGS : acides gras saturé

ATCC: American type of culture collection

ATP: Adenosin triphosphate

BHA: hydroxyanisol butyle

BHIB: Breat Heart Infusion Bouillon

BHT: butylhydroxytoluène

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

E C : Equivalent catéchine

IC50 : Concentration correspondante à 50% d'inhibition

PDA: Potatoes Dextroes Agar

QE: Quercitine

RNS : espèces réactives de l'azote

ROS : espèces réactives de l'oxygène

TBHQ : Tertbutylhydroquinone

# Introduction

Au cours de la dernière décennie, la médecine préventive a considérablement progressé. Les recherches ont démontré que le rôle essentiel de l'alimentation est de fournir des substances nutritives nécessaires pour couvrir les besoins nutritionnels d'un individu qui contribue à la prévention des maladies chroniques (Lobo et *al.*, 2010 ; Bouyahya A, 2016).

Un grand nombre d'études scientifiques ont été menées pour découvrir les propriétés fonctionnelles des composés d'origine végétale, antioxydants ou autres, qui pourraient être efficaces pour la santé (Tumbas et *al.*, 2010).

Les polyphénols sont particulièrement intéressants et sont actuellement considérés comme des alicaments de part leurs propriétés antioxydantes. Il a été montré *in vitro* que les polyphénols avaient des effets protecteurs sur des modèles de stress oxydatif (Scalbert et *al.*, 2000).

Cependant, des recherches récentes ont montré que les sous-produits d'agrumes sont prometteurs dans l'industrie alimentaire en tant que sources de composés bioactifs ; représentant ainsi un excellent candidat pour les nutraceutiques et les aliments fonctionnels destinés à réduire ou empêcher les maladies causées par le stress oxydatif (Rafiq et *al.*, 2016).

De plus, les graines d'agrumes restent en grande partie non utilisées, elles deviennent une source de pollution environnementale. Ainsi, de nouveaux aspects concernant l'utilisation de ces sous-produits comme additifs alimentaires ou comme suppléments à haute valeur nutritionnelle ont suscité un grand intérêt. Ceci, nous a porté sur la valorisation de ces sous produits qui passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles végétales qui sont importantes dans divers utilisations.

A cet égard, Nous nous sommes intéressés à l'huile de pépins de deux variétés d'oranges (*Citrus aurantium* et *Citrus réticulata*), agrumes très utilisées en pharmacopée traditionnelle, pour ses vertus thérapeutiques. Malgré leurs importances biologiques et médicinales, ces espèces ont été très peu exploitées en Algérie.

De ce fait, l'objectif de notre travail porte tout d'abord sur la détermination des indices physicochimiques de l'huile du *Citrus aurantium* et *Citrus réticulata*, ainsi que leur compositions en métabolites secondaires notamment les polyphénols et les flavonoïdes.

Ensuite nous avons évalué l'activité biologique des deux huiles, à savoir leur activité anti-oxydante et antimicrobienne.

Pour cela notre travail est structuré comme suit :

- Une synthèse bibliographique comportant trois chapitres :

Un chapitre consacré à la présentation générale sur les agrumes, notamment nos espèces étudiées (*Citrus aurantium* et *Citrus réticulata*), un deuxième chapitre présentant les huiles végétales et un dernier chapitre concernant les activités biologiques (activité antioxydante et antimicrobienne).

- Une partie pratique consacrée à l'extraction des huiles des pépins de nos échantillons étudiés en utilisant un appareil Soxhlet à l'aide d'un solvant organique (le n- hexane), suivie d'un analyse chimique (détermination des indices physico-chimiques et dosage spectral des métabolites secondaires notamment les polyphénols totaux et les flavonoïdes), ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante et antimicrobienne.

- Une troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

- Ce travail se terminera par une conclusion et perspectives.

# Synthèse bibliographique

### **I. Les agrumes (*Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*) :**

#### **I.1 Origine et histoire des agrumes :**

Le terme agrume (*Citrus*) provient du latin « acrumen » qui signifie dans l'antiquité des arbres à fruits acides, les agrumes englobent plusieurs variétés (Ladaniya, 2008 ; Khan et *al.*, 2010), ils sont originaires d'Asie tropicale et subtropicale (Aubert et *al.*, 1997).

L'histoire de leur domestication et de leur culture remonte jusqu'à 2100 avant JC (Gmitter et *al.*, 2007) ; La diffusion des agrumes à travers le monde s'est faite très lentement. Le bigaradier, le citronnier et l'oranger ont été introduits dans le bassin méditerranéen vers la moitié du XIIe siècle, et le mandarinier au XIXe siècle. L'introduction des agrumes en Afrique de l'Est a été faite par les commerçants arabes et hindous vers le XIVe siècle (Loussert, 1989 ; Spiegel-Roy et *al.*, 1996).

En Algérie, la culture commerciale des agrumes est récemment développée, bien que la présence du bigaradier a été rapportée dans l'empire des almohades et embellit les jardins des Beys dans les Casbahs pendant l'occupation Ottomane ; par contre les orangers furent sans doute introduits d'Andalousie quelques siècles après (Mutin, 1969 ). Puis au début de la colonisation en 1850, le Mandarinier fut introduit en Algérie par M. Hardy. Au dix-neuvième siècle le père Clément de l'Orphelinat agricole de Misserghin (W. d'Oran), effectuant un croisement de Mandarinier avec l'Oranger découvrit la Clémentine qui s'est avérée une variété précoce parmi le groupe des mandarines. Cette variété a été lancée et développée en verger de production dont actuellement plusieurs variétés et clones sont issus et commercialisés à travers le monde (Hadj Saharaoui, 2007) (Tableau 1).

**Tableau 1 :** Origine de quelques espèces de *Citrus* ( Gmitter et *al.*,2007)

| Agrumes             | Nom Scientifique            | Origine           |
|---------------------|-----------------------------|-------------------|
| Citron              | <i>Citrus medica</i>        | Inde et Chine     |
| Mandarine tangerine | <i>Citrus reticulata</i>    | Sud-est Asiatique |
| Lime                | <i>Citrus aurantiifolia</i> | Est d'Inde        |
| Orange amer         | <i>Citrus aurantium</i>     | Chine             |
| Orange              | <i>Citrus sinensis</i>      | Chine             |
| Pamplemousse        | <i>Citrus grandis</i>       | Malaisie et Inde  |
| Pomelo              | <i>Citrus paradisi</i>      | Iles Barbade      |
| Clémentine          | <i>Citrus clementina</i>    | Algérie           |

## I.2 Production des agrumes dans le monde et en Algérie :

Cultivés à très grande échelle, les agrumes sont en tête des productions fruitières dans le monde. En 2012, la production mondiale a dépassé les 131 millions de tonnes (FAO, 2014). L'industrie de l'orange représente un chiffre d'affaire mondial de l'ordre de 2 milliards de dollars américains. Les premiers producteurs étant le Brésil et les États-Unis (Non déterminé, 2017).

En Algérie, la production d'agrumes est passée de 1 million de quintaux en 1962 à plus de 11 millions de quintaux en 2012. Faisant ainsi de notre pays le 19<sup>ème</sup> producteur d'agrumes au monde, et le 3<sup>ème</sup> dans l'Union du Maghreb arab (Lagha-Benamrouche et *al.*, 2013). La production nationale couvre 178 variétés d'agrumes dont la majeure partie est réalisée dans le centre du pays, notamment dans les vergers de la Mitidja, avec 5.323.165 quintaux, suivi par la wilaya de Chlef et de Mostaganem (Non déterminé, 2012).

A la fin de 20<sup>ème</sup> siècle, le secteur d'agrumiculture couvre une superficie de 45 040 hectares, ce qui représente 11 % de la surface cultivée dans le pays, constitué par diverses groupes d'agrumes spécialement les oranges (Washington navel, Thompson navel, Sanguinelli, Hamlin, Cadenera et Maltaise) (62,3 %) suivi des clémentines et mandarines (30,4%) et du citron. (6%) (Kerboua, 2002).

### I.3 Classification botanique des *Citrus* :

Le genre *Citrus* appartient à la famille des rutacées. Il renferme la plupart des agrumes cultivés pour leurs fruits. Ce genre est subdivisé en deux sous genres : *Eucitrus* et *Citrus Papeda*. Le sous genre *Papeda* regroupe des espèces aux fruits petits et très acides souvent non comestibles avec la présence de gouttelettes d'huile amère dans les vésicules de pulpe. Parmi ces espèces : *C.celebica* ; *C.macrophylla* ; *C.macroptera* ; *C. kerrii* ; *C. combara* ; *C.excelsa* ; *C. hystrix* et *C. micrantha*. Alors que le sous genre *Eucitrus* comprend des espèces de *Citrus* comestibles tels que : *C. aurantium*, *C. sinensis*, *C. clementina*, *C. reticulata* Blanco, *C. paradisi*, *C. limon*, *C. médca*, *C. aurantiifolia*, *C. grandis* (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   |
| Genre              | <i>Poncirus</i> , <i>Fortunella</i> , et <i>Citrus</i> |

### 1.4. L'espèce *Citrus aurantium* (Bigarade) :

#### 1.4.1. Description et identification botanique :

L'oranger bigaradier est un petit arbuste épineux, de croissance rapide, très décoratif de 4 à 5 m de haut, qui produit l'orange amère (la bigarade, tranj en arabe).

Elle se distingue des oranges douces par son fruit à peau plus épaisse et plus rugueuse et à pulpe acide et amère (Leroy, 1968).



**Figure 1 :** Fruits du Bigaradier

Les caractéristiques du bigaradier sont illustrées dans le Tableau 2 :

**Tableau 2 :** Les caractéristiques du bigaradier

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>Feuilles</b> | Ces feuilles vertes brillantes ont une odeur faible et une saveur amère, elles sont ovales, subaiguës au sommet, à pétiole articulé et plus ou moins ailée, elles mesurent environ 8cm de longueur et 4 cm de largeur.  |
| <b>Fleurs</b>   | Les fleurs pouvant atteindre 25mm, sont blanches et parfumées (Escartin, 2011), possèdent de 4 à 5 pétales imbriqués, et sont souvent recourbés vers l'arrière (Polese, 2008). Les fleurs poussent isolément ou en groupes, dispersées sur les branches. À la surface des feuilles, de très petites ouvertures appelées stomates sont facilement visibles.18-19(Khoury V <i>et al.</i> , 2006 de Moraes <i>et al.</i> , 2006)                 |
| <b>Fruits</b>   | Le fruit appelé « Bigarade » est ronds parfois ovalisant ou aplatis de couleur rouge, orange. Tient longtemps sur l'arbre sans perdre leur parfum, les fruits sont des oranges à jus très chargé d'acidité et d'amertume. Au moins de 15 à 20 pépins par fruit. La peau rugueuse plus au moins épaisse et piquetée. (Masaoudi, 2005).   |
| <b>Graines</b>  | Les graines sont de couleur blanchâtre à verdâtre pâle, aplaties et angulaires. Elles sont poly embryonnaires, ce qui signifie qu'elles ont plusieurs embryons qui peuvent germer. Les embryons sont soit Zygotiques, dérivent de la pollinisation de l'ovaire par reproduction sexuée, soit Nucellaire, provenant entièrement à partir de la plante mère et présentent des caractéristiques très similaires à la plante mère (Polese, 2008). |

- **Systematique du *Citrus aurantium* :**

La classification qu'occupe *Citrus aurantium* dans la systématique est la suivante :

**Systématique du *Citrus aurantium* :**

Règne..... Plantae  
Sous-règne..... Tracheobionta  
Division..... Magnoliophyta  
Classe..... Magnoliopsida  
Sous-classe..... Rosidae  
Ordre..... Sapindale  
Famille ..... Rutaceae  
Genre..... Citrus  
Espèce..... *Citrus aurantium*

### **1.4.2. Utilisation et effets thérapeutiques :**

L'orange amère est utilisée pour la fabrication de jus et des marmelades (confitures d'orange) (Ersus et *al.*, 2007). La saveur amère et aromatique de la pulpe ouvre l'appétit et facilite la digestion (Teuscher et *al.*, 2005).

Très parfumée, la fleur du bigaradier sert à la fabrication de l'eau de fleur d'oranger et de l'essence de néroli riche en terpènes est utilisée en parfumerie et pour aromatiser les aliments. Cet agrume est très prisé en phytothérapie, il est utilisé comme Sédatif, anxiolytique, hypotenseur, propriétés anticancéreuses, hypolipémiant, anti-inflammatoire, somnifère léger, spasmolytique, anti-infectieux léger, tonique digestif, hémostatique, grâce à sa composition en : flavonoïdes, synéphrine (alcaloïde qui stimule le système nerveux central), pectines, huiles essentielles, limonènes, coumarines, vitamine C et carotènes (Kim et *al.*,2003 ;Fugh-Beman et *al.*,2004 ;Morley et *al.*,2007 ;Espina et *al.*,2011).

### I.5 L'espèce *Citrus reticulata* (mandarine) :

Les mandarines, (youssufi ou menderine en arabe), *Citrus reticulata* Blanco (Rutaceae), sont parmi les agrumes les plus réputés pour leur consommation fraîche.

On les appelle parfois «tangerines », bien que «mandarine» soit le nom le plus courant. Il existe plusieurs variétés et hybrides de l'espèce mandarine (Njoroge et *al.*, 2006). Elle est largement cultivée dans les régions subtropicales. Elle est beaucoup plus résistante au froid que l'orange douce et l'arbre est plus tolérant à la sécheresse (Lim, 2012).

Les mandarines sont cultivées dans les pays méditerranéens, le Japon le Brésil, l'Argentine, les États-Unis et l'Australie. Les cultivars de mandarine présentent une grande diversité des caractères morphologiques et horticoles (forme, volume, couleur du fruit, adhérence de l'écorce) (Mukhtar et *al.*, 2005).



**Figure 2** : Les fruits et les feuilles de la mandarine (Lim, 2012)

#### I.5.1 Description et identification botanique :

C'est le groupe le plus important parmi les agrumes frais commercialisés, en raison de ses apparences attrayantes, son goût agréable avec la facilité d'épluchage. (Ladaniya, 2008).

Les caractéristiques de mandarinier sont illustrées dans le tableau 3 :

**Tableau 3 : Les caractéristiques du mandarinier**

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>Feuilles</b> | Ses feuilles sont lancéolées, persistantes et brillantes (Barbelet, 2015)  |
| <b>Fleurs</b>   | Il donne des fleurs blanches parfumées (Barbelet, 2015)  |
| <b>Fruits</b>   | La mandarine est un fruit d'environ 6,5 à 7,5 cm dont l'écorce est dans les couleurs vertes au moment de la récolte et développe la couleur orange pendant la phase de maturation (Ladaniya, 2011) Elle est de forme aplati (Dugo et <i>al.</i> , 2002),et composée de 9 à 12 quartiers juteux (Sawamura et <i>al.</i> ,2004). |
| <b>L'écorce</b> | L'écorce est d'épaisseur moyenne, non adhérente, surface relativement lisse, dans laquelle se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles (Bousbia, 2011)  |
| <b>Graines</b>  | la mandarine comporte de nombreux pépins (Barbelet, 2015)  |

La classification qu'occupe *Citrus reticulata* dans la systématique est la suivante :

• **Systématique du *Citrus reticulata* :**

Règne :..... Plantae

Sous-règne :..... Magnoliophyta

Classe : .....Magnoliopsida

Sous-classe : .....Rosidae

Ordre : .....Sapindales

Famille : .....Rutaceae

Genre : .....Citrus L.

Espèces : .....*Citrus reticulata* blanco (mandarines commune)

### 1.5.2. Utilisation et effets thérapeutiques :

Les fruits *Citrus reticulata* sont riches en flavonoïdes notamment la naringine, l'héspéridine, la didymine, la mandarétine et la nobilétine et sont utilisés en tant qu'ingrédients antioxydants fonctionnels pour le traitement de l'athérosclérose et du cancer, etc. (Sun *et al.*, 2010) et en tant qu'un anti-inflammatoire. Elle permet de stimuler le système immunitaire et lutter contre la fatigue comme les coups de froid hivernaux grâce à sa richesse en vitamine C (Lakshmi *et al.*, 2014).

La mandarine est excellente pour les os grâce aux caroténoïdes qui vont stimuler la production de cellules osseuses et stimuler l'absorption du calcium, Les écorces de fruits sont traditionnellement utilisées comme agents toniques, stomachaux, astringents, carminatifs et antiscorbutiques (Nakayama *et al.*, 2011).

La peau de *C. réticulata* peut être utilisée dans les formulations de soins de la peau antirides. (Apraj.*et al.*, 2016).

## II Les huiles végétales :

Les graines de plantes sont d'importantes sources d'huiles pour des applications nutritionnelles, industrielles et pharmaceutiques (Matthaus *et al.*, 2012), elles pourraient être utilisées avec succès dans l'extraction de l'huile et comme source de concentrés protéiques pour consommation humaine et comme source d'alimentation à haute teneur énergétique. Les graines peuvent également être utilisées comme engrais en raison de leur teneur élevée en minéraux et en azote. (Kamel *et al.*, 1982). Par exemple, les graines de *Citrus* constituent une bonne source de K, Ca, Na, Fe et de Mg. Elles contiennent de 26 à 42 % d'huile, qui présente des degrés élevés d'insaturation et d'acides gras essentiels, et 14% de protéines.

Les huiles possèdent également des antioxydants naturels, en particulier les tocophérols et les composés phénoliques. La stabilité oxydative et l'activité anti oxydante sont affectées par les acides gras insaturés et la teneur en tocophérol des huiles (Braverman,1949 ; El-Adawy *et al.*, 1999 ; Saïdani *et al.*, 2004 ; Malacrida *et al.*,2012).

### II.1 Méthodes d'extractions des huiles végétales :

L'extraction des huiles est une étape nécessaire qui est présente dans de nombreux procédés de fabrication et dans différents domaines industriels relevant de la pharmacie, de la cosmétique, de la parfumerie et de l'agroalimentaire (Chemat, 2011).

Les plantes oléagineuses sont riches en huiles végétales, ces derniers sont extraits de la plante à partir de deux organes principaux, les graines et les fruits (Rakotorimana, 2010). Afin de produire l'huile «finale», ces derniers subissent une préparation : les feuilles et les tiges sont retirées, les graines sont décortiquées et parfois chauffées légèrement.

Il existe différentes méthodes d'obtentions des huiles végétales :

- **L'extraction par pression**, qui est un procédé classique d'extraction d'huile végétale qui passe par les étapes suivantes : écraser grossièrement le matériau, le chauffer à la vapeur, le presser et le purifier par filtrage. L'huile obtenue est une huile très pure ne contenant aucune substance étrangère.
- **L'extraction par solvant**, qui nécessite l'utilisation d'un solvant organique, elle est destinée à dégraisser le résidu des graines broyées à l'aide d'un extracteur tel que le Soxhlet. Cette méthode est simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première (Penchev, 2010).

### II.2 La Composition des l'huiles végétales :

Les huiles végétales sont principalement composées de triglycérides (90 à 99 %) eux-mêmes essentiellement constitués d'acides gras (90 à 95 %) et de glycérol (3 à 5 %) et, de constituants mineurs naturels (1 à 5 %) regroupant des composés de structure variée tels que les stérols, tocophérols, caroténoïdes (0,1 à 0,2 %) (Pagès, 2008).

L'analyse des huiles de pépins des *Citrus* par chromatographie en couche mince a montré que ces huiles contenaient des hydrocarbures, triglycérides, acides gras libres, stérols, diglycérides, monoglycérides, alcool et phospholipides (El-Adawy et *al.*, 1999) (Tableau 4).

Cependant, les huiles de graines des *Citrus* sont riches en acides oléique et linoléique. Elles ont de bonnes propriétés de semi-séchage et pourraient être utilisées comme excellente huile de cuisine comestible, huile de salade ou pour la fabrication de la margarine (El-Adawy et al., 1999).

**Tableau 4 :** Composition en acides gras de l'huile de pépins de *Citrus aurantium* et de *Citrus reticulata* : (Malacrida et al.,2012 ; Brix Gormat et al.,2015).

| Acides gras             | <i>Citrus reticulata</i> | <i>Citrus aurantium</i> |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Acide palmitique C16 :0 | 23.34± 0.09              | 26,851                  |
| Acide stéarique C18 :0  | 5,26 ± 0.05              | 7,149                   |
| Acide oléique C18 :1    | 27.78± 0.02              | 27,703                  |
| Acide linoléique C18 :2 | 38.89± 0.06              | 38,295                  |
| AGS                     | 29.43                    | 34                      |
| AGIS                    | 70.57                    | 65,998                  |
| AGIS/ AGS               | 1/2,40                   | 1,941                   |
| AGMI                    | 28.33                    |                         |
| AGPI                    | 42.24                    |                         |
| AGE                     | 42.23                    |                         |

AGMI : acide gras mono insaturé, AGPI : acide gras polyinsaturé, AGE : acide gras essentiel

### III. Les activités biologiques :

#### III.1. Activité antioxydante :

L'être humain est un organisme aérobic, ce qui signifie que l'oxygène est un élément indispensable à la vie (Mohammed et al., 2004), dans certaines situations, à des effets néfastes sur le corps humain (Bagchi et al., 1998). Lorsque les cellules utilisent l'oxygène pour générer de l'énergie, des radicaux libres sont créés à la suite de la production d'ATP (adénosine triphosphate) par les mitochondries, Ces sous-produits sont généralement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que des espèces réactives de l'azote (RNS) résultant du processus d'oxydoréduction cellulaire.

Ces espèces jouent un double rôle en tant que composés toxiques et bénéfiques. L'équilibre entre leurs deux effets antagonistes est nécessaire au bon fonctionnement physiologique. À des niveaux faibles ou modérés, les ROS et les RNS exercent des effets bénéfiques sur les réponses cellulaires et la fonction immunitaire. À forte concentration, ils génèrent un stress oxydatif, un processus délétère qui peut endommager toutes les structures cellulaires (Halliwell B et *al.*, 2007 ; Young et *al.*, 2001). Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme (Packer et *al.*, 1999). Cependant, la recherche de composés naturels efficaces et non toxiques ayant une activité anti oxydante s'est intensifiée ces dernières années.

### **III.1.1 Les antioxydants naturels :**

Fournis par le biais d'aliments ou de suppléments, tels que la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique), les caroténoïdes, les oligo-métaux (sélénium, manganèse, zinc), les flavonoïdes, les omégas et les Acides gras 3 et oméga-6, etc (Pham-Huy et *al.*, 2008).

#### **1) Les composés phénoliques :**

Nommée aussi polyphénols, sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits et graines) (Boizot et *al.*, 2006), ils agissent en tant que terminateurs de radicaux libres (Shahidi et *al.*, 1992).

Plusieurs activités biologiques et propriétés bénéfiques ont été documentées pour les polyphénols tels que les propriétés anti-oxydantes, antiallergiques, anti-inflammatoires, antivirales, antimicrobiennes, anti –proliférantes, antimutagènes, anti cancérigène, piégeant les radicaux libres, régulation de l'arrêt du cycle cellulaire, de l'apoptose et de l'induction d'enzymes anti oxydantes ; modulation de certaines voies de signalisation cellulaires importantes telles que le facteur nucléaire kappa-B (NF- $\kappa$ B), la liaison à l'ADN de la protéine-activateur-1 (AP-1), etc (Han, X, et *al.*, 2007).

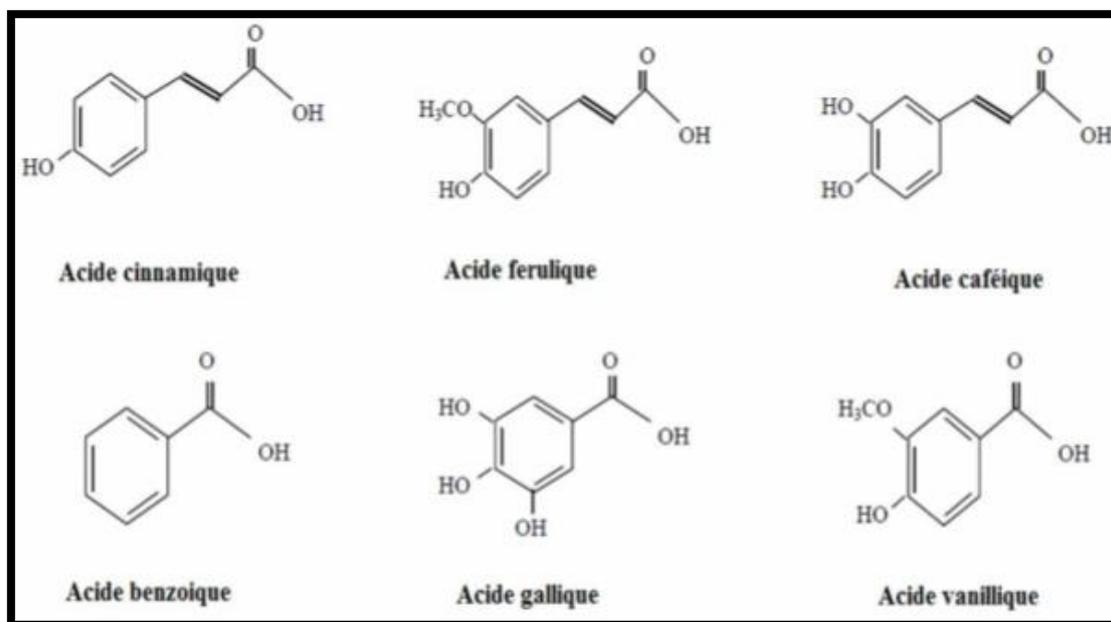
Les constituants phénoliques présents dans les espèces du genre *Citrus* sont importants, et diversifiés d'une variété d'orange à une autre. L'analyse par HPLC des flavonoïdes indique que les fruits des *Citrus* sont riches en flavonoïdes, ainsi que d'autres composés : acides organiques (acide citrique, malique, oxalique, caféique, férulique...etc.), et en composés bioactifs tels que limonoïdes, huiles essentiels, caroténoïdes, les polyphénols et d'autres micro-éléments (Oufedjikh et *al.*, 2000).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'unités phénoliques dans leur structure moléculaire (Masaki, 2010). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Richter, 1993 ; Brunton, 1999 ; Balasundram et *al* 2006) .

Les poly phénols peuvent être classés en plusieurs catégories en fonction du nombre de cycles phénoliques et d'éléments structurels liant ces cycles les uns aux autres. (Pietta P et *al.*, 2003 ). On distingue :

### **1.1 Les acides phénoliques :**

Les acides phénoliques représentent environ un tiers des composés polyphénoliques du régime alimentaire et comprennent deux classes principales de dérivés d'acide hydroxybenzoïque (acide protocatéchique, acide gallique, acide p-hydroxybenzoïque) et de dérivés d'acide hydroxycinnamique (acide caféique, acide chlorogénique, acide coumarique, acide coumarique, acide sinapique) ; les baies, le kiwi, les cerises, les pommes, les poires, les endives et le café sont les aliments riches en acides phénoliques (Manach et *al.*,2004).



**Figure 3 :** Structure de quelques acides phénoliques (Wang et *al.*, 2007).

### 1.2 Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont une famille de pigments jaunes polyphénoliques naturels ubiquitaires et présents en quantités substantielles dans les fruits, les légumes, les céréales, les noix, les graines, le thé et les herbes médicinales traditionnelles (Jeong et *al.*, 2009 ; Pacifico et *al.*, 2010 ; Kim et *al.*, 2012). Ce sont des pigments végétaux comestibles responsables d'une grande partie de la coloration dans la nature (Lee et *al.*, 2007 ; Shih et *al.*, 2009).

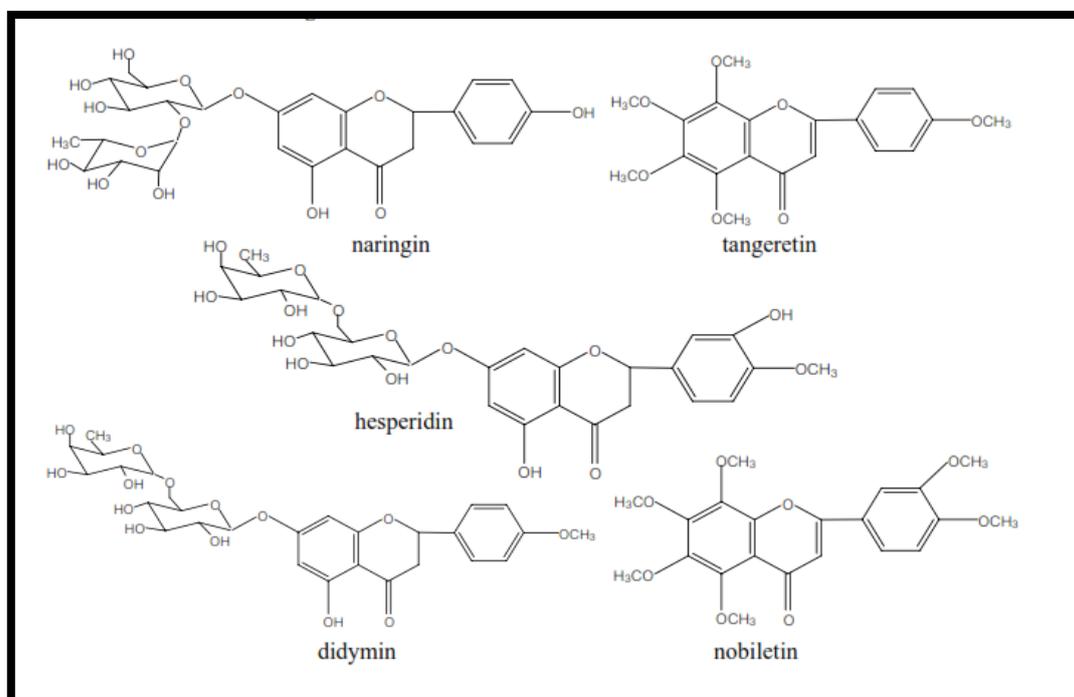
Selon la structure chimique, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés et classés en flavanols, flavanones, flavones, isoflavones, catéchines, anthocyanines, proanthocyanidines. Les effets bénéfiques des flavonoïdes sur la santé humaine résident principalement dans leur puissante activité antioxydante (Miller, 1996). Elles peuvent fonctionner comme des antioxydants directs et des capteurs de radicaux libres, et ont la capacité de moduler les activités enzymatiques et d'inhiber la prolifération cellulaire (Duthie et *al.*, 2000). Chez les plantes, ils semblent jouer un rôle défensif contre les agents pathogènes envahissants, notamment les bactéries, les champignons et les virus (Sohn et *al.*, 2004).

## Synthèse bibliographique

Les flavonoïdes d'agrumes comprennent une classe de glycosides, à savoir l'hespéridine et la naringine, et une autre classe d'O-méthylatedaglycones de flavones telles que la nobilétine et la tangerétine, qui sont relativement deux flavones polyméthoxylées communes présentes dans les pelures de mandarine, orange douce et orange amère (*Citrus aurantium*) (Li et al., 2014).

Un certain nombre d'études scientifiques a montré que le zeste de mandarine séchée représente une riche source de nombreux flavonoïdes, en particulier les glycosides de flavanone et les polyméthoxyflones, qui jouent un rôle important dans la protection contre les maladies comme le cancer, l'athérogénèse, (Tripoli et al., 2007 ; Benavente-Garcia et al., 2008) et les troubles de neuro-dégénérescence (Youdim et al., 2004 ; Hwang et al., 2012). L'hespéridine est le flavonoïde le plus prédominant dans les zestes de mandarine, suivie de la mandarétine et de la nobilétine (HO S C et al., 2014).

Les pépins du *Citrus aurantium* pourraient aussi être utilisées comme source potentielle de flavonoïdes (néohespéridine et la naringine) (Bocco et al., 1998 ; Moulehi et al., 2012). Ainsi que leur écorce qui est composée essentiellement de la cellulose, l'hémicellulose, substances pectiques, des pigments (flavonoïdes, anthocyanines et caroténoïdes) et des huiles essentielles (Lu et al., 2009).



**Figure 4 :** Structure chimique des 5 flavonoïdes d'agrumes (Sun et al., 2010).

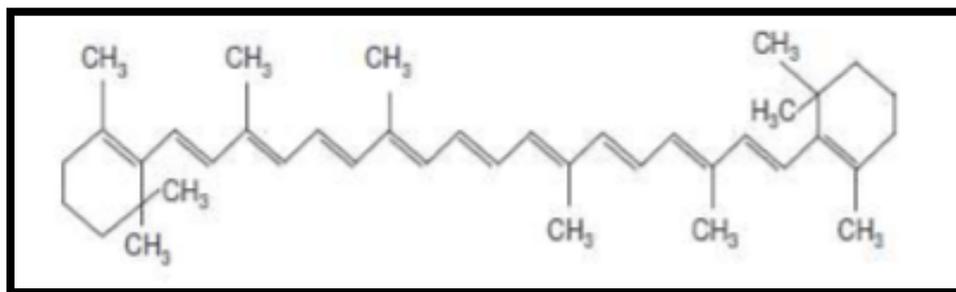
### 1.3 Les caroténoïdes :

Ce sont des pigments liposolubles, fortement insaturés d'origine végétale, largement distribués dans la nature, plus de 800 molécules ont été identifiées à ce jour (Fazel et al, 2008), ce pigment est présent dans de nombreux fruits, céréales, huiles et légumes (carottes, plantes vertes, courges, épinards) (Willcox JK et al., 2004).

Les caroténoïdes sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les oxo caroténoïdes (xanthophylles), qui diffèrent respectivement par l'absence ou la présence des fonctions hydroxyles (Stahl et al., 2003).

Cependant, le  $\beta$ -carotène ou provitamine A précurseur de la vitamine A, un membre liposoluble des caroténoïdes principalement présent dans l'orange possèdent des propriétés antioxydantes ; c'est-à-dire qu'ils sont capables de neutraliser les radicaux libres, peut également agir en tant que pro-oxydant, entraînant une augmentation de la peroxydation des lipides (Palozza et al., 2003). Le bêta-carotène est converti en rétinol, ce qui est essentiel pour la vision (Mayo Clinic Medical Information).

Les caroténoïdes sont composés d'un enchaînement d'unités isopréniques et un noyau cyclique porteur de diverses fonctions. Les caroténoïdes exercent leurs activités anti oxydantes à basse température en diminuant la réactivité de l'oxygène singulier et, comme des piègeurs des radicaux libres des acides gras ou des synergistes avec les tocophérols (Kamal-Eldin, 2005) (Figure 5)



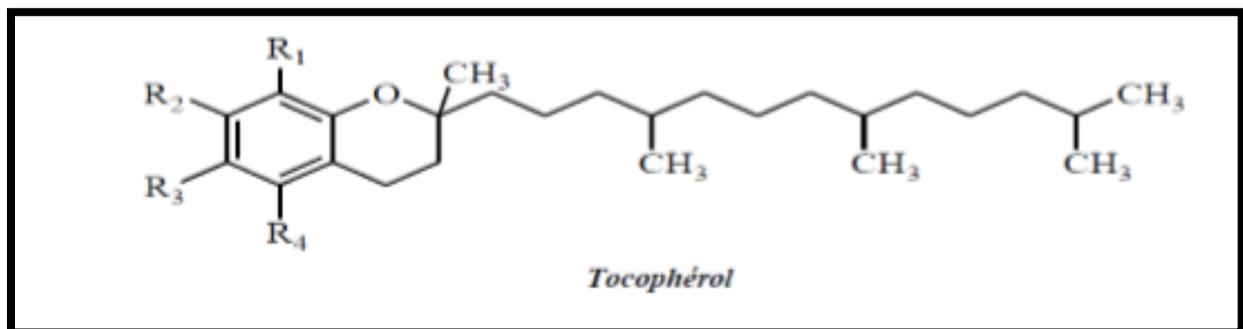
**Figure 5 :** Structure de la  $\beta$ -carotène (Léger, 2006) .

### 1.4 La vitamine C :

L'acide ascorbique ou «vitamine C» est un monosaccharide antioxydant que l'on trouve chez les animaux et chez les plantes. Comme il ne peut pas être synthétisé chez l'homme, il doit être obtenu à partir de son alimentation (Smirnoff , 2001).C'est un agent réducteur qui réduit et neutralise les ROS telles que le peroxyde d'hydrogène (Padayatty et *al* ., 2003).Les sources naturelles de vitamine C sont les fruits acides, les légumes verts et les tomates(Naidu , 2003).

### 1.5 La vitamine E : Tocophérols et tocotriénols

Il s'agit d'une vitamine liposoluble existant sous huit formes différentes. Chez l'homme, l' $\alpha$ -tocophérol est la forme la plus active et le principal antioxydant puissant lié à la contre la peroxydation des lipides (Pryor, 2000). Elle a également un effet protecteur contre la cancérogenèse en renforçant l'inhibition des substances mutagènes, la réparation des membranes et de l'ADN, la réponse aux lymphocytes T etc (Shklar et *al.*, 1988).(Figure 6)



**Figure 6 :** Structure générale d'un tocophérol.

Les huiles de graines des agrumes sont d'excellentes sources de vitamine E (tocophérols). Les tocophérols sont des antioxydants naturels ayant une activité biologique. La principale fonction biochimique des tocophérols est censée être la protection des acides gras polyinsaturés contre la peroxydation (Dompert et *al.*, 1976 ;Kamal-Eldin et *al.*, 1997).

### **III.1.2 Les antioxydants synthétiques :**

Parmi les antioxydants synthétiques utilisés en industrie alimentaire, le butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisole butyle (BHA), et le tertbutylhydroquinone (TBHQ). Ces derniers ont montré des effets nuisibles (effet carcinogène) de part leur toxicité élevée lorsqu'ils sont utilisés comme additifs alimentaires, ce qui a conduit à la recherche des sources naturelles d'antioxydants comme les plantes (Marongiu et *al.*, 2004 ; Japón-Luján et *al.*, 2008 ).

### **III.2 Activité antimicrobienne :**

Les bactéries ainsi que les infections fongiques constituent une grave menace pour l'humanité, et l'utilisation aveugle de médicaments antimicrobiens a provoqué une résistance des microbes (Khan et *al.*, 2009). Face à l'apparition de ces formes résistantes, la recherche de nouvelles molécules actives et à large spectre d'action est devenue une nécessité (Haddouchi et *al.*, 2013).

En effet les métabolites secondaires qui comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes ont une forte activité inhibitrice contre les microorganismes tels que les bactéries et les champignons (Anwar et *al.*, 2009).

Les caractéristiques antimicrobiennes de certaines classes de polyphénols ont été étudiées afin de développer de nouveaux traitements pour les différentes infections microbiennes (Jayaraman et *al.*, 2010 ; Saavedra et *al.*, 2010), causées par différents microorganismes tels que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (voir tableau 5).

**Tableau 5 : Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens**

| Micro-organismes              | Caractéristiques généraux :  |
|-------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i>       | <i>Escherichia coli</i> est une bactérie Gram négatif, de type anaérobie facultative ; elle colonise le tractus intestinal des mammifères (Drasar, 1974).  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | L'agent pathogène opportuniste humain <i>P. aeruginosa</i> est une bactérie à Gram négatif qui infecte les patients blessés, brûlés, immunodéficients qui cause un large éventail d'infections (Wood, 1976).   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | <i>Staphylococcus aureus</i> est une bactérie Gram positive anaérobie facultative. C'est une bactérie ubiquitaire qui colonise 20 à 30% de la population humaine (Van Belkum et al., 2009) est connu en tant qu'agent toxique alimentaire, ainsi qu'une cause fréquente d'infections, telles que les infections hospitalières graves résistantes aux antibiotiques (Farr et al., 2001).  |
| <i>Candida albicans</i>       | <p><i>Candida albicans</i> est l'agent pathogène fongique le plus répandu et est l'organisme responsable de la majorité des infections fongiques localisées chez l'homme (Beck-S et al., 1993 ; Dupont, 1995 ; McCullough et al., 1996).</p> <p>Peut être trouvé dans la cavité buccale et dans les voies digestives et vaginales, et est unique parmi les agents pathogènes opportunistes car il fait partie de la flore microbienne normale de l'hôte (Shepherd et al., 1986).</p> <p>Il a été démontré que <i>C. albicans</i> joue un rôle important dans la candidose orale, la stomatite des prothèses dentaires et la parodontite sévère (Fotos et al., 1992 ; McCullough et al., 1996).</p> |

# Partie expérimentale

## Partie expérimentale

---

### I. Lieu de l'étude :

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire pédagogique de biochimie du département de Biologie du Centre universitaire Université Belhadj Bouchaib d'Ain témouchent.

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

### II. Matériel végétal :

#### 1. Echantillonnage :

La récolte de la bigarade s'est faite manuellement dans la région d'Ain Témouchent du mois de Janvier au mois de Mars (2019) ; tandis que les fruits de mandarinier ont été achetés d'un marché local à Ain Témouchent durant le mois de Janvier. Les fruits étaient bien murs et ne présentaient aucun signe de blessure ou d'infection.

#### 2. Traitement des échantillons :

A fin d'extraire les pépins, la bigarade (*Citrus aurantium*) et la Mandarine (*Citrus reticulata*) ont été lavés puis épluchés, découpées en deux pour faciliter leur extraction. Les pépins ont été donc récoltés manuellement, ensuite lavés abondamment avec de l'eau du robinet et mis ensuite dans l'étuve ventilée à 40°C pendant 24 heures.

Les pépins séchés ont été ensuite broyés à l'aide d'un broyeur électrique afin de subir les différentes analyses phytochimiques.

#### 3. Extraction des l'huiles :

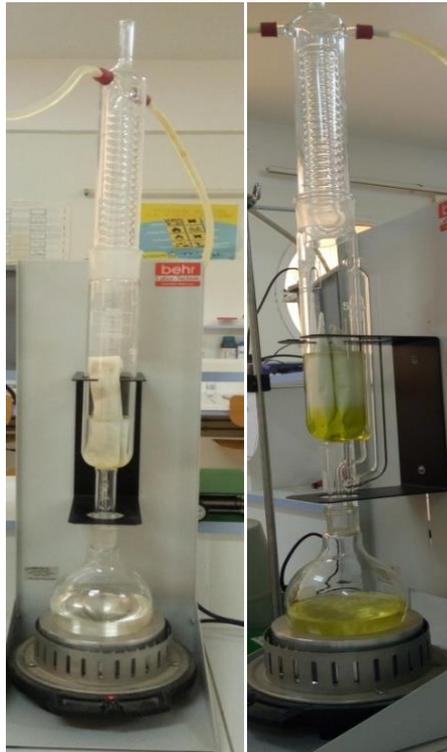
L'extraction des huiles fixes des pépins des deux espèces de *Citrus* (*C. aurantium* ; *C. reticulata*) a été effectuée en utilisant un appareil Soxhlet à l'aide d'un solvant organique (le n- hexane). Une quantité de 10 à 20 grammes de broyat de pépins séchés ont été placés dans une cartouche d'extraction et disposée dans l'appareil Soxhlet. La quantité du solvant ajouté est deux fois la capacité du réservoir à siphon d'extraction de l'appareil.

## Partie expérimentale

---

L'avantage dans ce procédé d'extraction est que le solvant condensé s'accumule dans le réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute (Haidara, 1996).

Ces extractions ont été faites pendant 6 heures avec plusieurs cycles afin d'extraire le maximum d'huile (Figure 7).



**Figure 7** : Extracteur Soxhlet.

Le solvant est ensuite évaporé dans un évaporateur rotatif sous vide *Stuart* (figure 8) et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la matière initiale après pesée d'un ballon préalablement taré.

Les huiles obtenues ont été conservées dans des flacons sombres à l'abri de la lumière afin d'éviter toute oxydation.



**Figure 8** : Evaporateur rotatif sous vide (photo Originale, 2019).

Les rendements en huile obtenus des deux espèces ont été calculés par la formule suivante :

$$R_{dt} = (m/m_0) \times 100$$

- **R<sub>dt</sub>** : Rendement (en %)
- **m** : Quantité en g de l'huile obtenue par extraction
- **m<sub>0</sub>** : Masse en grammes de la prise d'essai (les graines broyées)

#### 4. Détermination des indices physicochimiques des huiles étudiées :

##### 4.1. L'indice d'acide :

L'indice d'acide est défini comme étant le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser l'acidité d'un gramme d'huile (Pardo *et al.*, 2007).

Le principe de la méthode consiste en un titrage des acides gras libres présents par une solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium, selon la réaction suivante :



## Partie expérimentale

---

- **Mode opératoire :**

- ❖ Dissoudre une prise de 0.5g d'huile dans 20 ml d'éthanol à 96% ;
- ❖ ajouter 3 à 5 gouttes de phénolphtaléine à 1% ;
- ❖ À l'aide d'une burette, titrer les acides gras libres par une solution de KOH à 0,1 N
- ❖ noter le volume V versé à l'équivalence dès l'apparition de la couleur rose.

Un essai à blanc (contenant la même quantité que le solvant sans l'huile) est réalisé dans les mêmes conditions.

- **Expression des résultats :**

L'indice d'acide est donné par la formule suivante :

$$IA = (V1 - V0) \times M \times N \times f / m$$

V1 : volume en ml de potasse alcoolique utilisé pour neutraliser les acides libres de la prise d'essai.

V0 : volume en ml de potasse alcoolique utilisé pour le témoin.

M : masse molaire de KOH (56,11 g / mol).

N : normalité de la solution de potasse : 0,1N.

F : facteur de correction de la normalité de la solution de potasse.

M : masse de la prise d'essai.

### 4.2 L'indice de densité $d_{20}$ :

Cette méthode consiste à déterminer le rapport de la masse d'un volume donné d'huile à 20°C et la masse d'un volume égal d'eau distillée à la même température, en utilisant un pycnomètre muni d'un thermomètre gradué et étalonner à 20°C.

La densité relative  $d_{20}$  est donnée par la formule suivante :

$$d_{20} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)$$

**m0** : la masse du pycnomètre vide,

**m1** : la masse du pycnomètre rempli d'eau distillée,

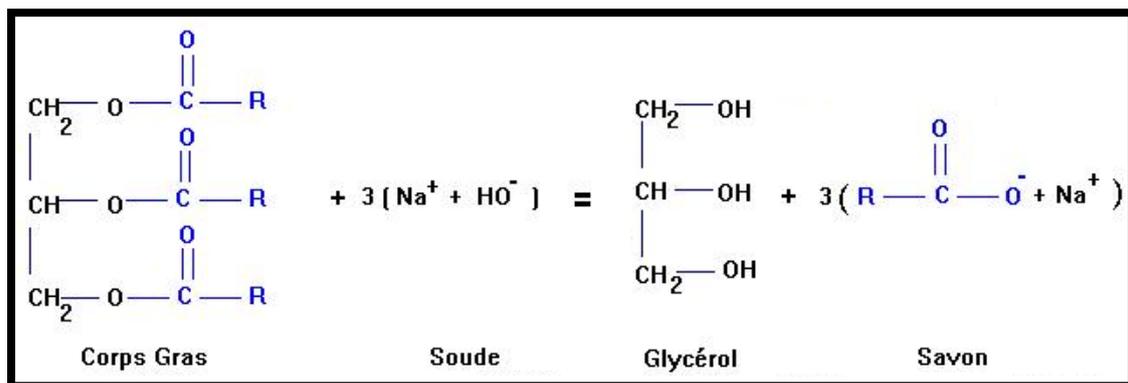
**m2** : la masse du pycnomètre rempli d'huile.

### 4.3 Indice de saponification :

L'indice de saponification ou *indice de Koettstoerfer* est la masse en milligrammes de Potasse nécessaires pour saponifier 1 g de corps gras. En effet, plus les molécules d'acides ont d'atomes de carbone, moins l'indice de saponification est élevé. Il rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras (Ollé, 2002 ; Salgarolo, 2003).

- **Principe :**

La saponification consiste à la décomposition des esters d'acides gras présents dans les triglycérides des huiles par l'action de NaOH ou de KOH (bases) suivie de la régénération du glycérol et de l'apparition d'un acide sous forme de sel, appelé savon selon la réaction suivante(R.2) :



- **Mode opératoire :**

- ❖ Introduire dans un ballon 1g d'huile et 25 ml de KOH éthylique de 0,5 mol/l ;
- ❖ porter le mélange à l'ébullition à reflux pendant 60 min (figure 9)
- ❖ laissé refroidir et ajouter 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine à 2% ;
- ❖ titrer le contenu du ballon par l'acide chlorhydrique de 0,5 mol/l ;
- ❖ agiter constamment jusqu'au virage à l'incolore de la phénolphtaléine ;
- ❖ déterminer le volume V1 de la neutralisation de l'échantillon ;
- ❖ réaliser un témoin (1 ml d'eau distillée+25 ml de KOH éthylique) dans les mêmes conditions de l'échantillon en déterminant le volume V0 du titrage.



**Figure 9 :** Montage saponification (photos Originale ,2019).

- **Expression des résultats :**

Calcul de l'indice de saponification IS (mg de KOH/g huile) :

$$IS = M_{KOH} \times (V_0 - V_1) \times C_{HCl} / m$$

$V_0$  : Volume de neutralisation de témoin en ml ;

$V_1$  : Volume de neutralisation de l'échantillon en ml ;

$C_{HCl}$  : concentration de la solution d'acide chlorhydrique en mol/l (0,5mol/ l) ;

$M_{KOH}$  : masse molaire du KOH en g/mol (56,1g/mol)

$m$  : masse d'huile pesée en g (1g).

#### 4.4 Indice d'ester :

L'indice d'ester (IE) est la quantité en milligrammes de KOH nécessaire à la saponification des glycérides présents dans 1 gramme de matière grasse. L'IE n'est pas mesurable. Il est calculé à partir des deux indices IS (indice de saponification) et IA (indice d'acidité). C'est la différence entre l'indice de saponification et l'indice d'acidité ( $IE = IS - IA$ ) (Selka et Tchouar , 2014).

### 4.5 Indice de réfraction (Ndt) :

L'indice de réfraction (Ndt) consiste à déterminer le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile à une température constante (20°C), en utilisant le réfractomètre. L'indice de réfraction est donné par la formule suivante :

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

$Nd_{20}$  : indice de réfraction à la température 20°C.

$n_{dt}$  : valeur de lecture à la température à laquelle a été effectuée la détermination.

T : la température à laquelle a été effectuée la détermination.



**Figure 10** : Réfractomètre (photo originale, 2019).

### III. Dosages des métabolites secondaires :

#### III.1 Dosage des polyphénols totaux (réactif de Folin Ciocalteu) :

Un dosage spectrophotométrique a été réalisé directement dans l'huile en utilisant la méthode de Singleton et Rossi (Singleton et *al.*, 1965), reporté par (Dogan et *al.*, 2005).

- **Principe :**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3Pm_{12}O_{40}P$ ) de couleur jaune. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans l'huile (Li et *al.*, 2007).

- **Mode opératoire :**

- ❖ Diluer une prise de 1g de chaque échantillon d'huile dans 5ml de méthanol ;
- ❖ prendre 125 $\mu$ l de chaque dilution d'échantillon ;
- ❖ ajouter 500 $\mu$ l d'eau distillée et 125 $\mu$ l du réactif de Folin-Ciocalteu 0,2 N ;
- ❖ agiter et laisser reposer pendant six minutes ;
- ❖ ajouter 1250 $\mu$ l de la solution de  $Na_2CO_3$  à 7% et 3ml d'eau distillée ;
- ❖ incuber le mélange dans l'obscurité pendant 90 minutes ;
- ❖ mesurer la densité optique de ces solutions avec un colorimètre à 760 nm contre un blanc.
- ❖ effectuer les mêmes opérations pour réaliser une gamme d'étalonnage utilisant l'acide gallique à des concentrations de 0,01 à 4 mg/ml.

- **Expression des résultats :**

Le taux des poly phénols totaux dans nos huiles a été calculé à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage ( $y = a x + b$ ) établie avec des concentrations précises d'acides gallique et exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'huile (mg EAG/ g H).

### III.2 Dosage des Flavonoïdes :

- **Principe :**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Zhishen et *al*, (1999) avec le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et le nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ces réactifs. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et le nitrite de sodium forme un complexe de couleur rose qui absorbe à 510 nm.

- **Mode opératoire :**

- ❖ Diluer 1g de chaque échantillon d'huile dans 5ml de méthanol ;
- ❖ Prendre 125  $\mu\text{l}$  de chaque dilution de l'huile ;
- ❖ additionner 75  $\mu\text{l}$  de nitrite de sodium  $\text{NaNO}_2$  à 7% ;
- ❖ incuber le mélange pendant 6 min à température ambiante ;
- ❖ ajouter 150  $\mu\text{l}$  de trichlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  à 10% ;
- ❖ laisser reposer 5min dans une température ambiante ;
- ❖ ajouter 500  $\mu\text{l}$  de soude  $\text{NaOH}$  à 1 M ;
- ❖ additionner 1525  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et agiter afin d'homogénéiser le contenu ;
- ❖ lire l'absorbance de la solution à 510 nm contre un blanc ;
- ❖ réaliser une gamme d'étalonnage en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à des concentrations de 0,01 à 2 mg/ml.

- **Expression des résultats :**

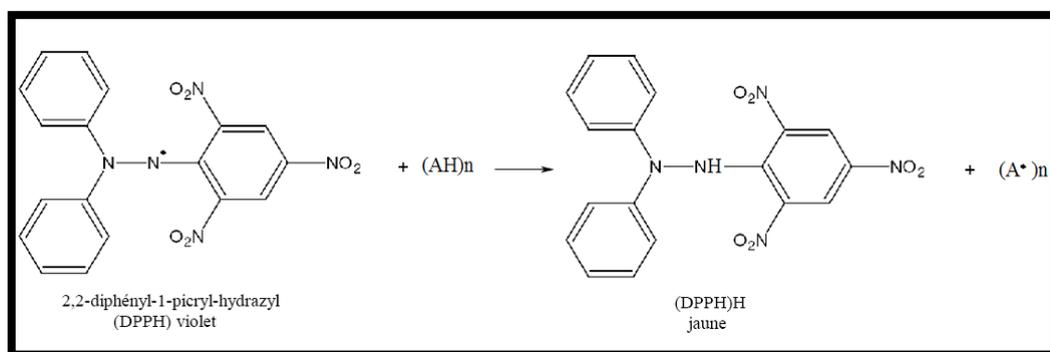
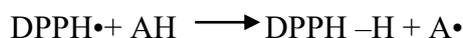
La teneur en flavonoïdes totaux des échantillons d'huile étudiés est exprimée en milligramme équivalent de la catéchine par gramme d'huile (mg EC/g H).

### IV. Tests des activités biologiques :

#### IV.1 Evaluation de l'activité antioxydante :

##### IV.1.1 Evaluation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH :

La méthode au DPPH (1,1-di-phényl-2-picrylhydrazyl radical) est utilisée pour déterminer la capacité des extraits à céder des protons et/ou des électrons. La réduction des radicaux DPPH• implique une baisse de l'absorbance. Sous la forme radicalaire, le DPPH• absorbe à 515 nm (Williams et *al.*, 1995).



**Figure 11** : réaction de réduction de DPPH.

- **Mode opératoire :**

Le protocole utilisé dans cette méthode est celui de Ramadan et *al.*, (2003). Il consiste à mélanger 200  $\mu\text{L}$  d'huile toluénique (100 mg d'huile + 100  $\mu\text{L}$  de toluène) avec 390  $\mu\text{L}$  d'une solution toluénique de DPPH à  $10^{-4}$  M. Un blanc est préparé (100  $\mu\text{L}$  d'huile à tester + 390  $\mu\text{L}$  de toluène) pour chaque test effectué. Le contrôle est préparé en parallèle, en mélangeant 100  $\mu\text{L}$  du toluène avec 390  $\mu\text{L}$  de DPPH toluénique.

La lecture des absorbances est effectuée à 515 nm au spectrophotomètre après 30 minutes dans l'obscurité et à température ambiante.

- **Expression des résultats :**

L'activité anti-radicalaire est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH est calculé par la formule suivante :

$$(\%) \text{ d'inhibition du DPPH} = (A_c - A_e / A_c) \times 100$$

**A<sub>c</sub>** : Absorbance du contrôle ;

**A<sub>e</sub>** : Absorbance de l'échantillon.

Les concentrations correspondant à 50% d'inhibition (EC50) ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations (Scherer et *al.*, 2009 ; Fabri et *al.*, 2009).

L'activité anti-radicalaire est comparée à celle du BHT (butylhydroxytoluène).

### IV.1.2 Test du blanchissement du $\beta$ -carotène :

Le  $\beta$ -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits. (Bougatef et *al.*, 2009).

L'évaluation de l'activité anti oxydante par le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène repose sur la mesure d'inhibition des composés organiques volatils, des hydroperoxydes et des diènes conjugués résultant de l'oxydation d'acide linoléique (Dapkevicius et *al.*, 1998). Cependant, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le  $\beta$ -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'**acide linoléique** dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du  **$\beta$ -carotène** (Unten et *al.*, 1997). La présence d'un antioxydant (extraits, témoins positif) permet de neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc la prévention de l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène. (Yanishlieva et *al.*, 1995 ; Belhattab, 2007 ; Yang et *al.*, 2008).

## Partie expérimentale

---

- **Mode opératoire :**

Le test de blanchiment de  $\beta$ -carotène utilisé pour évaluer l'activité anti oxydante des huiles des pépins des deux variétés d'orange est celui du Sun et Ho (2005).

Une émulsion est préparée en dissolvant 2 mg de  $\beta$ -carotène dans 10 ml de chloroforme, on prélève 1 ml de cette solution dans une fiole dans laquelle sont ajoutées 200 mg de Tween 80 et 20 $\mu$ l d'acide linoléique. Le tout est mis sous la haute jusqu'à évaporation du chloroforme. Un volume de 100 ml d'eau oxygénée diluée est ajouté dans la fiole et le mélange résultant est agité vigoureusement. Dans des tubes à vis, l'émulsion  $\beta$ -carotène/acide linoléique de 4 ml est additionnée à 200  $\mu$ l des dilutions (huiles +méthanol) de différentes concentrations. Un blanc est également préparé comme précédemment décrit sans le  $\beta$ -carotène. Le control négatif est constitué par 200  $\mu$ l de méthanol au lieu des dilutions (huile /méthanol). La mesure de l'absorbance à 470 nm est réalisée à t = 0 et à t = 120 min après incubation à 50°C au bain marie. L'activité anti oxydante des huiles est évaluée en termes de pourcentage d'inhibition de la dégradation du  $\beta$ -carotène selon la formule :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(A(120) - C(120)) / (C(0) - C(120))] \times 100$$

A (120) : représente l'absorbance en présence de l'extrait à 120 min.

C(120) : représente l'absorbance du contrôle à 120min.

C(0) : représente l'absorbance du contrôle à 0 min.

La valeur EC50 est définie comme la concentration des anti- oxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des huiles des pépins d'oranges.

### IV.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne des huiles des pépins des deux variétés de *Citrus* (*C. aurantium*, *C. réticulata*) a été testée sur des souches de référence type culture collection ATCC (American type of culture collection) qui ont toutes été fournis par le laboratoire de microbiologie du centre universitaire d'Ain Témouchent.

Gram négative : *Esherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Gram positive : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

*Candida albicans* ATCC 10231.

- **Conservation des souches :**

Les souches ont été conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

- **Les milieux de cultures :**

Selon la méthode et selon les souches nous avons utilisé les milieux de cultures suivants :

La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes ;

Le bouillon Breat Heart Infusion (BHI) pour la préparation des suspensions bactériennes,

La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux deux huiles des pépins de *Citrus*.

La gélose PDA pour l'étude de la sensibilité de souches fongiques aux deux huiles des pépins de *Citrus*.

- **antibiotiques :**

Les disques d'antibiotiques utilisés dans ce travail sont :

Gentamicine (10µg) et Ciprofloxacine (5µg)

- **Préparations et pré-cultures :**

Un inoculum de chaque souche-test d'une densité optique de 0,5 Mc Farland a été préparée à partir d'une culture pure et jeune (Âgée de 18 heures) avec de bouillon BHI. Cet inoculum ajusté devra contenir  $10^8$  UFC/ml (unité formant colonie/ml) et ne doit pas être utilisé au de la de 15 minutes. Il sert à ensemercer par écouvillonnage des géloses de Mueller Hinton (MH) coulées dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur d'environ de 4 mm (pour les souches bactériens) et la gélose PDA (pour la souche fongique).

- **Test antimicrobien :**

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des huiles des pépins de *C. aurantium* et *C. reticulata*, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé. Cette méthode suit le même principe de l'antibiogramme décrit par Kirby-Bauer (1960) et standardisée par le comité national des normes pour laboratoires cliniques (NCCLS, 1999 ;Prescott et *al.*, 2003), elle repose sur l'apparition des zones d'inhibitions autour des disques contenant l'huile à testée. La méthode de diffusion des disques comporte les étapes suivantes :

- ✓ **Préparation de l'inoculum :**

A partir d'une culture pure et jeune et à l'aide d'une anse de platine stérilisée, on prélève quelques colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 5 ml de bouillon BHIB. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures. (Souches bactériennes) et 30°C pendant 48h (souche fongique).

- ✓ **L'ensemencement :**

Après préparation et stérilisation du milieu Mueller Hinton ainsi que le milieu PDA, 20 ml de chaque milieux sont coulés dans des boîtes de pétri de 90mm de diamètre et l'épaisseur doit être impérativement de 4 mm à l'aide d'un écouvillon stérile les boîtes Pétri contenant les milieux Mueller Hinton stérilisé ainsi que PDA pour les bactéries et la levure respectivement ont été ensemencées par l'inoculum préparé d'une densité optique (DO) de 0,08 à 0,1 pour chaque souche. L'inoculum doit être bien étalé sur la surface du milieu dans la boîte Pétri, puis la boîte est retournée de 60° à chaque application.

## Partie expérimentale

---

### ✓ **Dépôt de disques :**

Des disques en papier filtre Whatman stériles de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l Et 20  $\mu$ l de chaque huile et sont appliqués sur le milieu Mueller Hinton et sur le milieu PDA.

Les disques témoins de ciprofloxacine à 5 $\mu$ g et de gentamycine à 120  $\mu$ g sont disposés sur la même boîte de pétri.

### ✓ **Incubation :**

Les boîtes Pétri sont incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les souches bactériennes et à 30°C pendant 48 heures pour la levure.

### ✓ **Lecture des résultats**

Après l'incubation des souches, la lecture est effectuée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque.

# Résultats et discussion

### 1. Rendement des huiles après extraction :

Les huiles des deux variétés d'oranges étudiées (*Citrus réticulata* et *Citrus aurantium*) ont été extraites des pépins par la méthode soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant. D'autres solvants d'extraction sont décrits dans la littérature tels que l'éther de pétrole et le chloroforme (Adrian et al., 1998). Cependant, l'hexane est parmi les solvants privilégiés pour l'extraction des graines oléagineuses aujourd'hui c'est le seul solvant employé industriellement pour l'extraction des huiles végétales grâce à ses propriétés apolaires qui lui confèrent une grande affinité pour les lipides. En outre, il présente l'avantage d'être très sélectif vis-à-vis des huiles et d'avoir une chaleur latente de vaporisation assez faible ce qui permet de l'évaporer facilement (Fine et al., 2013).

Le rendement des huiles des pépins du *Citrus aurantium*, et *Citrus réticulata*, exprimé en pourcentage de matière sèche, est représenté dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Rendement d'extraction des huiles fixes de deux variétés de *Citrus* :

| Type de <i>Citrus</i>             | <i>Citrus aurantium</i> | <i>Citrus réticulata</i> |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Rendement en huile (exprimé en %) | 38,21± 0,014            | 39,25± 0,07              |

Les graines sont connues par leur richesse en gras et leur pauvreté en eau. En effet, nos résultats montrent que les pépins de mandarine (*C. réticulata*) sont fortement riches en huile (39.25%), ces résultats sont supérieurs à ceux rapportés pour les pépins du *Citrus réticulata* italien (19%) (Rosa et al., 2019), les mandarines pakistanaises (31,15% et 28,5%) (Anwar Farooq et al., 2008 et Rashid et al., 2013) et les pépins de mandarine nigérienne (24,3%) (Ajewole et al., 1993) ; mais restent inférieurs à ceux trouvés par Malacrida et al., (2012) (pépins de mandarine brésilienne) qui est de 41,66%.

Concernant les teneurs en huiles du *C. aurantium*, nos résultats montrent un rendement de (38,21%) qui sont en accord avec ceux rapportées par Brix Gormat et *al.*,(2015) pour les pépins du *Citrus aurantium* Algérien (région de Tlemcen) (38,21%) ,mais reste supérieur par rapport aux pépins de du bigarade pakistanais (21,6%) (wahid Amran et *al.*, 2009) ; tandis que le rendement en huile des pépins de l'orange amère Turque (58,8%) (Matthaus et *al.*, 2012) reste supérieur à celui trouvé dans notre échantillon.

Cette différence de rendement des huiles des deux espèces *Citrus reticulata* et *Citrus aurantium* étudiées avec les huiles des mêmes espèces décrites par d'autres auteurs est probablement due à la technique d'extraction des huiles ; à l'origine géographique et de la zone de production de l'huile (climat, latitude) (Mohamed Mousa et *al.*, 1996 ; Abaza et *al.*,2002) ; Mais aussi à la période de récolte des agrumes, qui influence le rendement d'extraction (Telli et *al.*, 2010). Le mode de séchage des pépins est aussi un facteur influant la teneur en huile des graines car il est recommandé avant l'étape d'extraction puisqu'il entraîne l'inhibition des enzymes et permet une conservation de longue durée (Owen et Johns, 1999). Tous ces paramètres influent sur les teneurs des graines en huile ainsi que leur composition en acides gras.

### **2. . Valeurs des indices physico-chimiques de l'huile de pépins d'oranges (*C.aurantium* et *C. réticulata*) :**

Les analyses physico-chimiques (densité ; acidité, réfraction ; saponification ; estérification, peroxydation ...etc.) sont des paramètres plus faciles d'accès dont l'intérêt principal réside dans l'identification des propriétés physico-chimiques de l'huile étudiée. Les résultats des indices physico-chimiques des deux huiles choisies dans notre étude sont représentés dans le tableau 7.

**Tableau 7 :** Valeurs des indices physico-chimiques des huiles de pépins de Bigarade et de Mandarine.

| Indices physico-chimiques                   | <i>Citrus aurantium</i> | <i>Citrus réticulata</i> |
|---|-------------------------|--------------------------|
| Indice d'acide (mg de KOH/g huile)          | 1,12                    | 1,12                     |
| Indice de saponification (mg KOH/g d'huile) | 134,64± 1,09            | 280,5 ±0,60              |
| Indice de réfraction 20° c                  | 1,461 ±0,001            | 1,470 ±0,001             |
| Indice d'ester                              | 133,52                  | 279,38                   |
| Indice de densité (mg/ml)                   | 0,926 ± 0,02            | 0,927 ±0,03              |

### 2.1. L'indice d'acide :

L'indice d'acide est l'un des paramètres chimiques courants qui déterminent la qualité des graisses et de l'huile. Ce paramètre est une mesure des acides gras libres dans la graisse ou l'huile (El-Ananya et *al.*, 2018), considéré comme un excellent moyen pour déterminer son degré d'altération (Ollé, 2002).

L'indice d'acide des graisses et huiles vierges ne doit pas dépasser 4 mg KOH /g de graisse ou d'huile (Alimentarius, C. 1999). cependant, La détermination de l'indice d'acide des huiles extraites des deux variétés d'oranges a donné des valeurs identiques de 1,12 mg de KOH/g huile.

Par comparaison de l'indice d'acidité des huiles de pépins de bigarade et mandarine décrites par d'autres auteurs ; notre résultat est confirmé par celui de Brix Gormat et *al.*, (2015) ( 1,121) pour la bigarade de la région de Tlemcen) et El Adawy et *al.*, (1999) pour la mandarine égyptienne, nos valeurs se rapprochent de ceux de Anwar Farooq et *al.*, (2008) (1.30) et restent inférieures à celles trouvées par Ines El Mannoubi et *al.*, (2010) qui est de 2,74 pour la variété l'orange maltaise (*Citrus sinensis*) poussant en Tunisie, et supérieures de l'huile des pépins de mandarine égyptienne (0,53) rapporté par Metwally et *al.*, (1975).

### 2.2. L'indice de densité $d_{20}$ :

Cet indice est considéré comme un critère physique qui permet le contrôle de la pureté de l'huile extraite. Nous avons constaté que les valeurs d'indice de densité de l'huile de pépins de *C.aurantium* ainsi que de *C.réticulata* sont dans le même ordre (0,926 et 0,927 mg/ml) respectivement. Ces valeurs sont proches de celles de l'huile de tournesol (0,920) et de l'huile de lin (0,924-0,930) (Firestone, 1999).

### 2.3. L'indice de réfraction :

L'indice de réfraction est une propriété liée au degré d'insaturation, à la longueur de la chaîne d'acide gras et au degré de conjugaison. (Ali et *al.*, 2014), il augmente avec l'augmentation de l'insaturation et de la longueur de la chaîne d'acide gras.

Les mesures de cet indice permet de surveiller les processus impliquant une modification de la composition des graisses et des huiles (Sadrolhosseini et *al.*, 2011 ; Ismail et *al.*, 2015). Les huiles de pépins de bigarade et de mandarine présentent un indice de réfraction dans le même ordre de 1,461 et 1,470 respectivement.

L'indice de réfraction déterminé dans notre analyse est identique à celui trouvé par Brix Gormat et *al.*, (2015) (1,4671 pour l'huile de bigarade) et concorde avec celui rapporté par (Rossell and Pritchard, (1991) pour les huiles de graines de tournesol (1,467-1,469), du soja (1,467 à 1,470), et par Gharby et *al.*, (2015) pour l'huile de grains de nigelle ( $1,473 \pm 0,002$ ).

Ollé (2002) a proposé une classification des huiles en fonction de leur composition en acide gras majoritaire (acide oléique, acide linoléique, acide linoléique) et leur indice de réfraction :

- Huile riche en acide oléique  $1,468 < R < 1,472$
- Huiles riches en acide linoléique  $1,471 < R < 1,477$
- Huiles riches en acide linoléique  $1,480 < R < 1,523$

On peut donc prévoir de façon approximative que l'huile des pépins de mandarine ainsi de bigarade contiendrait majoritairement **l'acide oléique**.

D'après Brix Gormat et *al.*, (2015) ; la composition en acides gras de l'huile de pépins du *Citrus aurantium* analysée par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) présentait une teneur élevée (38,29%) en acide linoléique (C18 :2) suivie par l'acide oléique (C18 :1) le principal acides gras mono insaturé (AGMI), qui présente un taux de 27,70%.

Par contre ; selon Waheed et *al.*, (2009) les teneurs de l'acide oléique et de l'acide linoléique pour l'huile de pépins du *C. aurantium* pakistanaise sont de 30,87% et 22,03% respectivement.

### 2.4. L'indice de saponification :

La valeur de saponification indique la quantité d'unités saponifiables (groupes acyle) par unité de poids d'huile. Une valeur de saponification élevée indique une proportion plus élevée d'acides gras de faible poids moléculaire dans l'huile ou inversement (Diwakar et *al.* , 2010). L'indice de saponification est utilisé pour mesurer le poids moléculaire moyen en huile et exprimé en milligrammes d'hydroxyde de potassium (mg KOH /g huile).

L'indice de saponification de l'huile de nos échantillons, bigarade et mandarine est de 134,64 et 280,5 mg KOH /g huile respectivement.

On remarque que la valeur de l'indice de saponification de l'huile du *C.reticulata* est supérieure à celui de l'huile de *C. aurantium*, ce qui pourrait indiquer que l'huile de *C.reticulata* des acides gras à chaîne carbonée pas trop longues et vis- versa.

Nos résultats ne sont pas comparatives aux valeurs de saponification de l'huile de pépins d'agrumes égyptiens qui variaient entre 186,8 et 191,3 (Habib et *al.* ,1986 ; El-Adawy et *al.*,1999 ; El-Ananya et *al.*, 2018).

### 2.5. L'indice d'ester :

A partir d'indice d'acide (IA) et d'indice de saponification (IS) des huiles des pépins des échantillons d'oranges (Bigarade et Mandarine), nous avons calculé l'indice d'ester (IE) qui représente la différence entre les deux indices ( $IE = IS - IA$ ).

L'indice d'ester de nos huiles étudiées (*C. aurantium* et *C. reticulata*) de 133,52 et 279,38 respectivement.

Une huile qui présente un indice d'ester élevé est une huile dont le nombre de moles d'acides gras libres est élevé par rapport aux nombre de moles de triglycérides (Selka et Tchouar, 2014).

*Il ressort de l'analyse des indices physico-chimiques des huiles de pépins de Citrus aurantium et Citrus reticulata que ces ceux des huiles pures et riches en acides gras insaturés de chaîne moyenne.*

### 3. Dosages des métabolites secondaires :

Les différents dosages réalisés ont mis en évidence la présence de poly phénols totaux et de flavonoïdes dans les huiles de pépins des deux variétés d'oranges (*C. aurantium* et *C. reticulata*).

#### 3.1. Teneurs en composés phénoliques totaux (CPT) :

La concentration des polyphénols totaux est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li et al., 2007) à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme référence dont la quantité est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'huile de pépins d'oranges (mg EAG/ g huile). La gamme d'étalonnage d'acide gallique et présenté dans les Annexes 2 et 3.

## Résultats et discussion

---

L'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisée dans la gamme d'étalonnage avec un  $R^2$  de 0,964.

Les taux relatifs des polyphénols totaux dans l'huile du *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata* sont représentés dans la figure 12.

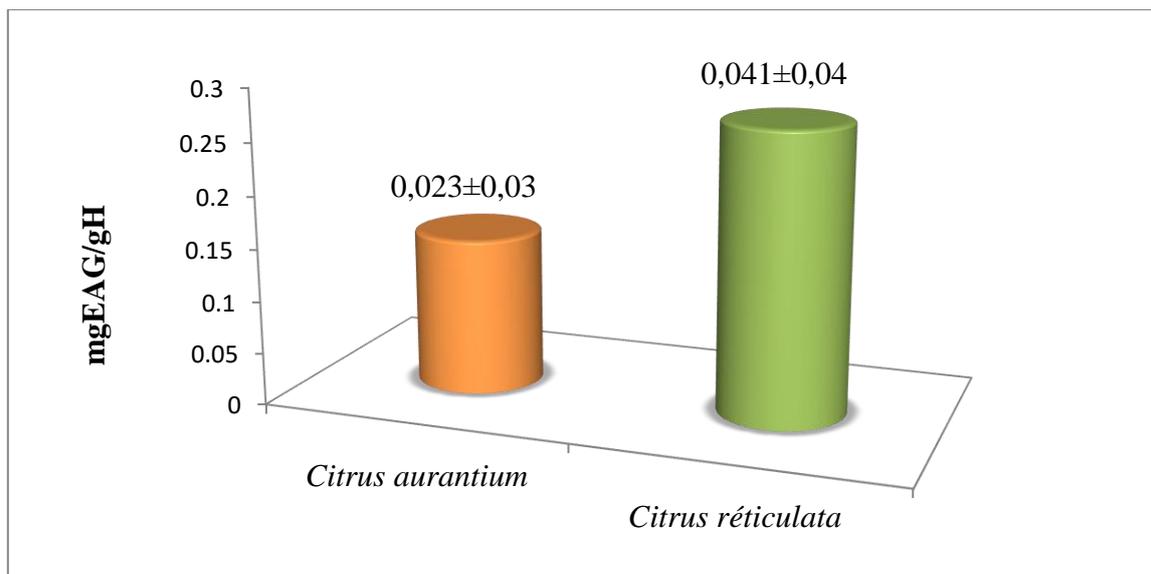
A l'issue des dosages effectués, il s'est avéré que les deux échantillons des huiles des pépins des oranges, bigarade et mandarine, étudiés renferment des teneurs faibles en composés phénoliques totaux  $0,023 \pm 0,03$  et  $0,041 \pm 0,04$  mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'huile respectivement.

La teneur en CPT de l'huile des pépins de mandarine de notre échantillon est inférieure à celle décrite par Rosa et *al.*, (2019) (0.41mg EAG/ g d'huile). De même, selon Inan *et al.*, (2017) l'huile de pépins de mandarine turque contient des teneurs en polyphénols allant de 0,233 mg d'EAG / g à 0,296 mg d'EAG / g d'huile de pépins.

Le taux infime obtenu en composés phénoliques des huiles des deux variétés des *Citrus* étudiées peut être expliquée par l'existence d'autres composées qui absorbent à la même longueur d'onde que les composés phénoliques (Solinas & Cichelli., 1981 ; Chimi et *al.*, 1990).

En plus, au cours de la procédure d'extraction, la qualité d'un extrait peut être influencée par plusieurs paramètres, à savoir la partie de la plante utilisée, la polarité du solvant, ainsi que le temps, la température et le mode d'extraction (Tiwari et *al.*, 2011)

De même, le degré de maturité du fruit influence fortement la concentration en polyphénols. En général, au cours de la maturation, la concentration en acides phénoliques diminue et celle en anthocyanes augmente (Nakbi et *al.*, 2010).



**Figure 12 :** Teneur en composés phénoliques de l'huile de pépins du *C.aurantium* et *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

### 3.2.Teneurs en flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent l'un des groupes les plus importants des phénols. Ces métabolites secondaires ont été quantifiés par une méthode adaptée par Zhishen et *al.*, (1999) avec le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et le nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ), dont la catéchine est prise comme flavonoïde témoin dans la gamme d'étalonnage présentée dans les Annexes 4 et 5.

Jung et *al.*, (2006) rapportent que les espèces d'agrumes notamment *Citrus aurantium* contiennent une large gamme d'ingrédients actifs tels que les limonoïdes et les flavonoïdes, tels que néohespéridine et la naringine (Moulehi et *al.*, 2012). Ces derniers peuvent présenter diverses activités biologiques comme antioxydant, anti-inflammatoire, anti-athérosclérose et anti-cancérigène (Aubret and Mireille, 2003, Kitts, 2005, Aggarwal et *al.*, 2010) à travers une variété de mécanismes (Manthey and Grohmann, 2001 ; Xiao et *al.*, 2011).

## Résultats et discussion

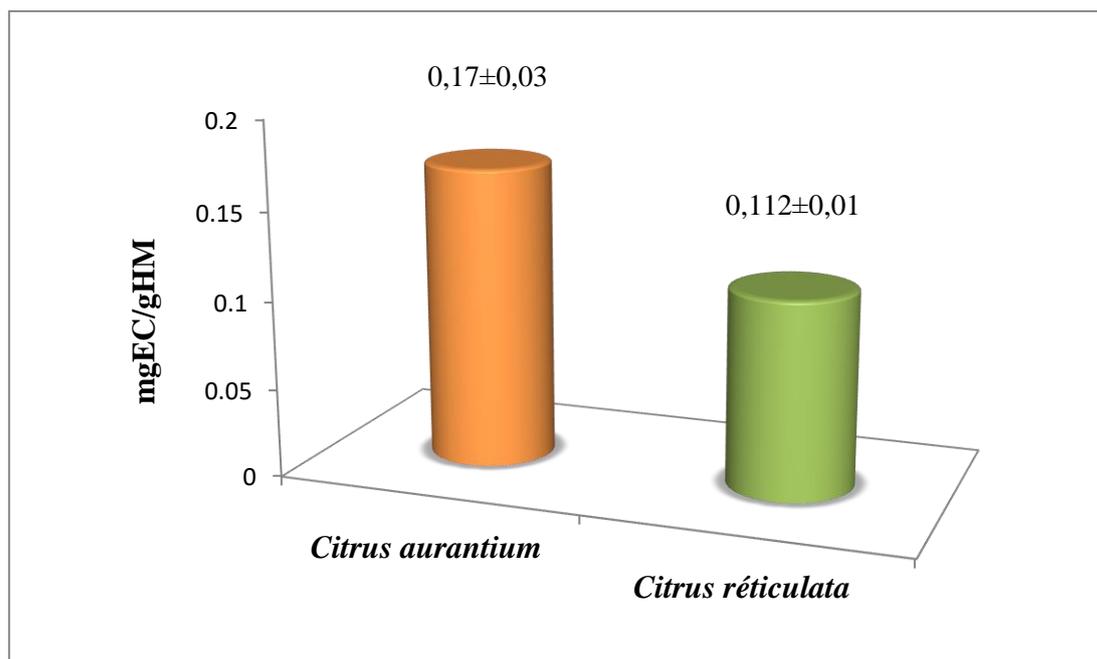
---

La figure 13 représente les teneurs en flavonoïdes des deux huiles étudiées. Les teneurs en flavonoïdes des deux huiles de pépins d'oranges (*Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*) étudiés sont estimées de  $0,170 \pm 0,03$  et  $0,112 \pm 0,01$  milligramme d'équivalent de catéchine par gramme d'huile de pépins d'oranges (mg EC/gH) respectivement.

Cependant, John Ndayishimiye et al., (2018), rapportent dans leur étude que les teneurs en flavonoïdes de l'huile de pépins du *Citrus junos* (Koréa) sont de l'ordre de 6,75 mg EQE/g d'huile, ce qui est largement supérieur par rapport à celles trouvées dans nos échantillons.

Par ailleurs, d'autres études ont trouvé que les teneurs des pépins du bigarade algérien en flavonoïdes étaient estimées à 0,043 mg CE/gMS (Brixi Gormat et al., 2015), et ceux des pépins tunisiens varient entre 1,31 et 1,50 mg CE/g MS (Moulehi et al., 2012). De même, Lagha-Benamrouche et al., (2013) qui ont étudié les écorces et les feuilles de la bigarade ont montré des valeurs largement supérieures que celles des pépins ( $31,62 \pm 0,88$  mg GAE /g MS,  $44,41 \pm 0,49$  mg GAE /g MS respectivement) (Lagha –Benamrouche and Madani ,2013).

En fait, cette variabilité de la teneur en flavonoïdes est largement dépendante de plusieurs facteurs tels que la partie de la plante étudiée, le degré de maturation (Boudhrioua et al., 2008), les conditions climatiques et géographiques (Mylonaki et al ., 2008), l'état physiologique et l'âge de la plante (De Leonardis et al., 2008).



**Figure 13 :** Teneur en flavonoïdes de l'huile de pépins des oranges (*C.aurantium*,*C.réticulata*).

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

#### 4 L'évaluation de l'activité antioxydante :

##### 1.1 Piégeage du radical libre DPPH :

La méthode par le DPPH a été choisie pour évaluer l'activité antioxydante de nos huiles parce qu'elle est l'une des méthodes la plus simple, rapide et efficace à cause de la grande stabilité du radical (Bozin et *al.*, 2008)

L'activité antioxydante des deux huiles de pépins d'orange (*C.réticulata*,*C.aurantium*) vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515 nm.

## Résultats et discussion

---

Les échantillons sont directement dilués dans le toluène. Après 30 mn d'incubation de la solution DPPH-huile (à différentes concentrations), la coloration violette vire vers une coloration jaune dans les deux huiles de pépins de *C.aurantium* et *C.reticulata*, ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH, ce qui montre que les échantillons ont un effet scavenger de radical DPPH.

D'après les résultats de la figure 14, l'activité anti radicalaire augmente avec l'augmentation des concentrations des huiles dans le milieu réactionnel.

L'activité antioxydante des huiles est exprimée en IC50 (mg/ml) déduite graphiquement à partir de la courbe des taux d'inhibitions (Figure 14 et l'annexe 8), il définit la concentration d'huile qui cause la perte de 50 % de l'activité du radical libre DPPH. Plus la valeur de l'IC50 est petite, plus l'activité antioxydante de l'extrait testé est grande (Pokorny et al., 2001). L'ensemble des résultats de l'activité antioxydante exprimée en IC50 est représenté dans la figure 15

Les résultats obtenus montrent que les huiles des pépins de *Citrus aurantium* et de *Citrus réticulata* ont des valeurs d'IC50 de l'ordre de  $130,689 \pm 0,049$  mg/ml et  $162,685 \pm 0,042$  mg/ml respectivement.

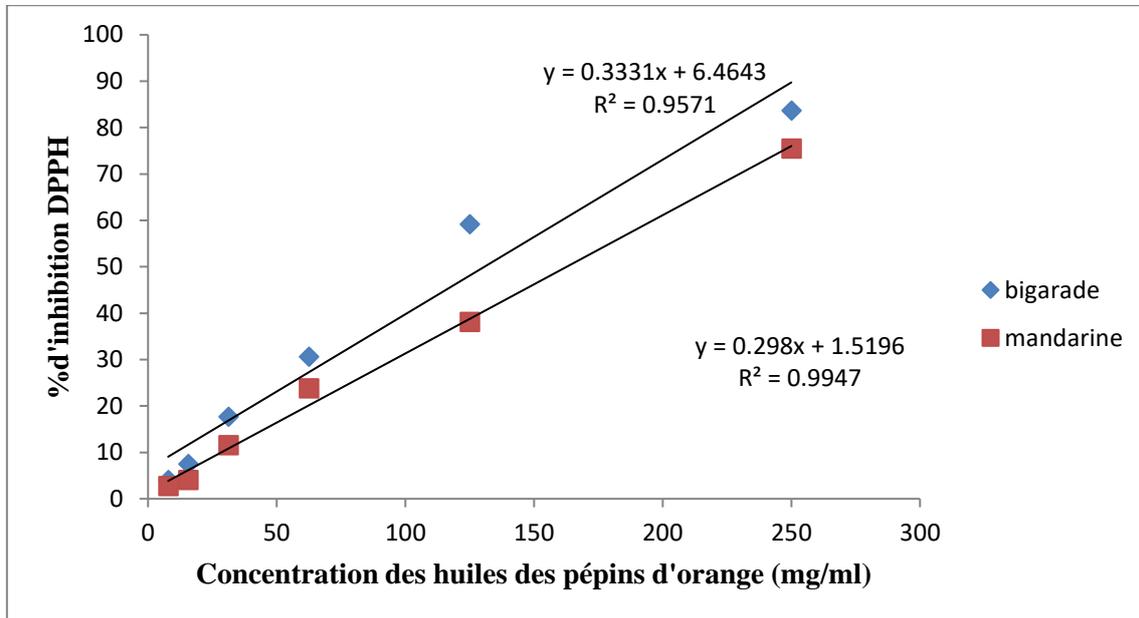
La valeur d'IC50 de l'huile de *Citrus aurantium* est plus importante par rapport à celle de l'huile de pépins de *Citrus réticulata* mais reste largement inférieur à celle de l'antioxydant de synthèse BHT (ButhylHydroxytoluène) ( $1,603 \pm 0,064$  mg/ml).

Les huiles de pépins de nos échantillons (*Citrus reticulata* et *Citrus aurantium*) ont donné de faibles concentrations inhibitrices par rapport aux études faites par Ozlem Inan et al., (2017) sur l'huile de pépins de mandarine avec une valeur d'IC50 de l'ordre de 3,74 et 5,93. Cette différence peut dépendre de la variété d'orange, la localisation et les conditions analytiques tels que la méthode d'extraction, et le solvant utilisé pour la dilution de l'huile (dans notre étude toluène) (Ozlem Inan et al., 2017).

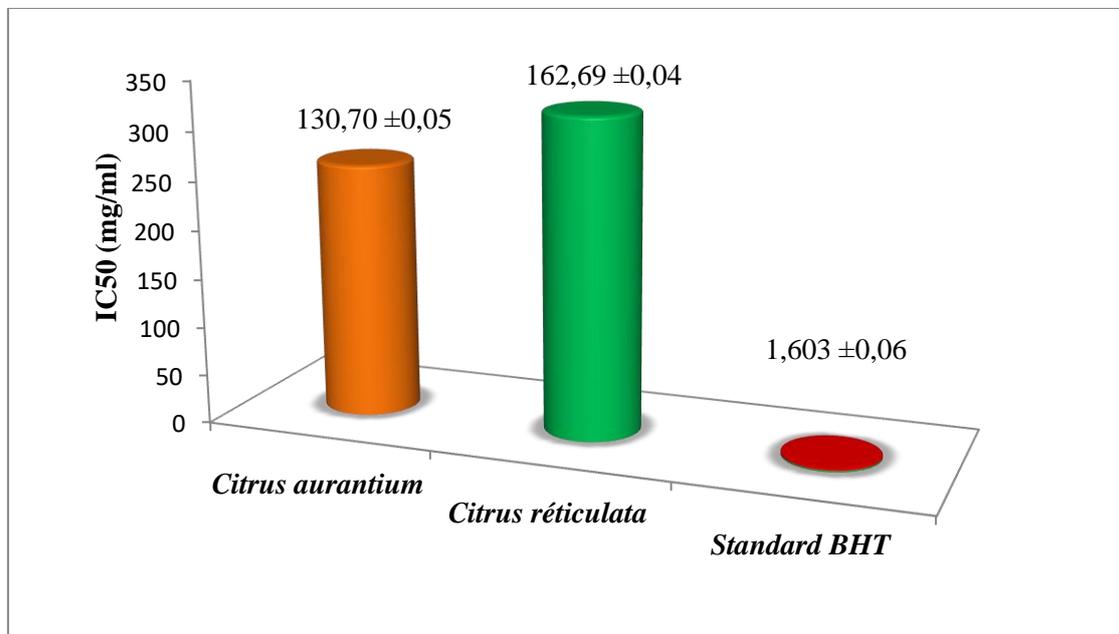
La capacité antioxydante est généralement en rapport avec la richesse des huiles en composés polaires comportant dans leur structure, des groupements OH qui jouent un rôle primordial dans l'activité antioxydant en tant que donneur d'hydrogène (Rincon et al., 2005).

## Résultats et discussion

Récemment il a été montré que l'activité antioxydante des extraits peut être liée à leur composition phénolique et dépend fortement de leurs structures (Kwee and Niemeyer., 2011).



**Figure 14 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des huiles des pépins de *Citrus aurantium* et *Citrus réticulata*.



**Figure 15 :** Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des huiles des pépins de *C.aurantium* et *C.réticulata* ainsi que le standard BHT.

### 1.2 Test du blanchissement du $\beta$ -carotène :

Nous avons évalué l'activité antioxydante de nos huiles de pépins de *Citrus aurantium* et *Citrus réticulata* par la décoloration du  $\beta$ -carotène qui est une méthode spectrophotométrique qui permet de suivre, à 470nm, la décoloration du  $\beta$ -carotène au cours du temps de la réaction.

Le mécanisme de blanchissement de  $\beta$ -carotène est un phénomène à médiation des radicaux libres résultant d'hydroperoxydes formés à partir d'acide linoléique, Ces radicaux libres sont formés lors de l'élimination d'un atome d'hydrogène d'un de ses groupes méthylène diallyliques et attaquent les molécules du  $\beta$ -carotène hautement insaturées qui vont s'oxyder par la suite, entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge.

Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et/ou inhibé l'oxydation donc prévenir le blanchissement du  $\beta$ -carotène (Naidu et al., 2011 ;Kubola et al., 2008).

Les résultats d'inhibition de décoloration de la solution du  $\beta$ -carotène des huiles de pépins de *C.aurantium* et de *C.réticulata* ainsi que le BHT sont représentés dans les figures 16 et 17 et l'annexe 9).

Les résultats indiquent que les huiles de nos échantillons de *Citrus aurantium* et *Citrus réticulata* ainsi que le BHT, inhibent l'oxydation couplée de l'acide linoléique  $\beta$ - carotène et que le pourcentage d'inhibition est proportionnel aux concentrations testées.

Les valeurs d'IC50 de l'oxydation de l'acide linoléique couplée au  $\beta$ - carotène sont représentées dans figure 18.

A partir des valeurs d'IC50 obtenus, il a été observé que l'huile de pépins de *C.reticulata*, montre une activité inhibitrice avec une IC50 estimée à  $166,42 \pm 0,58$  mg/ml par rapport à l'huile de *C.aurantium* avec une IC50 de l'ordre de  $185,93 \pm 0,024$  mg/ml. Ces résultats restent toujours inférieures à celle du standard BHT qui présente une valeur d'IC50 plus faible ( $IC_{50} = 2,58 \pm 0,031$  mg/ml).

## Résultats et discussion

---

Les huiles de pépins de nos échantillons (*Citrus reticulata* et *Citrus aurantium*) ont donné de faibles concentrations inhibitrices par rapport aux études faites par Brixi Gormat et *al.*, (2015) qui montre que l'extrait phénolique de l'huile de pépins de bigarade inhibe le blanchissement du  $\beta$ -carotène à différentes concentrations par le piégeage des radicaux libres, et qui présente une valeur d'IC50 égale à  $1,18 \pm 0,009$  mg/ml.

Ces résultats peuvent être attribués à ces composés antioxydants mineurs tels que les tocophérols et les polyphénols (Brixi Gormat et *al.*, 2015).

L'activité antioxydante de l'huile de pépins de *C.reticulata* est supérieure à celle de l'huile de *C.aurantium* ; Il existe probablement des différences qualitatives dans la nature des composés phénoliques (qui entrent dans la composition des huiles de pépins de *C.reticulata* et *C.aurantium*) influençant le pouvoir antioxydant (Sokol-Letowska, 2007).

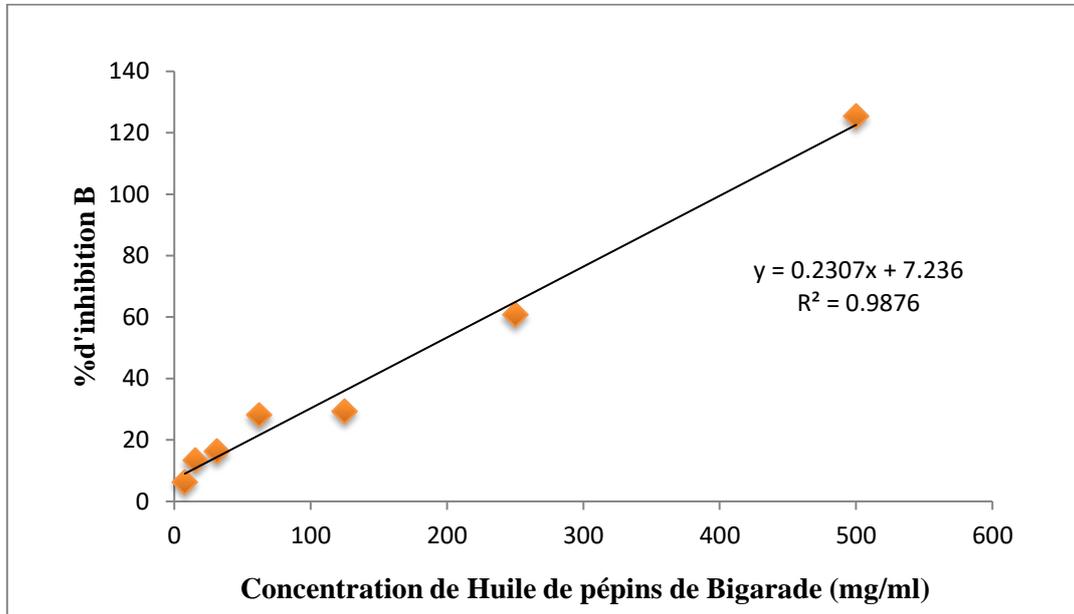
En effet, les résultats obtenus peuvent être attribuées au fait que, les huiles de *Citrus aurantium* et de *Citrus reticulata* sont pourvues de petites quantités d'antioxydants apolaires puissants permettant d'inhiber l'oxydation de l'acide linoléique couplée à la  $\beta$ -carotène car ce test est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau d'ou les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes et ils se concentrent au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du  $\beta$ -carotène (Frankel et *al.*, 2000).

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques par les deux méthodes utilisées (DPPH, et  $\beta$  carotène) a montré que les deux huiles de nos échantillons possèdent une capacité antioxydante malgré que ce soit faible comparés au standard.

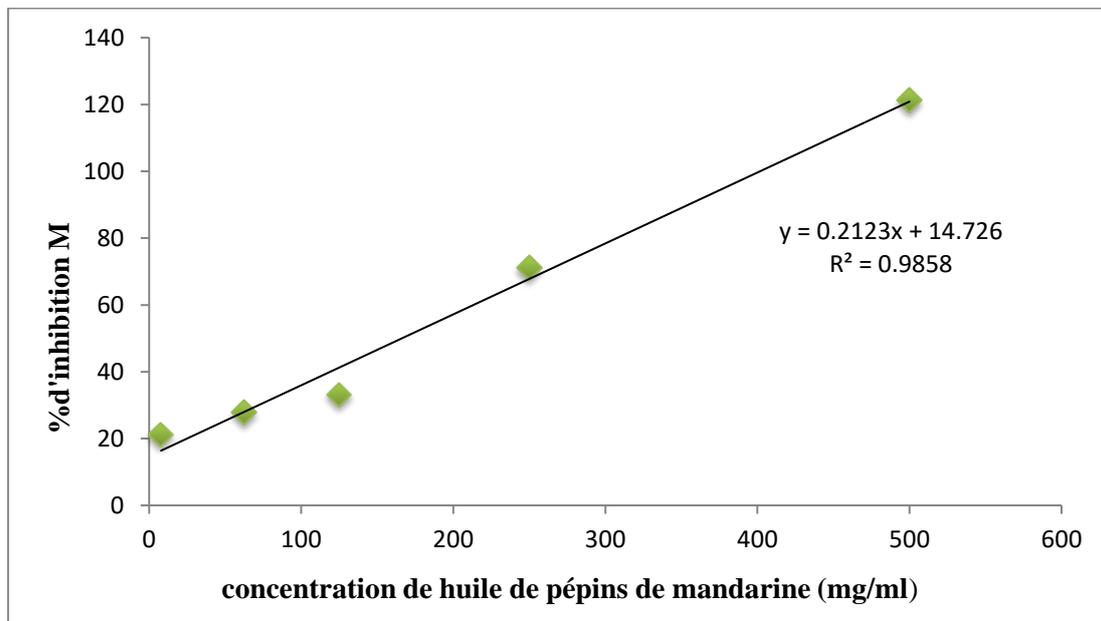
Des chercheurs montrent que les huiles extraites de graines d'orange, de citron ,de mandarine et de *bigarade* sont une riche source d'acides gras insaturés, notamment d'acides gras essentiels (n-6 et n-3), ainsi que d'autres substances phytochimiques liposolubles telles que les tocophérols, les caroténoïdes et composés phénoliques (malacrida et *al.*, 2012 ;Brixi Gormat et *al.*, 2015) qui sont probablement responsables de l'activité antioxydante de nos huiles de pépins de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*.

## Résultats et discussion

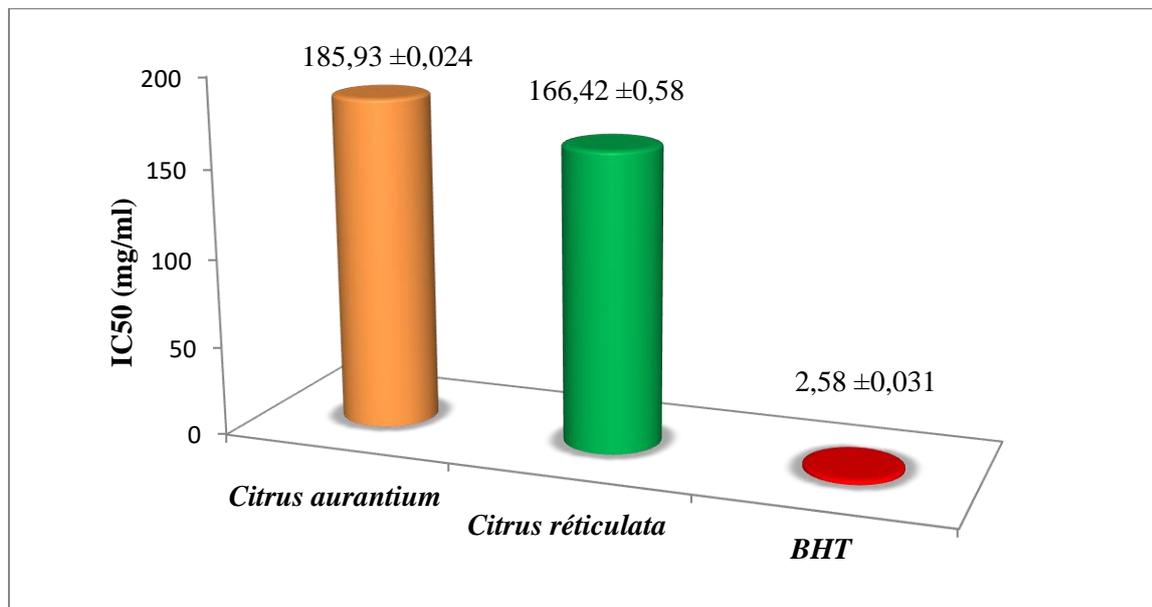
Plusieurs auteurs attestent que la composition chimique et l'activité antioxydante de l'ensemble des fruits et des sous-produits d'agrumes peuvent varier en fonction du type de culture et du stade de maturation (Castillo.*et al.*, 1993 ;Sun *et al.*, 2005 ;Huang *et al.*, 2007).



**Figure 16 :** Pourcentage d'inhibition du test du blanchissement du  $\beta$ -carotène des huiles des pépins de *Citrus aurantium*.



**Figure 17 :** Pourcentage d'inhibition du test du blanchissement du  $\beta$ -carotène des huiles des pépins de *Citrus réticulata*



**Figure 18 :** IC50 du test du blanchiment du *B*-carotène des huiles des pépins de *Citrus aurantium* et *Citrus réticulata*

### 5 Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles de pépins d'oranges :

L'émergence de bactéries et de champignons résistants à de nombreux antibiotiques rend la maîtrise des infections bactériennes et fongiques plus complexe. Face à ce problème, Les remèdes à base de plantes constituent une nouvelle alternative pour combattre ces épidémies qui, à notre ère ne devaient plus exister.

C'est dans ce contexte, que nous avons voulu tester si les huiles des pépins de nos échantillons étudiée (*Citrus aurantium* et *Citrus réticulata*) ont un pouvoir antimicrobien sur les souches bactériennes, pour cela, nous avons utilisés la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Pour ce faire, des disques imprégnés de l'huile du *C. aurantium* et *C.reticulata* avec des volumes de 5µl, 10µl et 20µl sont déposés sur la gélose Mueller-Hintonensemencée. Après incubation, on mesure les zones d'inhibitions qui sont sous forme d'un halo clair autour des disques. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure n°19, photographiées au laboratoire après incubation.

## Résultats et discussion

---

Aucune zone d'inhibition n'a été détectée pour les différentes concentrations, donc ce test a confirmé la résistance des 5 souches microbiennes vis à vis des huiles étudiées.

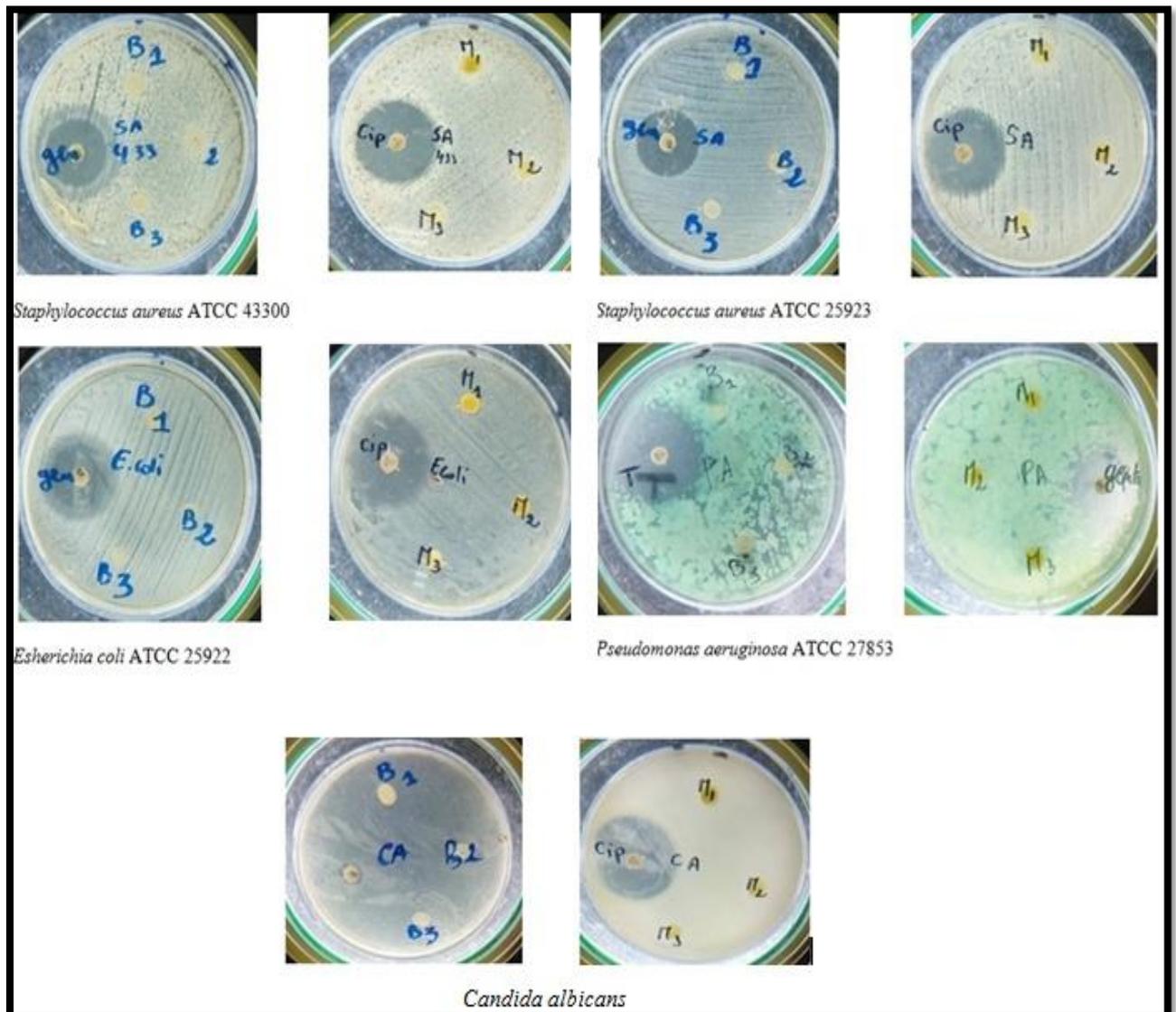
L'étude de Boublenza (2011) est en accord avec nos résultats, qui a signalé une résistance des espèces bactériennes *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* à l'huile coloquinte (*Citrullus colocynthis*).

On cherchant l'activité antimicrobienne des autres huiles végétales, Harzallah et *al.*, (2012) ont trouvé dans leur étude , que la souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 était la plus sensible à l'huile de nigelle parmi l'ensemble des souches testées dont le diamètre de la zone d'inhibition était de l'ordre de 16.66 mm, Concernant l'activité antifongique, l'huile de *Nigelle sativa* semble être inactive sur *C. Albicans.* (Tanis et *al.*, 2009 ; Mariam et abu-al-basal, 2009).

Ces résultats controversés peuvent être expliqués par :

- Les conditions et la saison de la récolte (Mashhadian, 2005).
- Stade de maturité des fruits : les extraits de fruits et de graines immatures présentent une bonne activité antifongique surtout vis-à-vis de différentes espèces de *Candida* (Marzouk et *al.*, 2009)
- La quantité et la qualité des métabolites secondaires : par exemple les alcaloïdes et les flavonoïdes diffèrent d'une région à l'autre.
- l'activité antibactérienne de chaque partie de la plante est tributaire de sa composition (Marzouk et *al.*, 2009 ; Marzouk et *al.*, 2010).

*Ce qu'on pourrait conclure dans cette partie que l'activité antibactérienne et antifongique de nos huiles des pépins des deux variétés d'oranges (bigarade et mandarine) ne réside pas dans l'huile mais dans les autres composants de la graine (riches en métabolites secondaires).*



**Figure 19** : résultats de la méthode de diffusion des disques

B : Huile de bigarade M : huile de mandarine, Cip : Ciprofloxacimine, Genta : Gentamycine

# Conclusion et perspectives

## Conclusion et perspectives

---

La transformation des agrumes génère des sous-produits riches en substances bioactives. Le présent travail, nous a permis de réaliser une étude phytochimique et d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles des pépins des deux espèces de *Citrus* (*C.aurantium* et *C.reticulata*).

L'analyse physico-chimique des huiles des pépins d'oranges a révélé grâce à l'indice de réfraction, acide, peroxyde, saponification que nos huiles sont pures classées parmi les huiles végétales avec une richesse en acide gras insaturés et présence de chaînes carbonées moyennes.

Dans la section suivante, notre attention s'est accordée aux dosages des métabolites secondaires. A l'issu des résultats obtenus, le dosage des composés phénoliques des huiles des pépins de l'orange amère et des mandarines a révélé des teneurs plus faibles ( $0,023 \pm 0,03$  et  $0,041 \pm 0,04$  mg EAG/g d'huile) que ceux des flavonoïdes ( $0,170 \pm 0,03$  et  $0,112 \pm 0,01$  mg EC/g d'huile).

Dans la dernière partie, nous avons évalué les activités biologiques des deux huiles, à savoir l'activité antioxydante par deux méthodes, DPPH et  $\beta$ -carotène, et l'activité antimicrobienne par méthode de diffusion. Les résultats ont montré que les deux huiles possèdent une capacité antioxydante avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre de  $130,70 \pm 0,049$  et  $162,69 \pm 0,042$  mg/ml pour l'huile de bigarade et mandarine respectivement pour la méthode DPPH et des IC<sub>50</sub> estimés à  $185,93 \pm 0,024$  et  $166,42 \pm 0,58$  mg/ml pour la bigarade et la mandarine respectivement pour la méthode de la  $\beta$ -carotène.

Ces résultats seraient probablement dus à l'association de plusieurs composés bioactifs ayant une activité antioxydante, présents dans l'huile de pépins de bigarade notamment la vitamine E et les flavonoïdes.

Cependant, Nos huiles n'ont montré aucune activité sur les souches bactériennes testées (Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup>). Cette inefficacité des huiles testées à également concerné *Candida albicans* qui n'a manifesté aucune sensibilité. En plus, peu de travaux sont rapportés sur l'activité antimicrobienne de ces huiles.

## Conclusion et perspectives

---

Pour approfondir ce travail, il serait plus intéressant d'exploiter par chromatographie en phase gazeuse en utilisant des étalons appropriés pour identifier d'autres types des molécules bioactifs ; de tester l'huile fixe des pépins de bigarade et de mandarine sur d'autres souches de bactéries et de champignons, cette étape permet de chercher d'autres molécules à l'origine d'une propriété antimicrobienne. Et enfin on propose d'utiliser d'autres méthodes d'extractions et de préservation des extraits phénoliques.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### -A-

- Abaza, I., Msallem, M., Daoud, D. & Zarrouk, M. 2002. Caractérisation des huiles de sept variétés d'olivier tunisiennes. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 9, 174-179.
- Adrian J., Potus J., Poiffait A., Dauvillier P., 1998. Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. Techniques & documentation- Lavoisier : P 47-53.
- Afnor association française de normalisation, norme iso 18321 (2015). Corps gras d'origine animale et végétale. Détermination de l'indice de peroxyde.
- Aganga A.A., Mosase K.W. (2001). Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia 56olonizat* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology* ; 91: 107-113.
- Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Prasad, S. & Kannappan, R. 2010. Tocotrienols, the vitamin E of the 21<sup>st</sup> century: its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochemical pharmacology*, 80, 1613-1631.
- Ajewole, K., & Adeyeye, A. (1993). Characterisation of Nigerian *citrus* seed oils. *Food Chemistry*, 47(1), 77-78.
- Ali, R. F., & El Anany, A. M. (2014). Recovery of used frying sunflower oil with sugar cane industry waste and hot water. *Journal of food science and technology*, 51(11), 3002-3013.
- Alimentarius, C. (1999). Codex standard for named vegetable oils. *Codex Stan*, 210, 1-13.
- Anwar, F., Naseer, R., Bhangar, M. I., Ashraf, S., Talpur, F. N., & Aladedunye, F. A. (2008). Physico-chemical characteristics of *citrus* seeds and seed oils from Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(4), 321-330.
- Anwar, N., Salik, S. A. R. A. P. H. I. N. E., & Ahmad, D. I. L. D. A. R. (2009). Antibacterial activity of *Otostegia limbata*. *Int. J. Agric. Biol*, 11, 647-650.
- Apraj, V. D., & Pandita, N. S. (2016). Evaluation of skin anti-aging potential of *Citrus 56olonizati blanco peel*. *Pharmacognosy research*, 8(3), 160.
- Aubert, B., & Vullin, G. (1997). *Pépinières et plantations d'agrumes*. Editions Quae.
- Aubret, J. & Mireille, H. 2003. Qualité des huiles et acides gras de palme et des mélanges d'huiles acides, caractérisations chimique et biochimique. *Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole ; Travail conduit*

### -B-

- Bagchi, K., & Puri, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease: A review.

## Références bibliographiques

---

- Balasundram, N., K. Sundram, et al. (2006). "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses." *Food chemistry* **99**(1) : 191-203.
- Barbelet, S. (2015). Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle, Université de Lorraine.
- Belhattab R. (2007). Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et antiaflatoxinogène d'extraits de *Origanum glandulosum* Desf et *Marrubium vulgare* L (Famille des Lamiaceae). Thèse de Doctorat d'état, UFA-Sétif, Algérie.
- Benavente-Garcia, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(15), 6185-6205
- Bocco, a., Cuvelier, m.-e., Richard, h. & Berset, C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2123-2129.
- Boizot N. et Charpentier J. P. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006 : Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, 79-82.
- Boudhrioua n., Bahloul n., Ben slimen i. & kechaou n. (2008). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and products*, 1-8.
- Bougatef, A., Hajji, M., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2009). Antioxidant and freeradical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food. Chem*, *114*: 1198-1205.
- Bousbia N. (2011).Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse doctorat. L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique (Alger).
- Bouyahya, a. (2016). Alicaments : des aliments aux médicaments, quel apport pour la santé ? *Annales des sciences de la santé*, *1*(4), 1-3.).
- Bozin, b., Mimica-Dukic, n., Samojlik, i., Goran, a. & Igetic, r. 2008. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, *111*, 925-929.
- Braverman, J. B. (1949). *Citrus Products: chemical composition and chemical technology* (No. BRA 634.3 (BR 532)). Interscience Publishers Ltd.

## Références bibliographiques

---

- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 3 ème édition, Lavoisier, Paris.

### -C-

- Castillo, J., Benavente, O. & del Rio, J. A. 1993. Hesperetin 7-O-glucoside and hesperidin in *Citrus* species (*C. aurantium* and *C. sinensis*). A study of their quantitative distribution in immature fruits and as immediate precursors of neohesperidin and naringin in *Citrus aurantium*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1920-1924.
- Chan S.W., Lee C.Y., Yap C.F., Aida W.W. et Ho C.W. 2009. Optimisation of extraction conditions of phenolic compound from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16(2):203-213.
- Cheftel J. C., Cheftel H., 1984. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. *Techniques & documentation- Lavoisier* : Vol 1 : 244-249.
- Chemat, F. (2011). Eco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod.
- Chimi H., Rahmani M., Cillard J. and Cillard P. 1990. Autoxydation des Huiles d'Olive : Rôle des Composés Phénoliques. *Revue Française des Corps Gras* 37 :363–367.

### -D-

- Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linssen PH. 1998. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 140 – 146.
- De Leonardis A., Aretini A., Alfano G., Macciola V. & Ranalli G. (2008). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, 266, 653659.
- De Moraes Pultrini, A., Galindo, L. A., & Costa, M. (2006). Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences*, 78(15), 1720-1725.
- Diwakar, B. T., Dutta, P. K., Lokesh, B. R., & Naidu, K. A. (2008). Bio-availability and metabolism of n-3 fatty acid rich garden cress (*Lepidium sativum*) seed oil in albino rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 78(2), 123-130.
- Dogan, S., Turan, Y., Ertürk, H. & Arslan, O. 2005. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 776-785.

## Références bibliographiques

---

- Dompert, W. and H. Beringer (1976). “[Influence of ripening, temperature and oxygen supply on the synthesis of unsaturated fatty acids and tocopherols in sunflower seeds.German].” *Zeitschrift fuer Pflanzenernaehrung und Bodenkunde*.
- Drasar, B. S. (1974). Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora. In *Society for Applied Bacteriology symposium series* (Vol. 3, pp. 187-196).
- Dugo G. et Giacomo A. D. (2002). *Citrus: The Genus Citrus*. University l’Industria Italy. 1-34.
- Dupont, P. F. (1995). *Candida albicans*, the opportunist. A cellular and molecular perspective. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 85(2), 104-115.
- Duthie, G., & Crozier, A. (2000). Plant-derived phenolic antioxidants. *Current opinion in lipidology*, 11(1), 43-47.

### -E-

- El Mannoubi, I., Skanji, T., Barrek, S., & Zarrouk, H. (2010). Caractérisation de l’huile des graines de l’orange Maltaise (*Citrus sinensis*) poussant en Tunisie. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 12, 31-36.
- El-Adawy, T. A., El-Bedawy, A. A., Rahma, E. H., & Gafar, A. M. (1999). Properties of some citrus seeds. Part 3. Evaluation as a new source of protein and oil. *Food/Nahrung*, 43(6), 385-391.
- El-Ananya, A. M., & Ali, R. F. M. (2018). Physicochemical characteristics of binary mixtures of camel hump fat and citrus seed oil. *RIVISTA ITALIANA DELLE SOSTANZE GRASSE*, 95(3), 183-193.
- Ersus S. et Cam M. 2007. Determination of organic acids, total phenolic content, and 59olonzatio capacity of sour *Citrus aurantium* fruits. *Chemistry of Natural Compounds*. 43 (5): 607-609
- Escartin I. (2011). *Guide des agrumes*. Fondation d’entreprise pour la protection Et la valorisation du patrimoine végétal. L’Institut Klorane. (Consulté le 20 mars 2017).
- Espina, I., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D. & Pagán, R. 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food control*, 22, 896-902.

### -F-

- Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Braga, F.G., Coimbra, E.S., Scio, E., 2009. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bio. Technol.* 100, 428–433.

## Références bibliographiques

---

- FAO. 2014. FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/home/E>
- Farr, B.M., Salgado, C.D., Karchmer, T.B. and Sherertz, R.J. ( 2001) Can antibiotic-resitant nosocomial infections be controlled? *Lancet Infectious Disease* 1, 38–45.
- Fazel M., Sahari M. & Barzegar M. (2008). Determination of Main Tea Seed antioxidants and their effects on Common Kilka oil. *International Food Research Journal*, 15 (2), 209-217.
- Fine, F., Vian, M. A., Tixier, A. S. F., Carre, P., Pages, X., & Chemat, F. (2013). Les agrosolvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *OCL*, 20(5), A502.
- Firestone, D. 1999. Physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes, AOCS press Champaign, IL.
- Fotos, P. G. & Hellstein, J. W. (1992). Candida and candidosis. Epidemiology, diagnosis and therapeutic management. *Dental Clinics of North America* 36, 857–78.
- Frankel E N & Meyer A S. (2000). The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. *Jornal of the Science of Food and Agriculture*, 80 : 1925-1940.
- FUGH-BERMAN, A. & MYERS, A. 2004. Citrus aurantium, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. *Experimental Biology and Medicine*, 229, 698-704.

### -G-

- Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Roudani, A., Boulbaroud, S., Ibrahimi, M., ... & Charrouf, Z. (2015). Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14(2), 172-177.
- 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
- Guignard J.L. (2001). *Botanique, Systématique moléculaire*. Ed. Masson, 290.

### -H-

- Habib, M. A., Hammam, M. A., Sakr, A. A., & Ashoush, Y. A. (1986). Chemical evaluation of Egyptian citrus seeds as potential sources of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63(9), 1192-1196.

## Références bibliographiques

---

- Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, et al. (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chem* 141(1): 253–8
- Hadj Sahraoui M.K. 2007. Mesures de développement des agrumes. *Agriculture et développement rural durable*.
- Haidara A. O., 1996. Valorisation d'une huile de végétale tropicale : L'Huile de Pourghère. *Mémoire, Sherbrooke, Canada*. P 47-61
- Halliwell, B. (2007). Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals in biology and medicine*, 187-267.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950-988.
- Harzallah H.J., Noumi E., Bekir K., Bakhrouf A and Mahjoub T. (2012). Chemical composition, antibacterial and antifungal properties of Tunisian *Nigella sativa* fixed oil. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(22) pp. 4675-4679.
- Ho, S. C., & Kuo, C. T. (2014). Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae* pericarpium). *Food and Chemical Toxicology*, 71, 176-182.
- Huang, R., Xia, R., Hu, L., Lu, Y. & Wang, M. 2007. Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. *Scientia Horticulturae*, 113, 166172.
- Hwang, S. L., Shih, P. H., & Yen, G. C. (2012). Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 60(4), 877-885. hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3268-3273.

-I-

- İnan, Ö., Özcan, M. M., & Aljuhaimi, F. (2018). 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), e13555
- Ismail, S. A. E. A., & Ali, R. F. M. (2015). Physico-chemical properties of biodiesel manufactured from waste frying oil using domestic adsorbents. *Science and technology of advanced materials*, 16(3), 034602.

## Références bibliographiques

---

### -J-

- Japo´ N-Lujan, R., Janeiro, P. & Luque De Castro, M. A. D. 2008. Solid- liquid transfer of biophenols from olive leaves for the enrichment of edible oils by a dynamic ultrasoundassisted approach. *Journal Of agricultural and food chemistry*,56,7231-7235.
- Jayaraman, P., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., Tang, T. H., & Sakharkar, K. R. (2010). Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *International journal of biological sciences*, 6(6), 556.
- Jeong, J. C., Kim, M. S., Kim, T. H., & Kim, Y. K. (2009). Kaempferol induces cell death through ERK and Akt-dependent down-regulation of XIAP and 62olonizat in human glioma cells. *Neurochemical research*, 34(5), 991-1001.
- JUNG, U. J., LEE, M.-K., PARK, Y. B., KANG, M. A. & CHOI, M.-S. 2006. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38, 1134-1145.

### -K-

- Kamal –Eldin A. (2005). Minor components of fats and oils. Appelqvist,
- Kamal-Eldin, A. and R. Andersson (1997). “A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils.” *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 74(4): 375-380.
- Kamel, B. S., Deman, J. M., & Blackman, B. (1982). Nutritional, fatty acid and oil characteristics of different agricultural seeds. *International Journal of Food Science & Technology*, 17(2), 263-269.
- Kerboua, M. (2002). L’agrumiculture en Algérie. In: D’Onghia A.M. (ed.), Djelouah K. (ed.), Roistacher C.N. (ed.). *Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001*. Bari: CHIEAM, pp: 21-26.
- Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmad, A. A., Ali, S. M., & Khan, A. (2009). Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, 14(2), 586-597.
- Khouri, V., Nayebpour, M., Rakhshan, E., Mirabbasi, A., & Zamani, M. (2006). The effect of essence of *Citrus Aurantium* on the electrophysiological properties of isolated perfused rabbit AV-node.

## Références bibliographiques

---

- Kim, D. A., Jeon, Y. K., & Nam, M. J. (2012). Galangin induces apoptosis in gastric cancer cells via regulation of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase isozyme L1 and glutathione S-transferase P. *Food and chemical toxicology*, 50(3-4), 684-688.
- Kim, H. K., Jeong, T.-S., Lee, M.-K., Park, Y. B. & Choi, M.-S. 2003. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clinica Chimica Acta*, 327, 129-137
- Kitts, D. D. 2005. Antioxidant phytochemicals and potential synergistic activities at reducing risk of cardiovascular disease. *Food Drug Synergy and Safety. CRC Press LLC, Boca Raton, FL*, 27-62. KLEIN, B. P. & KURILICH, A. C. 2000. Processing effects on dietary antioxidants from plant foods. *HortScience*, 35, 580-584.
- Kubola, J. & Siriamornpun, S. 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry*, 110,881-890
- Kwee, E. M. & Niemeyer, E. D. 2011. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 128, 1044-1050.

-L-

- Ladaniya, M. S. (2011). “Physico– chemical, respiratory and fungicide residue changes in wax coated mandarin fruit stored at chilling temperature with intermittent warming.” *Journal of food science and technology* 48(2): 150-158.
- Ladanya M. S. (2008). Citrus fruit biology, technology and evaluation.elseiver, 1-585.
- Lagha-Benamrouche, S. and K. Madani (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.
- Lakshmi, A., & Subramanian, S. (2014). Chemotherapeutic effect of tangeretin, a polymethoxylated 63oloniza studied in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene induced mammary carcinoma in experimental rats. *Biochimie*, 99, 96-109.
- Lee, E. R., Kang, Y. J., Choi, H. Y., Kang, G. H., Kim, J. H., Kim, B. W., ... & Cho, S. G. (2007). Induction of apoptotic cell death by synthetic naringenin derivatives in human lung epithelial carcinoma A549 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(12), 2394-2398.
- Léger C.L. (2006). Anti-oxydants d’origine alimentaire : diversité, modes d’action antioxydante, interactions. *OCL*, 13 (1), 59-69.

## Références bibliographiques

---

- Leroy J.F. 1968. Les agrumes. In : les fruits tropicaux et subtropicaux. Ed. presses Universitaires de France, 61-77.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Tian Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry* ; 102: 771-776.
- Li, S., Wang, H., Guo, L., Zhao, H., & Ho, C. T. (2014). Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites. *Journal of Functional Foods*, 6, 2-10.
- Lim. T.K. (2012). Citrus 64olonizati Blanco in Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer sciences et Business Media B.V.; 4: 695-715.

Lipids, 6, 319-359.

- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118).
- Loussert R. (1989). Les agrumes. 2. Production Edition Lavoisier, Paris, 157
- Lu D., Cao Q., Li X., Cao X., Luo F., et Shao W. 2009. Kinetics and equilibrium of Cu (II) adsorption onto chemically modified orange peel cellulose biosorbents. *Hydrometallurgy*, 95(1): 145-152.

### -M-

- Malacrida, C. R., Kimura, M., & Jorge, N. (2012). Phytochemicals and antioxidant activity of citrus seed oils. *Food Science and Technology Research*, 18(3), 399-404.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Manthey, J. A. & Grohmann, K. 2001. Phenols in citrus peel byproducts. Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3268-3273.
- Mariam A., Abu-Al-Basal. (2009). In vitro and in vivo anti-microbial effects of nigella sativa linn. Seed extracts against clinical isolates from skin wound infection . *American Journal of Applied Sciences* 6(8): 1440-1447.
- Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M., & Dessi, A. (2004). Antioxidant Activity of Supercritical Extract of *Melissa officinalis* Subsp. *Officinalis* and *Melissa officinalis* Subsp. *Inodora*. *Phyto Res*, 18: 789-792.

## Références bibliographiques

---

- Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Edziri H., Haloui E., Fenina N., and Aouni M., 2009. Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. From Medenine. *Journal of Ethnopharmacology*, 125 : 344-349.
- Marzouk B., Marzouk Z., Décor R., Mhadhebi L., Fenina N., and Aouni M., 2010.
- Masaki, H. (2010). "Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects." *Journal of dermatological science* 58(2) : 85-90.
- Mashhadian N.V., Rakhshandeh H. (2005). Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* extracts against *S.aureus*, *P. aeruginosa* and *C.albicans*. *Pakistan Journal of Medical Sciences*.21: 47-52.
- Matthaus, B., & Özcan, M. M. (2012). Chemical evaluation of citrus seeds, an agro-industrial waste, as a new potential source of vegetable oils. *Grasas y aceites*, 63(3), 313-320.
- Mayo Clinic Medical Information. Drugs and supplements. Beta-carotene. 2005 [http://www.mayoclinic.com/health/beta-carotene/NS\\_patient-betacarotene](http://www.mayoclinic.com/health/beta-carotene/NS_patient-betacarotene)
- McCullough, M. J., Ross, B. C., & Reade, P. C. (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 25(2), 136-144.
- Messaoudi S. 2005. Les plantes médicinales. Edition Dar et Maarifa.
- Metwally, A. M., & Khafagy, S. M. (1975). Fixed oils from the seeds of certain Citrus plants. *Planta medica*, 27(03), 242-246.
- Miller, A. L. (1996). Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev*, 1(2), 103-111.
- Mohamed Mousa, Y., GERASOPOULOS, D., METZIDAKIS, I. & KIRITSAKIS, A. 1996. Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of 'Mastoides' olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 345-350.
- Mohammed, A. A., & Ibrahim, A. A. (2004). Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanism. *Saudi Pharm J*, 12(6), 1-18.
- Morley, K. L., Ferguson, P. J. & Koropatnick, J. 2007. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells. *Cancer letters*, 251,168-178.
- Mostefa-Kara, I. (2011). Contribution à l'étude de l'analyse de l'huile de *Citrullus colocynthis* coloquinte et de son pouvoir antimicrobien.

## Références bibliographiques

---

- 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.
- Mukhtar ; Khan M.M.;Fatima B.;Abbas .M.; Shahid A. (2005). In vitro regeneration and multiple shoots induction in citrus reticulata (Blanco), *Intentional Journal of Agriculture et Biology*, 7(3): 414-416.
- Mutin, G. 1969. L'Algérie et ses agrumes. *Revue de géographie de Lyon*, 44, 5-36.
- Mylonaki S., Kiassos E., Makris D.P., Kefalas P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chemistry*, 392, 977-985.

-N-

- Naidu M.M., Shyamala B.N., Naik J.P., Sulochanamma G. and Srinivas P. (2011) Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 44; 451-456.
- Naidu, K. A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition journal*, 2(1), 7.
- Nakayama, N., Yamaura, K., Shimada, M., & Ueno, K. (2011). Extract from peel of *Citrus natsuda* alleviates experimental chronic allergic dermatitis in mice. *Pharmacognosy research*, 3(3), 155.
- Nakbi A., Issaoui M., Dabbou S., Koubaa N., Echbili A., Hammami M., Attia N. (2010). Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oil. *Journal of Food Composition and Analysis* ; 23 : 711-715.
- Nassima Brix Gormat, Meriem Belarbi, Zoubida Mami, Fatima zohra Djaziri (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.
- National Committee of Clinical Laboratory Standards NCCLS, 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: ninth informational supplement; Wayne; Pennsylvania:M100-S9Vol19.  
[http://www.cdc.gov/idsr/files/french\\_lab\\_manual\\_idsr/chpt9.htm](http://www.cdc.gov/idsr/files/french_lab_manual_idsr/chpt9.htm).

## Références bibliographiques

---

- Ndayishimiye, J., Lim, D. J., & Chun, B. S. (2018). Antioxidant and antimicrobial activity of oils obtained from a mixture of citrus by-products using a modified supercritical carbon dioxide. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 57, 339-348.
- Ndayishimiye, J., Lim, D. J., & Chun, B. S. (2018). Antioxidant and antimicrobial activity of oils obtained from a mixture of citrus by-products using a modified supercritical carbon dioxide. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 57, 339-348.
- Njoroge, S. M., H. N. Mungai, et al. (2006). "Volatile Constituents of Mandarin (Citrus reticulata Blanco) Peel Oil from Burundi." *Journal of Essential Oil Research* 18(6): 659-662.
- Non déterminé (2012). : Document fourni par la direction des services agricoles de Bejaïa
- Non déterminé (2017) : <http://www.aps.dz/Agrumes-la-production-nationale-s.html>.

### -O-

- Ollé M., 2002. Analyse des corps gras. Bases documentaires : techniques d'analyses ;
- Ortiz, J.M. (2002). Citrus Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. Taylor & Francis, 2 : 16-35.
- Oufedjikh, H., Lacroix, M., Mahrouz, M., & Amiot, M.J. (2000). Effect of g-irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of Citrus clementina Hort. Ex. Tanaka. *J Agric Food Chem*, 48: 559-565.
- Owen P.L. et Johns T. 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern northamerican plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64 (2): 149-160.

### -P-

- Pacifico, S., Scognamiglio, M., D'Abrosca, B., Piccolella, S., Tsafantakis, N., Gallicchio, M., & Fiorentino, A. (2010). Spectroscopic characterization and antiproliferative activity on HepG2 human hepatoblastoma cells of flavonoid C-glycosides from *Petrorhagia velutina*. *Journal of natural products*, 73(12), 1973-1978.
- Packer, L., Rimbach, G. & Virgili, F. 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus 67oloniza*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 704-724.
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., ... & Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*, 22(1), 18-35.

## Références bibliographiques

---

- Pagès-Xatart-Parès X. (2008). Technologie des corps gras (huiles et graisses végétales). Ed. Techniques de l'ingénieur, p 1-17
- Palozza, P., Serini, S., Di Nicuolo, F., Piccioni, E., & Calviello, G. (2003). Prooxidant effects of  $\beta$ -carotene in cultured cells. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 353-362.
- Pardo J. E., Cuesta M. A. et Alvarruiz A. (2007). Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin «Aceite Campo de Montiel» (Ciudad Real, Spain). *Food chemistry* ; 100: 977-984.
- Penchev, P. I. (2010). Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions (Doctoral dissertation, INPT).
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- Pietta, P., Minoggio, M., & Bramati, L. (2003). Plant polyphenols: Structure, occurrence and bioactivity. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 28, pp. 257-312). Elsevier.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. & Gordon, M. H. 2001. *Antioxidants in food: practical applications*, CRC press.
- Polese J.M. 2008. Culture d'agrumes. Edition artémis.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq Colberg C-M., Dusart J., 2003. Microbiologie. 5<sup>e</sup>ed. De Boeck&Larcier s.a. p 809.
- Pryor, W. A. (2000). Vitamin E and heart disease:: Basic science to clinical intervention trials. *Free radical biology and medicine*, 28(1), 141-164.

-R-

- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S., Bashir, N., Nazir, F. & Nayik, G. A. 2016. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- Rakotorimana S.R. 2010 : Contribution à l'amélioration de la comestibilité de l'huile d'arachide artisanale par raffinage. Mémoire d'Ingénieur en Génie chimique. Université d'Antananarivo. P 110
- Ramadan, M.F., Kroh, L.W. and Moersel, J-T. (2003). Radical Scavenging Activity of Black Cumin (*Nigella sativa* L.), Coriander (*Coriandrum sativum* L.), and Niger (*Guizotia abyssinica* cass.) Crude Seed Oils and Oil Fractions. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 51 : 6961-6969.

## Références bibliographiques

---

- Rashid, U., Ibrahim, M., Yasin, S., Yunus, R., Taufiq-Yap, Y. H., & Knothe, G. (2013). Biodiesel from Citrus 69olonizati (mandarin orange) seed oil, a potential non-food feedstock. *Industrial crops and products*, 45, 355-359. Référence P3325 ; Ed. Techniques de l'ingénieur. <http://www.techniques-ingenieur.fr>
- Richter, G. (1993). « Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie. »
- Rincon A.M., Vasquez A.M., Sadille F.C. (2005). Chemical composition and bioactive compounds of flow of orange (citrus snénsis), tangerine (citrus reticulate) and gape fruit (citrus paladin)peels cultivated in Venezuela; *Arch Latinooon Nutr*; **55(3)**: 305-310.
- Rosa, A., Era, B., Masala, C., Nieddu, M., Scano, P., Fais, A., ... & Piras, A. (2019). Supercritical CO2 Extraction of Waste Citrus Seeds: Chemical Composition, Nutritional and Biological Properties of Edible Fixed Oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Rossell, J. & Pritchard, J. 1991. Analysis of oilseeds, fats and fatty foods, Elsevier Science Publishers Ltd.

### -S-

- Saavedra, M. J., Borges, A., Dias, C., Aires, A., Bennett, R. N., Rosa, E. S., & Simões, M. (2010). Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Medicinal Chemistry*, 6(3), 174-183.
- Sadrolhosseini, A. R., Moxsin, M. M., Nang, H. L. L., Norozi, M., Yunus, W., & Zakaria, A. (2011). Physical properties of normal grade biodiesel and winter grade biodiesel. *International journal of molecular sciences*, 12(4), 2100-2111.
- Saïdani, M., Dhifi, W. and Marzouk, B. (2004). Lipid evaluation of some Tunisian citrus seeds. *J. Food Lipids*, 11, 242-250.
- Salgarolo P., 2003. Pratique des manipulations de chimie- à l'usage des biologistes.
- Sawamura, M., N. Thi Minh Tu, et al. (2004). "Characteristic odor components of Citrus reticulata Blanco (Ponkan) cold-pressed oil." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **68(8)**: 1690-1697.
- Scalbert, A. & Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130, 2073S-2085S.
- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.

## Références bibliographiques

---

- Selka, S., & Tchouar, A. K. (2014) *Contribution à l'étude physico-chimique et organoleptique de deux huiles d'olive d'extraction traditionnelle et industrielle de la wilaya de Tlemcen* (Doctoral dissertation).
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*, 32(1), 67-103.
- Shepherd, M. G. (1986). The pathogenesis and host defence mechanisms of oral candidosis. *New Zealand Dental Journal*82, 78–81.
- Shih, Y. W., Wu, P. F., Lee, Y. C., Shi, M. D., & Chiang, T. A. (2009). Myricetin suppresses invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549 cells: possible mediation by blocking the ERK signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(9), 3490-3499.
- Shklar, G., & Schwartz, J. (1988). Tumor necrosis factor in experimental cancer regression with vitamin E, bêtacarotene, canthaxanthine and algae extract. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 24 : 839-50.
- Singleton, V. & Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Smirnoff N (2001) L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm.*;61:241–66.
- Sohn, H. Y., Son, K. H., Kwon, C. S., Kwon, G. S., & Kang, S. S. (2004). Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussnetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine*, 11(7-8), 666-672.
- Sokol-Letowska A., Oszmiansk J & Wojdylo A. (2007). Antioxydant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chemistry*, 103 : 853-859.
- Solinas M. and Cichelli A. 1981. Sulla Determinazione delle Sostanze Fenoliche dell'Olio di Oliva, *Rivew Society Italien Science Alimenter*. 3 : 159–164.
- Spiegel-Roy, P. and E. E. Goldschmidt (1996). *The biology of citrus*, Cambridge University Press.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med*, 24: 345351.
- Sun, C., Chen, K., Chen, Y. & Chen, Q. 2005. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation. *Food Chemistry*, 93, 599-605.

## Références bibliographiques

---

- Sun, T., & Ho, C. T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food chemistry*, 90(4),743-749.
- Sun, Y., J. Wang, et al. (2010). “Simultaneous determination of flavonoids in different parts of Citrus reticulata ‘Chachi’fruit by high performance liquid chromatography—photodiode array detection.” *Molecules* **15**(8): 5378-5388.

### -T-

- Tanis H., Aygan A and Digrak M. (2009). Antimicrobial activity of four nigella species grown in southern turkey. *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 11, N
- Telli, A., Mahboub, N., Boudjeneh, S., Siboukeur, O. E. K., & Moulti-Mati, F. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) variété ghars. *Annales des Sciences et technologie*, 2(2), 107-114.
- Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. Pp: 60: 79.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G. & Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1, 98-106
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry*, 104(2), 466-479.
- Tumbas Vesna .T, Cetkovic Gordana S., Djilas Sonja M., Canadanovic-Brunet Jasna M, Vulic, Željko Knez Jelena J., Škerget Mojca. (2010). Antioxydant activity of mandarin (*Citrus 71olonizati*) peel; *BIBLID* ; **40**: 195-203.

### -U-

- Unten, L., Koketsu, M., Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on  $\beta$ -carotene. *J. Agr Food. Chem*, 45: 2009-2019.
- van Belkum, Alex; Melles, Damian C.; Nouwen, Jan; van Leeuwen, Willem B.; van Wamel, Willem; Vos, Margreet C. et al. (2009) Co-evolutionary aspects of human 71olonization and infection by *Staphylococcus aureus*. In : Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, vol. 9, n° 1, p. 32–47.

### -w-

- Waheed, A., Mahmud, S., Saleem, M. & Ahmad, T. 2009. Fatty acid composition of neutral lipid: Classes of Citrus seed oil. *Journal of Saudi Chemical Society*, 13, 269-272.

## Références bibliographiques

---

- Wang, Y.C., Chuang, Y.C., & Ku, Y.H. (2007). Quantitation of bioactive compounds in citrus fruit cultivated in Taiwan. *Food Chem*, 102: 1163-1171.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 275-295.
- Williams W.B., Cuvelier M.E . et Berset C.1995. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm-Wiss U-Technol*, 28: 25-30.
- Wood, R. E. (1976). Pseudomonas: the compromised host. *Hospital practice*, 11(8), 91-100.
- [www.passeportsante.net/fr/nutrition/encyclopedie/aliments/fiche.aspx?doc=orange\\_nu](http://www.passeportsante.net/fr/nutrition/encyclopedie/aliments/fiche.aspx?doc=orange_nu).

### -X-

- Xiao, Z.-P., PENG, Z.-Y., Peng, M.-J., Yan, W.-B., Ouyang, Y.-Z. & Zhu, H.-L. 2011. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11, 169-177.

### -Y-

- Yang J., Guo J., and Yuan J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin .LWT.41:1060-1066. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).
- Yanishlieva N.V.I et Marinova E.M. (1995). Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*. 54 : 337- 382.(cited inDjemaiZoueglache S, 2008
- Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2004). Flavonoids and the brain: interactions at the blood–brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(11), 1683-1693.
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.

### -Z-

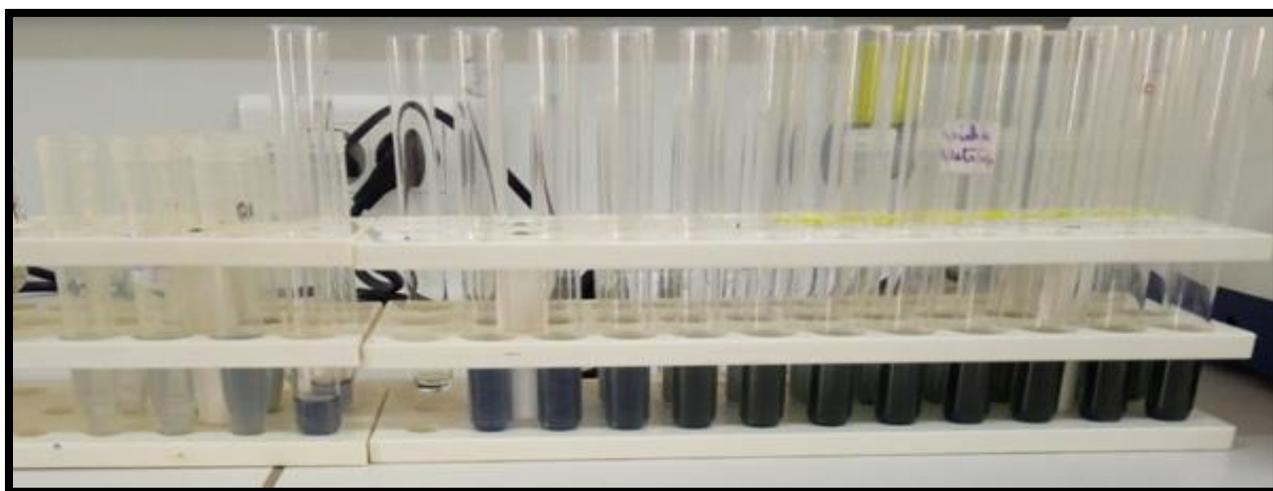
- Zhishen J., Mengcheng T. and Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*; 64: 555-559.

## Annexes

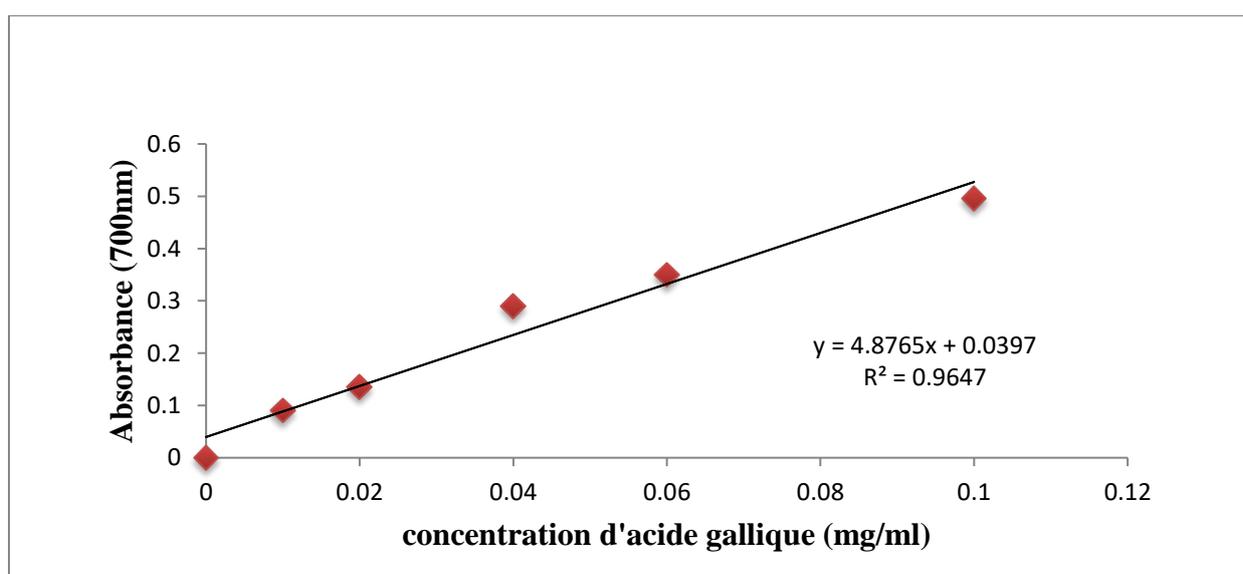
### Annexe 1 : Dosages des polyphénols et des flavonoïdes des huiles de *Citrus aurantium* et *C. reticulata*

| Huiles                        | <i>Citrus aurantium</i> | <i>Citrus reticulata</i> |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Polyphénols mg GAE/g d'huile  | 0,023±0,03              | 0,041±0,04               |
| ssFlavonoïdes mg EC/g d'huile | 0,17±0,03               | 0,112±0,01               |

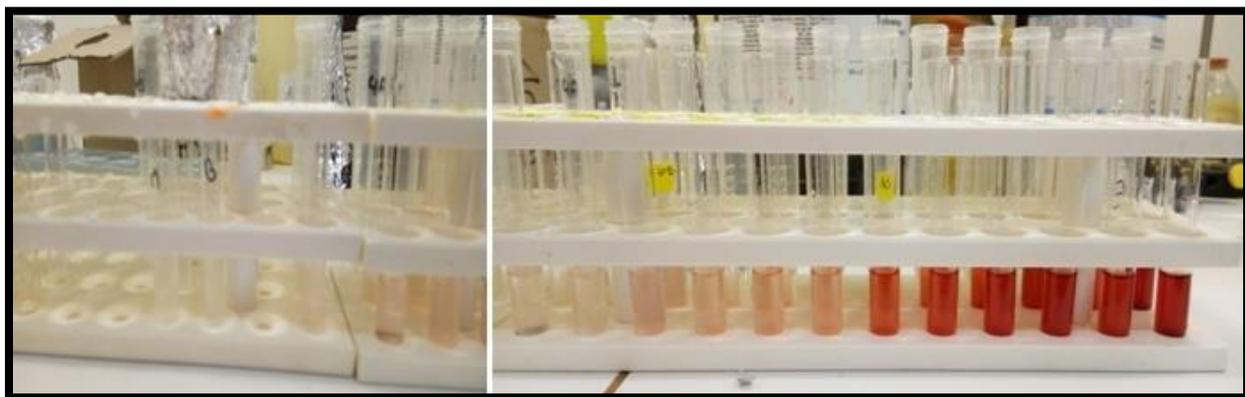
### Annexe 2: la gamme d'étalonnage d'acide gallique



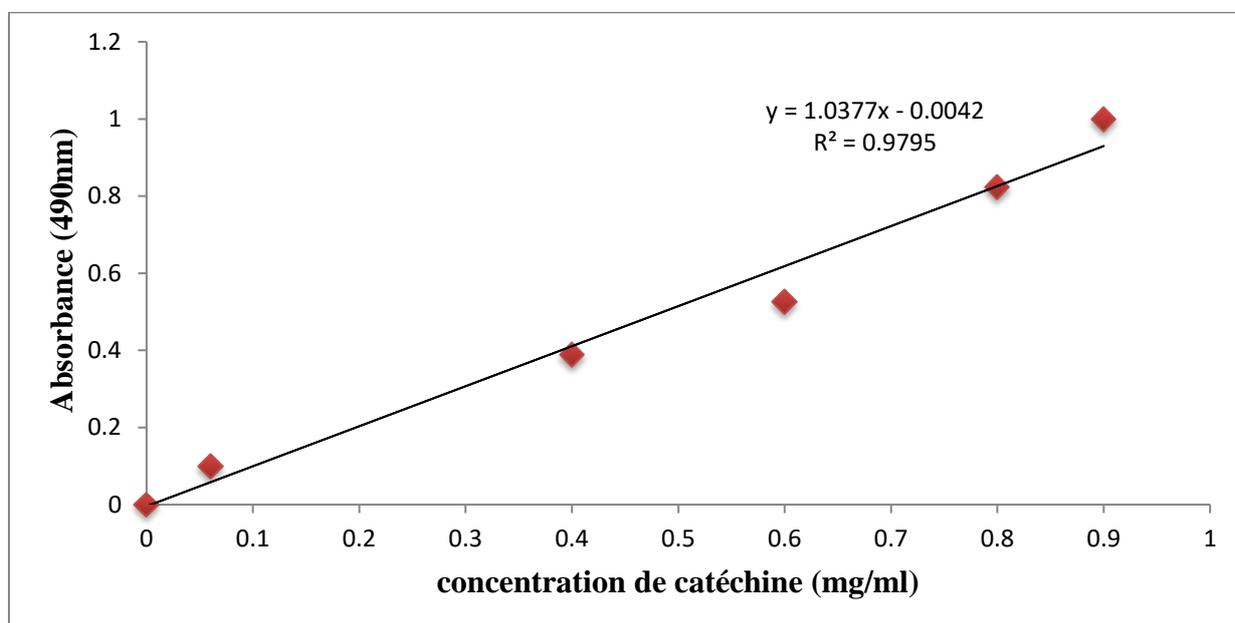
### Annexe 3: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



**Annexe 4:** la gamme d'étalonnage du catéchine.



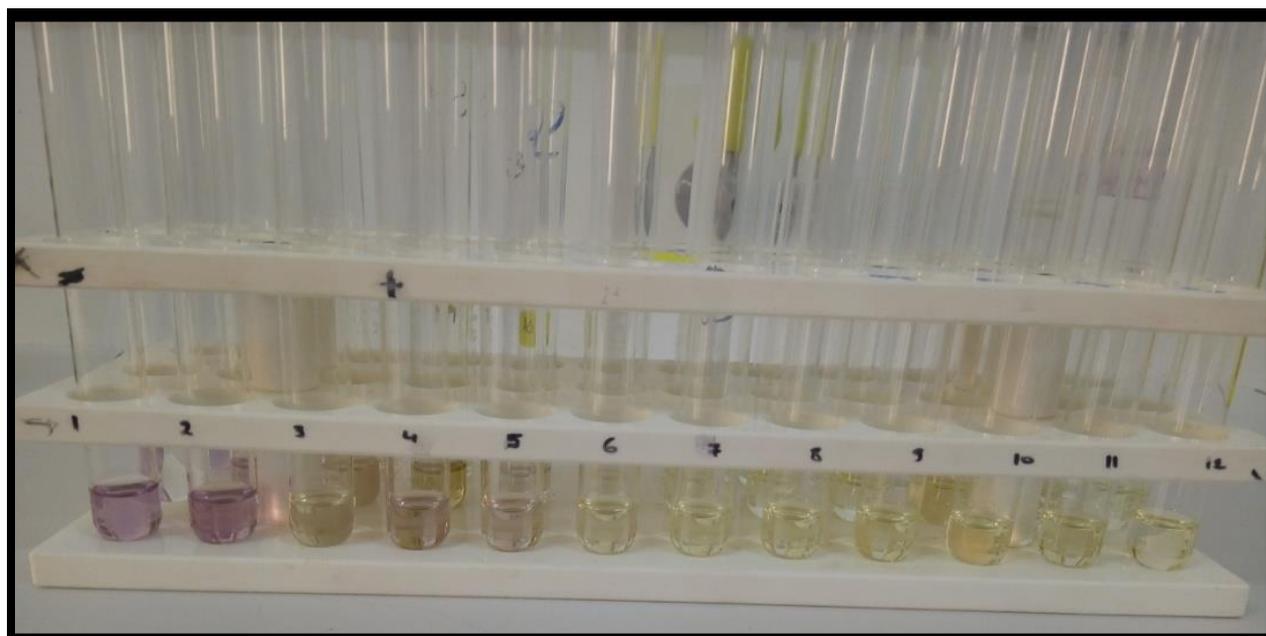
**Annexe 5:** la courbe d'étalonnage du catéchine.



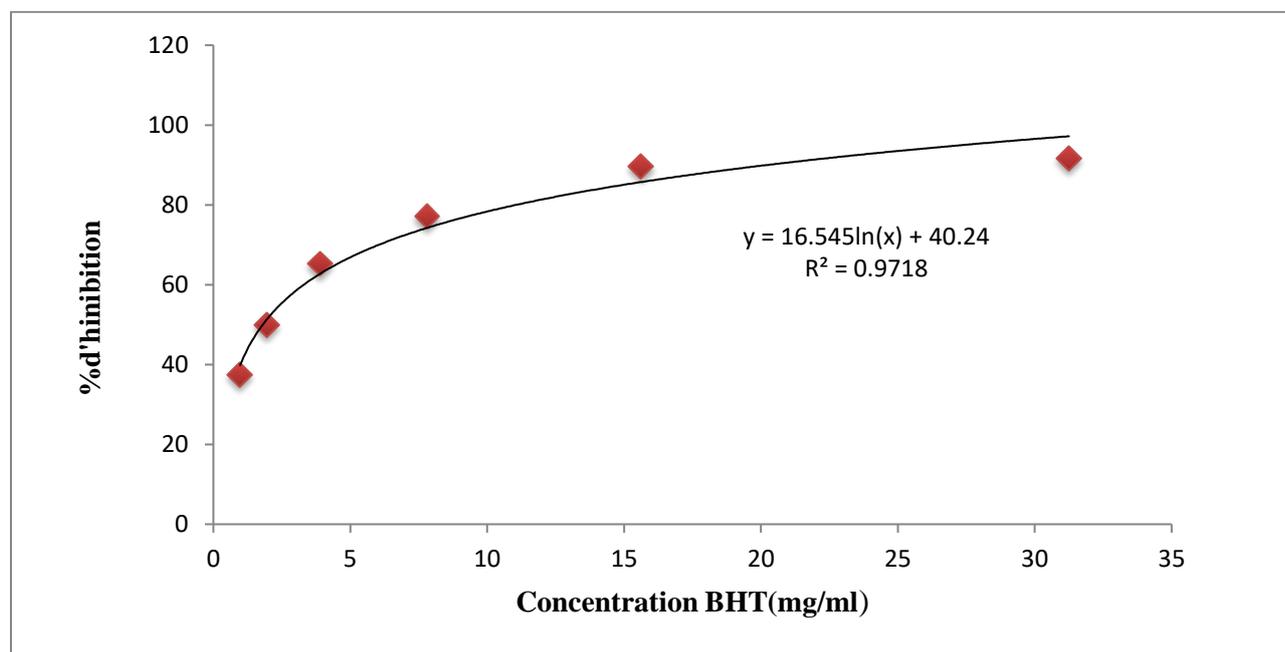
**Annexe 6 :** 50% d'inhibition du radical libre DPPH et  $\beta$  carotène des huiles des pépins du *Citrus aurantium* et *C. reticulata*.

| Echantillons           | <i>Citrus aurantium</i> | <i>Citrus reticulata</i> | BHT         |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------|
| IC50 DPPH              | 130,698±0,049           | 126,685±0,042            | 1,603±0,064 |
| IC50 $\beta$ -carotène | 185,93±0,024            | 166,42±0,58              | 2,58±0,031  |

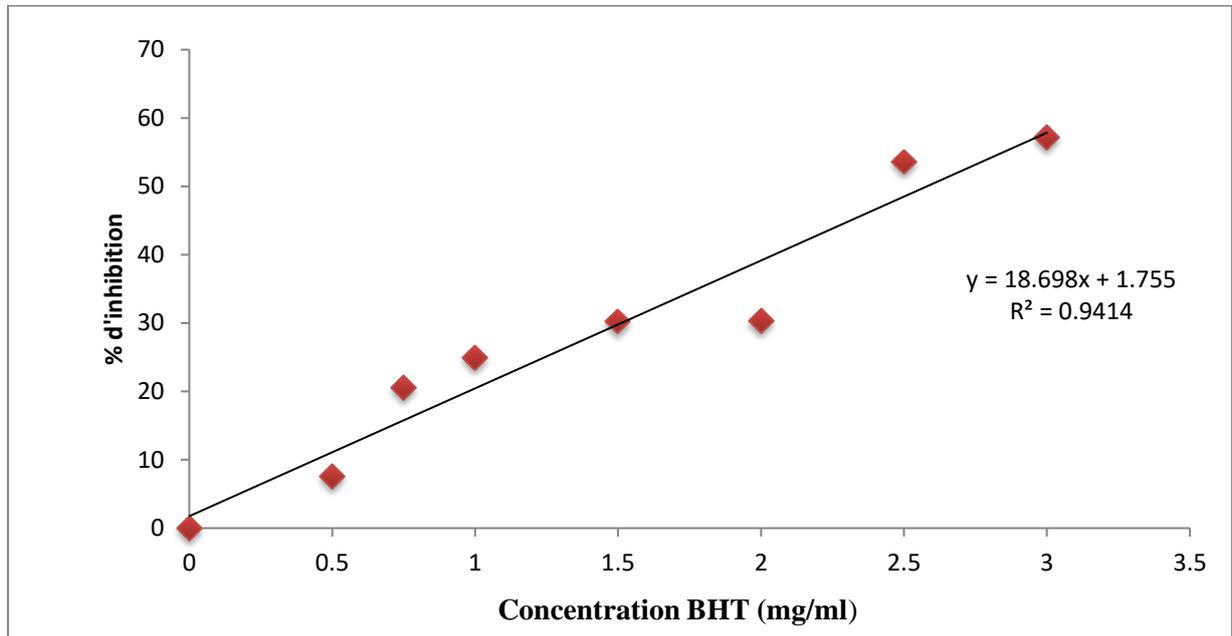
**Annexe 7:** la gamme d'étalonnage du ButhylHydroxyToluène



**Annexe 8:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH du BHT.



**Annexe 9:** Pourcentage d'inhibition du test du blanchiment du  $\beta$  carotène d'antioxydant synthétique BHT



## Résumé :

De nombreuses graines sont sources d'huiles d'importance alimentaire, industrielle et pharmaceutique. L'objectif de notre travail est d'étudier la composition phytochimique (indices physicochimique et dosage des phénols totaux et flavonoïdes) de l'huile de pépins du *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata* et d'évaluer l'activité antioxydante (DPPH,  $\beta$ -carotène) et antimicrobienne de ces deux huiles. Dans un premier temps, les huiles ont été extraites dans un extracteur de type Soxhlet, leurs rendements ont été de 38,21% pour l'huile du *C.aurantium* et de 39.25% pour l'huile du *C. reticulata*. Les caractéristiques physicochimiques des huiles extraites présentaient un indice d'acide de 1,12 (mg de KOH/g huile) pour les deux huiles ; l'indice de réfraction 1,461 et 1,470 ; l'indice de saponification 134,64 et 280,5 (mg KOH/g d'huile) ; l'indice d'ester 133,52 et 279,38 et l'indice de densité 0,926 et 0,927 pour *C.aurantium* et *C. reticulata* respectivement. Le dosage des polyphénols a révélé des teneurs estimées à  $0,023 \pm 0,03$  mg EAG/g d'huile de *C. aurantium* et  $0,041 \pm 0,035$  mg EAG/g d'huile de *C. reticulata*, ces valeurs sont inférieures par rapport à celles des flavonoïdes qui sont de l'ordre de  $0,170 \pm 0,09$  et  $0,112 \pm 0,014$  (mg EC/g d'huile) pour les bigarades et mandarines respectivement. L'évaluation de l'activité antioxydante a montré que les deux huiles étudiées avaient une activité antioxydante différente pour les deux méthodes utilisées, En effet, l'huile du *C. aurantium* possède une activité meilleure que celle du *C.reticulata* à neutraliser le DPPH et contrairement l'huile du *C. reticulata* est plus efficace dans l'inhibition de la décoloration du  $\beta$  carotène. En revanche, les deux huiles étudiées n'ont pas eu d'activité sur les souches bactériennes utilisées.

**Mots clés :** *Citrus reticulata*, *Citrus aurantium*, l'huile de pépins, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antibactérienne.

## Abstract:

Many seeds are sources of oils that have alimentary, industrial and pharmaceutical importance. The objective of our work is to study the phytochemical composition (physicochemical indices and determination of total phenols and flavonoids) of the seed oil of *Citrus aurantium* and *Citrus 77eticulate* and to evaluate the antioxidant activity (DPPH,  $\beta$ -carotene) and antimicrobial of these two oils. At first, the oils were extracted in a Soxhlet type extractor; their yields were 38.21% for *C.aurantium* oil and 39.25% for *C. 77eticulate* oil. The physicochemical characteristics of the extracted oils had an acid value of 1.12 (mg KOH / g oil) for both oils; the refractive index 1.461 and 1.470; saponification number 134.64 and 280.5 (mg KOH / g of oil); the ester number 133.52 and 279.38 and the density index 0.926 and 0.927 for *C.aurantium* and *C. 77eticulate* respectively. The determination of the polyphenols revealed levels estimated at  $0.023 \pm 0.03$  mg EAG / g oil of *C. aurantium* and  $0.041 \pm 0.035$  mg EAG / g oil of *C. 77eticulate*, these values are lower compared to those of flavonoids which are of the order of  $0.170 \pm 0.09$  and  $0.112 \pm 0.014$  (EC mg / g of oil) for bigarades and mandarins respectively. The evaluation of the antioxidant activity showed that the two oils studied had a different antioxidant activity for the two methods used. Indeed, the oil of *C. aurantium* has a better activity than that of *C.reticulata* to neutralize the DPPH. And unlike *C. 77eticulate* oil is more effective in inhibiting the discoloration of  $\beta$  carotene. On the other hand, the two oils studied did not have any activity on the bacterial strains used.

**Key words:** *Citrus 77eticulate*, *Citrus aurantium*, seed oil, phenolic compounds, antioxidant activity, antibacterial activity

## المخلص :

العديد من البذور هي مصادر للزيوت التي لها أهمية غذائية وصناعية وصيدلانية. الهدف من عملنا هو دراسة التركيب النباتي الكيميائي (المؤشرات الفيزيائية والكيميائية وتحديد مجموع الفينولات والفلافونويدات) لزيت بذور الحمضيات *Citrus aurantium* والحمضيات *Citrus réticulata* وتقييم نشاط مضادات الأكسدة (DPPH،  $\beta$ -كاروتين) ومضادات الميكروبات للزيتين. في البداية، تم استخراج الزيوت في مستخرج من نوع Soxhlet، وبلغت عائداتها 38.21% لزيت *C.aurantium* و 39.25% لزيت *C. reticulata*. للزيوت المستخلصة الخواص الفيزيائية والكيميائية التالية: مؤشر الحموضة 1.12 (مع KOH/غ من الزيت) لكلتا الزيتين، مؤشر الانكسارية 1.461 و 1.470، مؤشر التصبن 134.64 و 280.5 (مع KOH/غ من الزيت)؛ رقم الأستر 133.52 و 279.38 ومؤشر الكثافة 0.926 و 0.927 لـ *C.aurantium* و *C. reticulata* على التوالي. كما كشفت عملية تحديد كمية البوليفينول عن مستويات تقدر بـ  $0.023 \pm 0.03$  ملغ EAG / جم من زيت *C. Aurantium* و  $0.041 \pm 0.035$  ملغ EAG / جم من زيت *C. reticulata*، هذه القيم أقل بالمقارنة مع تلك الخاصة بالفلافونويد والتي تتراوح قيمتها بين  $0.09 \pm 0.170$  و  $0.014 \pm 0.112$  (ملغ/ غرام من الزيت) للبيجاراد والماندرين على التوالي. أظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة أن الزيتين المدروستين كان لهما نشاط مختلف من مضادات الأكسدة للطريقتين المستخدمتين، وفي الواقع، يتمتع زيت *C. aurantium* بنشاط أفضل من *C.reticulata* لتحديد DPPH. وعلى العكس زيت *C. reticulata* هو أكثر فعالية في تثبيط تلون  $\beta$  كاروتين. من ناحية أخرى، لم يكن للزيتين المدروستين أي نشاط على السلالات البكتيرية المستخدمة.

**الكلمات المفتاحية :** *Citrus reticulata*, *Citrus aurantium*, زيت البذور، المكونات الفينولية، نشاط مضادات الأكسدة، النشاط ضد البكتيريا