

---

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



Institut des sciences

Département des sciences de la nature et de la vie

## **Mémoire**

**Pour l'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques**

**Option : Biochimie**

Présenté par :

**M<sup>elle</sup> BENKADDOUR Sarra**

**M<sup>elle</sup> ATTAR Kamila**

---

### **Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits brutes et de l'huile essentielle du *Citrus aurantium***

---

**Soutenu le : 30 juin 2020**

**Devant le jury composé de :**

---

Présidente : **Mme BENTABET N.**

« MCB » C.U.B.B.A.T

Examineur : **M. BENNABI F.**

« MAB » C.U.B.B.A.T

Encadrant : **Mme BRIXI GORMAT-BENMANSOUR N.**

« MCB » C.U.B.B.A.T

---

**Année universitaire : 2019-2020**

## *Remerciements*

En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu tout puissant de nous avoir guidés vers le chemin du savoir et de nous avoir donné le courage, la santé, la volonté et la patience pour accomplir ce modeste travail.

On exprime d'abord nos profonds remerciements, notre vive reconnaissance et notre sincère gratitude à M<sup>me</sup> BRIXI GORMAT-BENMANSOUR Nassima, Maître de conférences classe B au centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent, pour avoir accepté de nous encadrer et pour ses conseils et ses précieuses orientations qu'elle n'a cessé de nous apporter tout au long de ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à M<sup>me</sup> BENTABET-LASGAA Nesrine, Maître de conférences classe B au centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent, pour l'honneur qu'elle nous a fait de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions également Mr BENNABI Farid, Maître de conférences classe B au centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent, d'avoir accepté d'examiner notre mémoire de fin d'études.

Nos sincères remerciements s'adressent plus spécialement à mademoiselle ATTOU Amina, pour son aide précieuse, ces conseils techniques et sa compétence scientifique. Merci pour votre soutien, votre disponibilité et votre gentillesse.

Nous adressons nos remerciements au personnel du laboratoire de biochimie où nous avons effectué notre pratique.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et gratitude à tous nos professeurs qui ont contribué à notre formation.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à toute la promotion de master « BIOCHIMIE », année 2019-2020, pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

Enfin, nous remercions gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

## *Dédicace*

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère **Saléha** qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*A mon cher père **Hadj** qui ma appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

*A mon cher frère **Mustapha Kamel** et mon adorable petite sœur **Douàa** que j'aime beaucoup. Avec mes souhaits de bonheur et de réussite.*

*A mes grands parents **Mustapha Kamel, Aouicha** et **Choumicha**, longue vie à eux.*

*Chaleureusement, je dédie ce travail à mes petites cousines **Nihel** et **Dounia Zade** et leur adorable maman **Awatif**, je leur souhaite que du bonheur.*

*A mon fiancé **Ryad Nazim** qui m'a toujours soutenu, et m'a donné le courage d'achever mes études, merci d'être toujours à mes coté.*

*A toute la famille **ATTAR, KERZABI***

*A ma belle famille **BOUDALIA***

*A ma chère binôme **Sarra** et à toute sa famille, pour l'agréable moment qu'on a passé ensemble, pour sa patience, son courage et sa collaboration.*

*A tous ceux qui m'estiment et me portent dans leur cœur .....*



*kamila*

## *Dédicace*

*Tout d'abord, je remercie le bon Dieu Allah qui m'a donnée la volonté, la santé et la force pour terminer ce travail.*

*A ma chère mère qui m'a aidé beaucoup et m'a encourager durant mes années d'étude et pour leur sacrifices, leur efforts.*

*A mon cher père pour leur soutien et encouragement.*

*A ma chère Sœur **Zoubida Imene** et mon chère frère **Khalil** que dieu vous protège, je vous souhaite une longue vie pleine de bonheurs, santé et réussite.*

*A ma grande mère qui m'a soutenue et tenu par ses prières, je vous souhaite une longue vie et bonne santé.*

*A ma chère tante **Rahma** qui m'a soutenu beaucoup avec ses conseils et à son marie **Abd El Kader**.*

*A mes adorables **Moatez** et **Chafie** que dieu vous protège je vous souhaite une vie pleine de bonheurs, de joie et succès.*

*A ma chère amie **Ikhlas** et sa famille.*

*A ma chère binôme **Kamila** et sa famille.*



**Sarra**

## Résumé

Les agrumes, tels que les oranges, très consommés au niveau mondial, représentent des sources riches en magnésium, potassium, calcium et en antioxydants. Cependant, les sous-produits de l'orange amère (bigarade, *Citrus aurantium*) utilisé comme un arbre ornemental en Algérie, représentent une source riche en composés phénoliques, et peuvent être considérés comme une source précieuse d'ingrédients fonctionnels.

Dans cette optique, notre travail consiste à faire une étude phytochimique, à savoir le dosage des polyphénols et des flavonoïdes ainsi que l'évaluation de l'activité anti-oxydante des trois extraits bruts (écorces, feuilles et pépins) et de l'huile essentielle du *Citrus aurantium*.

Tout d'abord, les tests phytochimiques ont révélé la présence de différentes familles de composés chimiques tels que les flavonoïdes, les tanins et les mucilages.

Ensuite, l'évaluation quantitative des composés phénoliques a révélé que l'extrait des écorces ( $12,415 \pm 0,27$  mg EAG/g MS) présente la teneur la plus élevée par rapport aux autres extraits, alors que la teneur la plus élevée en flavonoïdes est présentée par l'extrait des feuilles ( $13,67 \pm 1,96$  mg EAG/g MS).

D'autre part, l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation à partir des écorces fraîches du *C. aurantium* a donné un rendement de  $1,43 \pm 0,319\%$  avec une densité de  $0,705 \pm 0,05$  et d'un indice de réfraction de 1,473.

L'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH des trois extraits bruts et de l'huile essentielle a révélé que nos extraits avaient une activité antioxydante différente. Cependant l'extrait des pépins possède une meilleure activité (IC50 : 13,775 mg/ml) comparé aux autres extraits testés, mais reste moins actif que l'acide ascorbique (IC50 = 0,060 mg/ml).

**Mots clés :** *Citrus aurantium*, huile essentielle, composés phénoliques, activité antioxydante, DPPH.

## Abstract

Citrus fruits, such as oranges, which are widely consumed worldwide, represent rich sources of magnesium, potassium, calcium and antioxidants. However, the by-products of the bitter orange (bigarade, *Citrus aurantium*) used as an ornamental tree in Algeria, represent a rich source of phenolic compounds, and can be considered as a precious source of functional ingredients.

In this perspective, our work consists in carrying out a phytochemical study, namely the dosage of total phenols and flavonoids as well as the evaluation of the antioxidant activity of the three crude extracts (peel, leaves and seeds) and oil essential of *Citrus aurantium*.

First of all, phytochemical tests revealed the presence of different families of chemical compounds such as flavonoids, tannins and mucilages.

Then, the quantitative evaluation of the phenolic compounds revealed that peel extract ( $12,415 \pm 0,27$  mg EAG/gMS) has the highest content compared to the other extracts, while the highest content of flavonoids is presented by the leaf extract ( $13,67 \pm 1,96$  mg EAG / g MS).

On the other hand, the extraction of essential oil by hydrodistillation from the fresh peel of *C. aurantium* gave a yield of  $1,43 \pm 0,319\%$  with a density of  $0,705 \pm 0,05$  and an index of refraction of 1,473.

The evaluation of the antioxidant power by the method of trapping the free radical DPPH of the three crude extracts and of the essential oil revealed that our extracts had a different antioxidant activity. However, seeds extract has better activity (IC<sub>50</sub>: 13,775 mg/ml) compared to the other extracts tested, but remains less active than ascorbic acid (IC<sub>50</sub>: 0,060 mg / ml).

**Keywords:** *Citrus aurantium*, essential oil, phenolic compounds, antioxidant activity, DPPH.

## الملخص

تمثل الحمضيات كالبرتقال، التي يتم استهلاكها على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم، مصادر غنية بالمغنيسيوم والبوتاسيوم والكالسيوم ومضادات الأكسدة. ومع ذلك ، فإن المنتجات الثانوية للبرتقال المر (بيجاراد، النارنج) المستخدمة كشجرة زينة في الجزائر ، تمثل مصدرًا غنيًا للمركبات الفينولية ، ويمكن اعتبارها مصدرًا ثمينًا للمكونات الوظيفية.

في هذا المنظور ، ينظم عملنا إجراء دراسة كيميائية نباتية ، وهي تقييم جرعة البوليفينول والفلافونويد وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة من المستخلصات الخام الثلاثة (اللحاء والأوراق والبذور) والزيت الأساسي للحمضيات.

أولاً، كشفت الاختبارات الكيميائية النباتية عن وجود مجموعات مختلفة من المركبات الكيميائية مثل مركبات الفلافونويد و التانينات والصمغ.

ثم أظهر التقييم الكمي للمركبات الفينولية أن مستخلص اللحاء ( $0,27 \pm 12,415$  مغ EAG / MS غ) يقدم أعلى محتوى مقارنة بالمقتطفات الأخرى ، في حين يتم تقديم أعلى محتوى من مركبات الفلافونويد من مستخلص الأوراق (  $1,96 \pm 13,67$  ملجم EAG / MS).

من ناحية أخرى، استخلص الزيت العطري عن طريق التقطير المائي من لحاء النارنج الطازج، ينتج عنه عائد يقدر ب  $1,43 \pm 0,319\%$  و بكثافة  $0,705 \pm 0,05$  ومؤشر انكسار و  $1,473$ .

كشفت تقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريقة محاصرة DPPH الجذور الحرة للمستخلصات الخام الثلاثة والزيوت الأساسية أن مستخلصاتها لها نشاط مختلف. ومع ذلك ، فإن مستخلص البذور له نشاط أفضل ( $IC_{50}: 13,775$  مجم / مل) مقارنة بالمقتطفات الأخرى التي تم اختبارها ، ولكنه لا يزال أقل نشاطاً من حمض الأسكوربيك ( $IC_{50} = 0,060$  مجم / مل).

**الكلمات المفتاحية:** الحمضيات ، الزيوت العطرية ، المركبات الفينولية ، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH

## Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction générale 1

### Synthèse Bibliographique

I. Les agrumes	3
I.1. Origine et histoire	3
I.2. Production dans le monde et en Algérie	3
I.3. Données botaniques	4
II. Généralités sur l'espèce étudiée : <i>Citrus aurantium</i>	6
II.1. Identification botanique	6
II.2. Description morphologique	6
II.3. Composition chimique	7
II.4. Utilisation et effet thérapeutique	9
III. Les huiles essentielles	9
III.1. Définition	9
III.2. Caractéristiques et composition chimique	10
III.3. Méthodes d'extractions des huiles essentielles d'agrumes	11
III.4. Mode d'action	13
V.5. Toxicité	13
IV. Stress oxydatif, radicaux libres et système antioxydant	14
IV.1. Définition du stress oxydatif	14
IV.2. Origine des radicaux libres	14
IV.3. Maladies liées au stress oxydatif	16
IV.4. Les types d'antioxydants	16
IV.5. Activité antioxydante des <i>Citrus</i>	19

### Matériel et méthodes

I. Matériel végétal	20
II. Préparation des échantillons	20
II.1. Préparation des extraits	21
II.2. L'extraction de l'huile essentielle	23

II.2.1. Propriétés physicochimiques de l'huile	24
II.2.1.1. L'indice de réfraction	24
II.2.1.2. Détermination de la densité	25
III .Tests phytochimiques	25
IV. Dosage des composés phénoliques	26
IV. 1. Dosage des phénols totaux	26
IV.2.Dosage des flavonoïdes	27
V. Évaluation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH	27
<b>Résultats et discussion</b>	
I. Tests phytochimiques	30
I. 2.Les rendements après extraction	31
I. 3.Analyses des huiles essentielles	32
I. 3.1. Caractères organoleptiques	32
I.3.2. Études physicochimique	33
I.4.teneur en composés phénolique totaux	34
I.5.teneur en flavonoïde	35
II. Évaluation de L'activité antioxydante (DPPH)	37
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>42</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>43</b>
<b>Annexes</b>	<b>59</b>

## Liste des abréviations

**%** : Pour cent.

**°C** : Degré Celsius.

**µl** : Microlitre.

**Abs** : Absorbance.

**AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium

**C.** : Citrus

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

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

**ERO** : Espèces Réactives de l'oxygène

**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure de fer

**g** : Gramme.

**H** : Heure.

**H.E** : l'huile essentielle

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique

**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : acide phosphomolybdique

**H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : acide phosphotungstique

**Hcl** : Acide chlorhydrique

**IC50** : Concentration d'inhibition à 50% de DPPH.

**J-C** : Jésus-Christ

**MeOH** : Méthanol

**MEP** : voie du méthylérythritol phosphate

**Mg ++** : magnésium

**mg EAG/gMS** : milligrammes équivalent d'acide gallique/gamme de matière végétale sèche

**Mg** : milligrammes

**min** : minute

**ml** : millilitre

**Mq** : millions de quintaux

**Mt** : millions de tonnes

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium

**NaNO<sub>2</sub>** : nitrate de sodium

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**nm** : Nanomètre

**Ox** : Oxydant.

**R°** : Radical libre.

**Rdt** : Rendement d'extraction.

**Red** : Réducteur.

**TCAM** : Taux de Croissance Annuel Moyen

**USDA** : département de l'Agriculture des États-Unis

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : fruit du bigaradier	<b>5</b>
<b>Figure2</b> : Les différents organes de bigarade	<b>7</b>
<b>Figure 3</b> :montage d'extraction par hydrodistillation	<b>12</b>
<b>Figure4</b> : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	<b>15</b>
<b>Figure 5</b> : Facteurs intervenant dans l'équilibre de la balance anti/pro-oxydante	<b>15</b>
<b>Figure 6</b> : structure d'acide ascorbique	<b>17</b>
<b>Figure 7</b> : structure chimique d'un caroténoïde	<b>17</b>
<b>Figure 8</b> : structure chimique des acides phénoliques	<b>18</b>
<b>Figure 9</b> : Structure de base des flavonoïdes	<b>19</b>
<b>Figure10</b> : écorces, feuilles et pépins après séchage	<b>20</b>
<b>Figure11</b> :Les différents extraits d'écorces, feuilles et pépins	<b>21</b>
<b>Figure 12</b> : extraction des huiles essentielles par hydro distillation	<b>23</b>
<b>Figure 13</b> : réfractomètre	<b>24</b>
<b>Figure 14</b> : Courbe de réaction entre le radical DPPH (violet) et un antioxydant donnant la molécule DPPH neutralisée (orange).	<b>28</b>
<b>Figure15</b> : Rendement des extraits secs d'écorces, feuilles et pépins du <i>Citrus aurantium</i>	<b>31</b>
<b>Figure 16</b> : Teneur en composés phénoliques des écorces, feuilles et pépins du <i>Citrus .aurantium</i>	<b>34</b>
<b>Figure 17</b> : Teneur en flavonoïdes d'écorces, feuilles et pépins du <i>Citrus aurantium</i>	<b>36</b>
<b>Figure 18</b> : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits du <i>Citrus aurantium</i> et de l'acide ascorbique	<b>39</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> La composition chimique et valeur nutritive de la bigarade	<b>8</b>
<b>Tableau 2:</b> composition des huiles essentielles du <i>C. aurantium</i> L. extraites de trois parties différentes de la plante	<b>11</b>
<b>Tableau 3:</b> résultats des tests photochimiques d'écorces, feuilles et pépins	<b>30</b>
<b>Tableau 4 :</b> La Densité, l'indice de réfraction et le rendement en huile essentielle de l'écorce de <i>Citrus aurantium</i> extraite par la méthode d'hydro-distillation	<b>33</b>
<b>Tableau5:</b> Activité antioxydante des extraits vis-à-vis du radical DPPH	<b>41</b>

## Listes des annexes

<b>Annexe 1</b> : Tableau de Rendement d'écorces, feuilles et pépins du <i>Citrus aurantium</i>	<b>59</b>
<b>Annexe 2</b> : résultats des tests phytochimiques d'écorce de <i>Citrus aurantium</i>	<b>59</b>
<b>Annexe 3</b> : résultats des tests phytochimiques des feuilles de <i>Citrus aurantium</i>	<b>59</b>
<b>Annexe 4</b> : résultats des tests phytochimiques des pépins <i>Citrus aurantium</i>	<b>60</b>
<b>Annexe 5</b> : la gamme d'étalonnage d'acide gallique	<b>60</b>
<b>Annexe 6</b> : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	<b>61</b>
<b>Annexe 7</b> : dosages des polyphénols d'écorce, feuilles et pépins de <i>Citrus Aurantium</i>	<b>61</b>
<b>Annexe 8</b> : la gamme d'étalonnage du catéchine.	<b>61</b>
<b>Annexe 9</b> : la courbe d'étalonnage du catéchine	<b>62</b>
<b>Annexe 10</b> : gamme d'étalonnage d'acide ascorbique	<b>62</b>
<b>Annexe 11</b> : résultat de réfractomètre	<b>63</b>
<b>Annexe 12</b> : extraction de l'huile essentielle par Hydrodistillation	<b>63</b>
<b>Annexe 13</b> : La Densité, l'indice de réfraction et le rendement en huile essentielle de l'écorce de <i>Citrus aurantium</i> extraite par la méthode d'hydro-distillation	<b>63</b>

# *Introduction Générale*

La nature est une source unique de structures d'une grande diversité phytochimique, qui possèdent des activités biologiques et des propriétés médicinales intéressantes (**Saxena et al. 2013**). En effet, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale, ont toujours été une source importante de molécules thérapeutiques (**Adida et al., 2015**), qui peuvent conduire au développement de nouveaux médicaments (**Azwanida, 2015**).

Ainsi, la recherche de produits naturels représente un sujet de grand intérêt où le règne végétal est la plus importante source de fourniture de nombreux agents tels que les antioxydants (**Kalt, 2001**).

A cet égard, 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**).

Les agrumes, qui représentent l'une des récoltes de fruits les plus importantes dans le monde (**Lagha-benamrouche et al., 2017**), tels que les oranges, les citrons, et les pamplemousses (**Rock et Fardet, 2014**), sont une bonne source de glucides, de fibres alimentaires, de vitamines, de minéraux et de composés phytochimiques biologiquement actifs tels que les caroténoïdes et les flavonoïdes, qui fournissent respectivement une activité de provitamine A et des agents antioxydants naturels (**Liu et al., 2012**).

En effet, les flavonoïdes d'agrumes ont montré diverses bioactivités, y compris des activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses, antivirales et neuroprotectrices (**Yi et al., 2017**). Cette capacité antioxydante peut être explorée dans l'industrie alimentaire en utilisant des plantes comme source d'antioxydants pour prévenir le rancissement et l'oxydation des lipides (**Lagha-Benamrouche et Madani, 2013**).

Par ailleurs, des études ont montré que les sous-produits d'agrumes sont une source de composés bioactifs (**Sahraoui et al., 2011**) tels que les composés phénoliques (**Li et al., 2006; Ortuno et al., 1995; Khan et al., 2010; He et al., 2011**).

Environ 80% de la récolte d'agrumes est utilisée par l'industrie du jus ; pendant le processus d'extraction du jus d'agrumes, de grandes quantités de sous-produits (déchets) sont produites (**Moulehi et al., 2012**). Ces déchets indésirables de la fabrication pourraient être recyclés en tant que compléments alimentaires, qui fournissent des fibres alimentaires et des polyphénols (**Rafiq et al., 2016**).

Ils sont constitués des écorces et des pépins (**Moulehi et al.,2012**), qui sont généralement jetés comme déchets dans l'environnement et, peuvent constituer des ressources nutraceutiques potentielles (**Rafiq et al., 2016**).

A cet égard, Nous nous sommes intéressés aux sous produits du bigaradier, arbre ornemental, donnant de oranges amères ou bigarades (*Citrus aurantium*), utilisées depuis longtemps comme nutriments et dans le traitement de plusieurs maladies.

De ce fait, le but de ce travail est de déterminer les groupes phytochimiques présentes dans les sous produits de la bigarade (écorces, feuilles, pépins) ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante et celle de l'huile essentielle extraite à partir des écorces de la même espèce.

Notre travail sera donc réparti comme suit :

- Extraction des composés phénoliques d'écorces, feuilles et pépins et de l'huile essentielle.
- Tests phytochimiques des extraits bruts (écorces, feuilles et pépins).
- Analyse quantitative des composés phénoliques et des flavonoïdes.
- Evaluation de l'activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH.

# **Synthèse Bibliographique**

## **I. Les agrumes**

### **I.1. Origine et histoire**

Le mot agrume provient du latin *acrumen*, qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (**Escartin, 2011 ; Millet, 2014**).

Les agrumes, originaire d'Asie tropicale et subtropicale ont été disséminés au cours des siècles dans différentes régions du monde (**Aubert et al., 1997**). Le premier agrume introduit en Europe par Theophrastus en 310 avant J-C est le cédrat. Les oranges et les citrons ont été importés par les romains de leur province comme un fruit couteux pour leurs banquets (**Bousbia, 2011**).

La propagation des agrumes dans d'autres parties du monde a été lente, notamment en Afrique du Nord et en Europe du Sud. La première introduction d'agrumes en Amérique a été réalisée par des explorateurs espagnols et portugais (**Liu et al., 2012**), qui introduisirent un ou plusieurs types d'oranges douces de qualité supérieure en Europe, probablement au 16ème siècle (**Moore, 2001**).

Au début du 18ème siècle, les agrumes tels que les citrons et les oranges amères furent introduits dans la région méditerranéenne par les arabes, suite à leurs échanges commerciaux à travers la route de la soie (**Loussert, 1985; Arias et Ramón-Laca, 2005**).

Le bigaradier (orange amère). est cultivé dans le sud de l'Europe, le littoral méditerranéen et dans d'autres régions subtropicales notamment dans le sud de la France, l'Italie, Espagne, Tunisie, Algérie, Côte d'Ivoire, Haïti, États-Unis, Brésil, etc. (**Ghédira et Goetz, 2015**).

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

Selon les données du Département Américain de l'Agriculture (USDA), la production mondiale d'agrumes tous produits confondus s'élève à plus 90 Mt pour la campagne 2016/2017 avec un TCAM de 1,2% durant la période 2007-2017 (**Trabelsi, 2018**).

La Chine est le premier producteur d'agrumes dans le monde avec une part de 34% et un volume de 29,5 millions de tonnes, elle est suivie par le Brésil avec 22%, l'Union européenne arrive au 3ème rang suivi par le Mexique (6,7 millions de tonnes) et les États unis (4,6 millions de tonnes), le Maroc occupe le septième rang, suivi par la Turquie avec une part de 1,6%, quant à la Tunisie, sa part dans la production mondiale est de 0,7%. (**Trabelsi, 2018**).

La production globale d'agrumes en Algérie pour la saison agricole 2018 a été estimée à plus de 14 millions de quintaux (Mq), dont plus de 11 Mq d'oranges et 2,5 Mq de clémentine et, enfin près de 800.000 quintaux de citron (**Kaidi, 2019**).

Les agrumes se trouvent dans les plaines irrigables : la plaine de la Mitidja (44 %), le périmètre de la Mina et le Bas Chelif (14 %), le périmètre de Bouna Moussa et la plaine de Safsaf (16%), la plaine de Habra de Mascara (25 %) (**Kerboua, 2002**). Le centre du pays occupe 56% de cette surface d'agrumes, 30% se trouvent à l'est du pays, et 14% à l'Ouest (**houaoura, 2013**). Les variétés d'oranges les plus cultivées sont la Thomson Navel et la Washington Navel avec plus de 65% alors que le reste est cultivé en citron, clémentine, mandarine et pamplemousse (**Bensadok, 2018**)

### I.3. Données botaniques:

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées et correspondent aux espèces exploitées chez les genres *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus* (**Dongmo et al., 2002**).

Le genre *Citrus* comprend environ 140 genres et 1300 espèces (, tels que *Citrus sinensis* (Orange), *Citrus paradisi* (Pamplemousse), *Citrus limon* (Citron), *Citrus reticulata* (mandarine), *Citrus grandis* (shaddock), *Citrus aurantium* (orange amère), *Citrus medica* (Citron) et *Citrus aurantifolia* (citron vert) (**Kamal et al., 2011**).

La classification des agrumes, d'après Guignard (2001) est comme suit :

Règne	Végétal
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes.
<b>Sous-embranchement</b>	Angiospermes.
<b>Classe</b>	Eudicotylédones.
<b>Ordre</b>	Rutales.
<b>Sous classe</b>	Rosidées.
<b>Famille</b>	Rutaceae
<b>Genre</b>	<i>Poncirus, Fortunella, et Citrus</i>

## II. Généralités sur l'espèce étudiée: *Citrus aurantium*

### II.1. Identification botanique:

Le bigaradier est un petit arbuste épineux, de croissance rapide, très décoratif de 4 à 5 m de haut, avec des fleurs blanches parfumées, qui produit l'orange amère: *Citrus aurantium* (également appelé orange de Séville) (Fugh-Berman et Myers, 2004, Hadrich et al., 2008).

L'orange amère se distingue des oranges douces par son fruit à peau plus épaisse et plus rugueuse et une pulpe acide et amère (Leroy, 1968) (figure 1).

- Leur feuilles sont vert .Et sont entières, elliptiques, persistantes (Ghédira et Goetz, 2015), elles ont une odeur faible et une saveur amère, elles sont ovales, subaiguës au sommet, à pétiole articulé et plus ou moins ailé, les feuilles mesurent environ 8 cm de longueur et 4 cm de largeur (Escartin, 2011).
- Les fleurs pouvant atteindre 25 mm, sont blanches et très odorantes (Escartin, 2011). Elles sont allongées, elliptiques, pédonculés (Ghédira et Goetz, 2015). possèdent de 4 à 5 pétales imbriqués, et sont souvent recourbées vers l'arrière (Polese, 2008).
- Le fruit est rond parfois un peu aplati ou au contraire légèrement ovale, avec une peau un peu rigoureuse (Polese, 2008). En raison de son goût aigre et amer, il n'a pas été utilisé comme fruit comestible (He et al., 1997).
- Les graines sont de couleur blanchâtre à verdâtre pâle, aplaties et angulaires, et sont polyembryonnaires, (Polese, 2008).



**Figure1** : Fruit du bigaradier.

D'après (Sidana et al., 2012 ) la position systématique de la bigarade est comme suite :

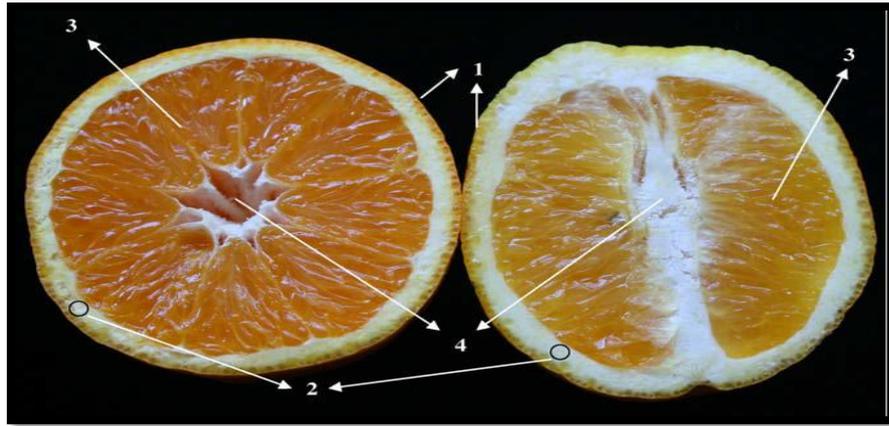
<b>Règne</b>	Plantae
<b>Embranchement</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous classe</b>	Rosidae
<b>ordre</b>	sapindales
<b>famille</b>	Rutaceae
<b>Genre</b>	<i>Citrus</i>
<b>espèce</b>	<i>Citrus aurantium</i>

## II.2. Description morphologique :

Les citrus ont une organisation très spéciale composée de deux parties morphologiques distinctes: le péricarpe et l'endocarpe (pulpe) (Terol et al., 2010).

Les écorces de citrus sont subdivisées en épicarpe ou flavédo (surface périphérique colorée) et mésocarpe ou albédo (Rafiq et al., 2016).

- L'épicarpe est la surface périphérique du fruit. Il est coloré par des pigments caroténoïdes et représente 8 à 10% du fruit, Il contient de nombreuses glandes sécrétrices d'essences aromatiques qui sont réparties de façon irrégulière (M'HIRI, 2015).
- Un mésocarpe (ou *albedo*) est la couche intermédiaire douce et blanche de la peau (Ramful et al., 2010). Il forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit (Bousbia, 2011).Des nombreux cellules parenchymateuses contiennent chacune un cristal prismatique d'oxalate de calcium (Cerdagne, 2004).Elle constitue presque 12 à 13%(M'HIRI, 2015).
- la couche intérieure du fruit ou l'endocarpe, divisé en segments ou carpelles avec des vésicules juteuses (Guimarães et al., 2010).



**Figure2** : Les différents organes de bigarade.

1 - Flavedo (la surface périphérique orange de la peau ou de l'épicarpe); 2 – albédo (la couche médiane blanche en fibres souples de la peau ou du mésocarpe); 3 - la couche intérieure du fruit ou l'endocarpe, divisé en segments ou carpelles avec des vésicules juteuses; 4 -placenta. (Guimarães *et al.*, 2010).

### **II.3. Composition chimique :**

L'écorce des oranges se compose principalement de la cellulose, l'hémicellulose, de substances pectiques, des pigments chlorophylliens et d'autres composés de faible poids moléculaire comme le limonène (Lu *et al.*, 2009). Le limonène est considéré comme le principal composé volatil de l'écorce d'orange amère et de son huile essentielle (Karoui et Marzouk, 2013). L'écorce d'orange contient aussi de l'amidon, des fibres, des graisses et des protéines (Rivas *et al.*, 2008). Elle représente environ 30% de la masse des fruits et les concentrations les plus élevées de flavonoïdes se produisent dans l'écorce (Sawalha *et al.*, 2009).

Les feuilles sont très riches en chlorophylles qui sont responsables de leur pigmentation verte (Bejar *et al.*, 2012), et sont une source importante de composés bioactifs, notamment des antioxydants tels que l'acide ascorbique, les flavonoïdes et les composés phénoliques (Aruoma, 1997 ; Kamran, 2009). Ils contiennent également des protéines, des minéraux et d'autres nutriments intéressants (Ait Mohamed, 2006).

Quant aux pépins, ils sont riches en acides gras insaturés (Bocco *et al.*, 1998).

**Tableau 1:** La composition chimique et valeur nutritive de la bigarade  
(Morton, 1987; Souci *et al.*, 1994; Sidana *et al.*, 2013).

Composant	Bigarade
Minéraux, g	0,3
Carbohydrates, g	10,9
Fibre, g	0,3
Humidité, g	87,6
Protéine, g	0,7
Gras, g	0,2
Vitamine Cmg	30
Carotène (µg)	1104
Vitamine E (tocophérol) (µg)	320
Vitamine B9 (Ac. folique) (µg)	42
Vitamine B3 (nicotinamide) (µg)	300
Vitamine B5 (Ac.pantothénique)	240
Vitamine B6 (pyridoxine)	104
Vitamine B8 (biotine) (µg)	2,30
Thiamine (mcg)	100
Riboflavine (mcg)	40
Calories	37-66
Calcium (mg)	18-50
Fer (mg)	0.2
Phosphore (mg)	12
Vitamine A (mg)	290
Acide ascorbique (mg)	45-90

## **II.4. Utilisation et effet thérapeutique:**

Le fruit, les feuilles, les rameaux et la fleur du *Citrus aurantium* ont de nombreuses applications alimentaires ainsi qu'en parfumerie (EL-Akhal, 2014). Ils ont été utilisés en médecine traditionnelle pour leur bioactivité intéressante tels que les soins de la peau ainsi que leurs effets sédatifs, analgésiques, anti-arythmiques, stomacaux, anti-inflammatoires et anti-rhumatismes (Hadjiakhoondi et Baligh, 2005; Fleming, 2001; Zargari, 1997).

Les feuilles de l'orange aigre sont utilisées pour abaisser la température d'une fièvre qui résulte d'un rhume, pour traiter les symptômes de la grippe (PAUL et al., 1995).

La bigarade est traditionnellement utilisée pour le traitement de l'insomnie, de l'anxiété et de l'épilepsie (Rahnama et al., 2015). Elle déclenche aussi la libération de noradrénaline au niveau des récepteurs bêta-3, favorisant ainsi la dégradation des graisses (Mohamed et al., 2005).

Les fleurs du bigaradier sont utilisées dans le traitement des troubles neurologiques tels que l'hystérie et la neurasthénie (Akhlaghi et al., 2011).

Les extraits d'orange amère sont utilisés comme compléments alimentaires depuis environ 20 ans pour la gestion du poids, la production d'énergie et les performances sportives (Stohs, 2017). Le jus du fruit est utilisé dans les salades pour un goût aigre et l'écorce est utilisée dans la production de confiture (Ersus et Cam, 2007).

Certaines variétés donnent des huiles essentielles rentrant dans la fabrication des parfums, et des savons, elles trouvent également un usage en aromathérapie, et comme principal constituant des boissons gazeuses (Bousbia, 2011).

## **III. Les huiles essentielles:**

Les huiles essentielles des agrumes ont été reconnues comme une ressource importante naturelle, en raison de leur large éventail d'activités biologiques. (Hosniet al., 2010).

### **III.1.Définition:**

Les huiles essentielles sont des produits odorants, de composition généralement assez complexe dont les terpènes sont le plus souvent prédominants en nombre et en concentration, renfermant les principes volatils, non miscibles à l'eau (Vaissière et al., 2019). D'ailleurs le terme « huile essentielle » vient de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, et l'odeur dégagée par la plante productrice (Chemat et al., 2013) .

L'utilisation des huiles essentielles remonte aux plus anciennes civilisations, tout d'abord dans l'Orient et le moyen Orient et par la suite au nord de l'Afrique et en Europe (**Odoul, 2003**).

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place dans différents domaines, aromathérapie, pharmaceutique, parfumerie, cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Amarti, 2009**).

Cependant, il reste difficile d'attribuer une seule définition au terme «huile essentielle» car il en existe plusieurs (**Alloun, 2013**). Selon la pharmacopée européenne (2016), elle désigne un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques n'entraînant pas de changement significatif à sa composition, l'extraction se fait soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, soit par distillation.

### **III.2. Caractéristiques et composition chimique :**

Les HE sont liquides à température ambiante, volatiles, inflammables, odorantes, et leur densité est généralement inférieure à 1 (**Charpentier, 2008**).

Les fruits d'agrumes ont des arômes différents parce qu'ils libèrent de petites quantités de composés volatils dans l'atmosphère. La quantité de ces substances augmente avec la maturité des fruits et l'élévation de la température de stockage. L'émission des substances volatiles augmente aussi considérablement si la peau est blessée ou coupée, car se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles (**Bousbia, 2011**).

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier en fonction du stade de croissance, du climat et du patrimoine génétique de l'espèce (**Orange Douce, 2016**); Ainsi, dans une même plante, la composition chimique peut varier selon la nature de la plante et le sol dans lequel la plante va croître, le temps de récolte, la partie de la plante (feuille, fleur, fruit, bois), la culture biologique et la méthode d'extraction, etc (**Mattar, 2018**).

Des études sur la composition chimique des huiles essentielles ont montré que ce sont des mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: les composés terpéniques tels que les monoterpènes et terpènes sesquiterpéniques; et les composés aromatiques dérivés du

phénylpropane, beaucoup moins fréquents comme l'alcool cinnamique. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradants mettant en jeu des constituants non volatils comme les acides, alcools, aldéhydes, esters, etc (**Bakkali et al., 2008 ; Couic-Marinier et Lobstein, 2013**).

Le limonène comme étant le composé le plus abondant dans les huiles essentielles des agrumes, au-delà de son odeur fruitée, il est réputé pour ses propriétés antiseptiques, antivirales, sédatives et il est employé pour divers usages (**Hamdani, 2018**).

La composition de l'huile essentielle d'orange (*Citrus aurantium*) (**tableau 2**) varie selon les différentes parties d'extraction d'huile. Leur composition comporte une large proportion de Monoterpènes (**Bendali et al., 2019**).

**Tableau 2** : composition des huiles essentielles du *C. aurantium* L. extraites de trois parties différentes de la plante (**Sarrou et al., 2013**).

Essence de Curaçao (écorce)		Essence de Néroli (fleurs)		Essence de Petit grain (feuilles)	
constituant	%	constituant	%	constituant	%
Linalool	29,14	Limonène	94,67	Linalool	58,21
$\beta$ - pinène	19,08	Myrcène	2,00	$\alpha$ -terpinéol	7,11
Limonène	12,04	Linalool	0,76	géranylacétate	4,49
Trans $\beta$ -ocimène	6,06	$\beta$ - pinène	0,62	néryl acétate	2,18
E-farnésol	5,14	$\alpha$ - pinène	0,53	trans $\beta$ -ocimène	4,08

### **III.3. Méthodes d'extractions des huiles essentielles des agrumes**

La production des huiles essentielles dans les plantes est généralement, associée avec la présence des structures spéciales sécrétrices: des cellules sécrétrices, des poiles sécréteurs, des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs et des trichomes glandulaires qui existent dans toutes les parties aériennes de la plante (**Abdelaziz; 2013**).

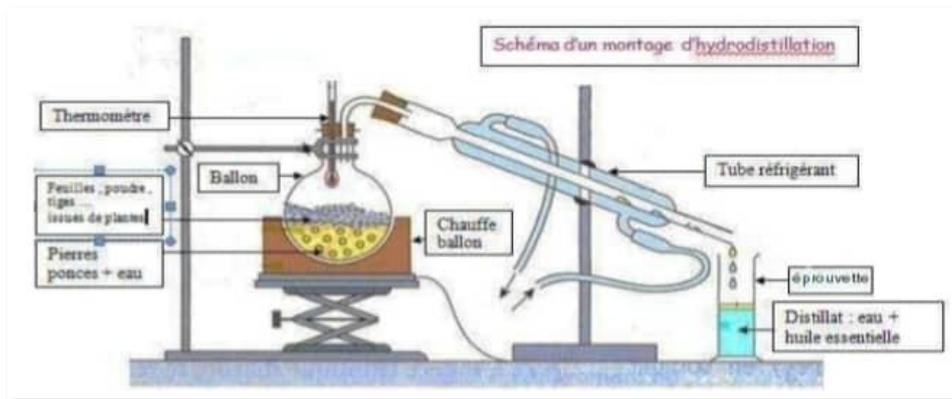
La diversité et la complexité rend le choix d'obtention des huiles essentielles difficile. La méthode ne doit pas conduire à une discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils (**Fernandez et Cabrol-Bass, 2007**).

Cependant, Il existe différentes méthodes d'extractions des huiles essentielles d'agrumes:

- **Hydrodistillation :**

L'hydrodistillation est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des HE à partir d'agrumes; Le principe de la méthode est celui de la distillation des mélanges binaires nom miscibles (**Chouitah, 2014**).

Dans le processus d'hydrodistillation (**Figure 3**), la matière végétale est immergée dans l'eau (contenue dans un flacon) et suivi d'un condensateur, l'ensemble est porté à ébullition, ce qui provoque la libération des huiles essentielles qui s'évaporent et coulent vers le condensateur. (**Gavahian et Farahnaky, 2018**).



**Figure 3:** Montage d'extraction par hydro-distillation

- **Extractions à vapeur d'eau:**

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques: le matériel végétal ne baignant pas directement dans l'eau bouillante (**Franchoime et penoel, 1990**).

- **Extraction par expression à froid :**

Le principe consiste à fondé des ruptures de péricarpes riches en huiles essentielles par un moyen mécanique. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par un courant d'eau. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation (**Farhat, 2010**).

### III.3.Mode d'action des huiles essentielles

L'huile essentielle est connue pour ses propriétés anti-infectieuses, analgésiques, anesthésiantes, cicatrisantes, bactéricides et antiseptiques. Cependant, des données en relation avec des expérimentations récentes ont montré que l'huile essentielle de la bigarade a un effet sur les symptômes de la ménopause, sur l'œdème, effet antidiabétique et radio-protecteur...etc (**Ghédira et Goetz, 2015**). En effet, ce sont des substances que les plantes synthétisent pour se protéger et se défendre contre des bactéries, des virus, des champignons, des insectes ou d'autre prédateurs, pour attirer tout ce qui peut servir à leur survie ou reproduction, pour faciliter des réactions chimiques à l'intérieure d'elles ou pour améliorer leur échange gazeux, hydrique ou nutritif (**Bohning et Seigenthaler, 2008**).

### III.4.Toxicité:

Les huiles et les substances aromatiques ne présentent aucune toxicité si sont utilisées sous contrôle médical et aux doses physiologiques. Les problèmes toxiques peuvent cependant apparaître lors de confusion, de volonté suicidaire ou d'automédication irraisonnée. D'autre part, certaines molécules aromatiques sont potentiellement très toxiques et font l'objet d'interdiction ou de restriction que ce soit en pharmacie, en parfumerie, en arômes alimentaires, ou en nutraceutiques (**Bouyahya et al., 2016**).

Les essences d'agrumes sont toutes photo sensibilisantes, entraînant des réactions épidermiques après exposition au soleil: comme les essences de citron, de mandarine, de bergamote, de pamplemousse, d'orange douce ou encore d'orange amère (**Couic-Marinier et al., 2013**).

Il est indispensable de tester une huile essentielle avant toute utilisation. Car plusieurs facteurs jouent un rôle dans sa dangerosité comme la teneur en molécules toxiques, la manière d'appliquer l'huile essentielle, le dosage ou encore la durée de l'application. Aussi, il convient ne jamais appliquer une huile essentielle pure sur les muqueuses (nez, yeux...etc), ce type d'application nécessite une dilution systématique de l'huile essentielle (**Chavanne, 2011;Muther, 2015**).

#### **IV. Stress oxydatif, radicaux libres et système antioxydant:**

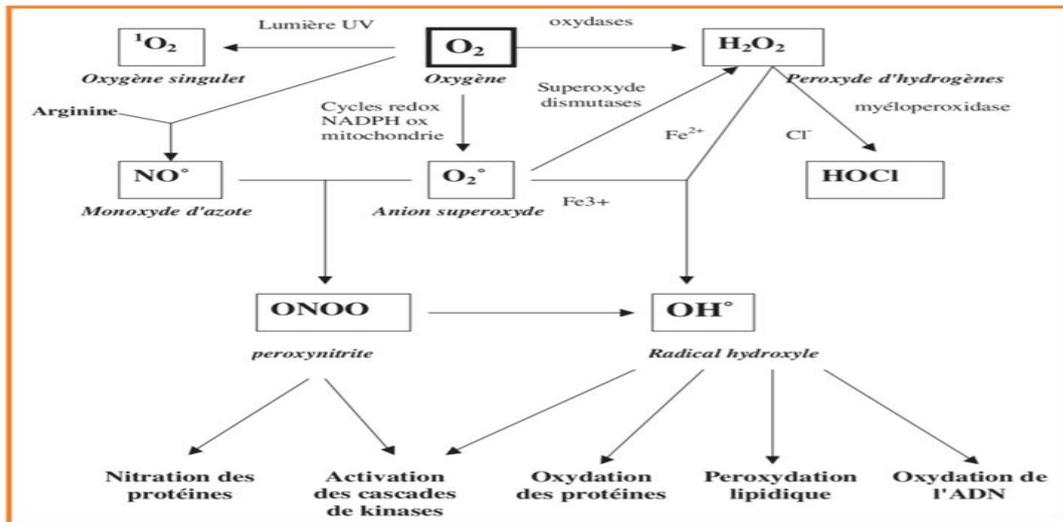
##### **IV.1. Définition du stress oxydatif:**

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre le système oxydant et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé la compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants (**Favier, 2006**).

##### **IV.2. Origine des radicaux libres:**

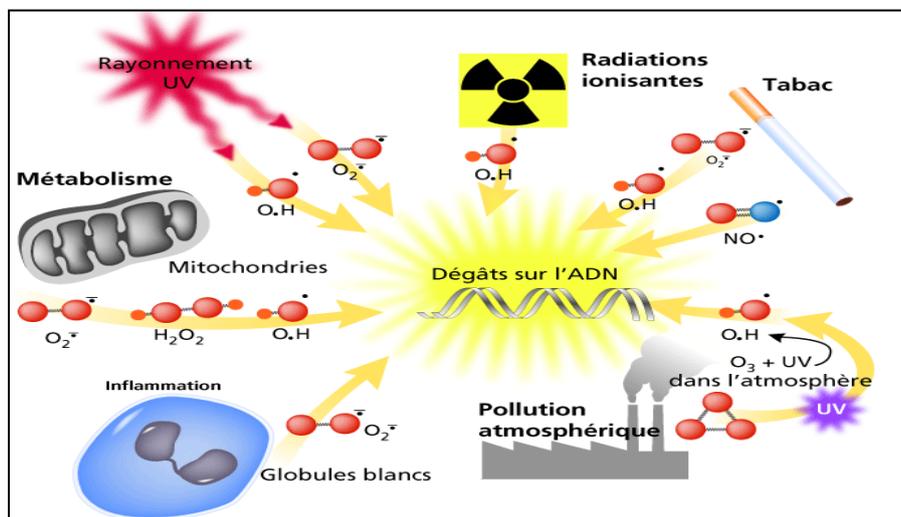
Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés (électron célibataire) sur leur couche extrême, neutres ou chargées formés par voie chimique, photochimique ou biologique. Ils sont très instables, leur durée de vie est généralement très courte, les radicaux libres peuvent être formés par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radical, leur réactivité réside dans la recherche d'un électron afin de réappairier leur électron célibataire; elle entraîne la propagation du phénomène par création d'un nouveau radical (**Tessier et Marconnet, 1995**).

Ces radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l' $O_2$  (**Milane, 2004**), qui est à l'origine de la formation des espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS), incluant : l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ), le monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ), peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ), mais également les composés non radicalaires : l'hydroperoxyde (ROOH), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le dioxygène singulet ( $^1O_2$ ) (**Milane, 2004; Tessier et Marconnet, 1995**) (figure 4).



**Figure4:** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

Cependant, cette production de ROS peut être amplifiée de façon excessive par différents mécanismes physio-pathologiques (inflammation, activité sportive...) ou facteurs environnementaux (tabac, alcool, médicament, rayons gamma ou ultra-violet...) (figure 5), créant le déséquilibre de la balance prooxydant/antioxydant (Youn *et al.*, 2014).



**Figure 5 :** Facteurs intervenant dans l'équilibre de la balance anti/pro-oxydante (Bayr, 2005).

### **IV.3. Maladies liées au stress oxydatif :**

Le stress oxydatif est généré par des situations de stress d'origine physiologique, environnementale ou nutritionnelle. Il peut avoir des conséquences sur la qualité des produits mais aussi sur la santé humaine et la santé des animaux (**Durand et al., 2013**).

Dans plusieurs maladies graves, notamment celles liées au vieillissement, le stress oxydant est le facteur déclenchant originel; c'est le cas des cancers, des pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire) et des maladies neurodégénératives (ataxies, sclérose latérale, maladie d'Alzheimer). Dans de nombreuses autres maladies, le stress oxydant est secondaire à l'établissement de la pathologie, mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires. C'est le cas de maladies infectieuses comme le sida ou le choc septique, le diabète, la maladie de Parkinson ou l'insuffisance rénale (**Favier, 2006 ; Perrotte, 2019**).

Afin de se protéger contre ces pathologies, il est important de disposer de défenses antioxydantes qui doivent nous être apportées par une alimentation saine, particulièrement riche en fruits et légumes (**Haleng et al., 2007**) .

### **IV.3. Les types d'antioxydants:**

Un antioxydant est une espèce chimique plus ou moins complexe diminuant le stress oxydant au sein de l'organisme. Un antioxydant peut prévenir la synthèse de radicaux libres en inhibant l'initiation des chaînes réactionnelles ou désactiver directement les ROS. Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'actions: systèmes enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes oxydantes, chélateurs de métaux et piègeurs de radicaux libres (**Desmier, 2016**).

Il est bien connu que les agrumes sont riches en antioxydants naturels tels que la vitamine C et les caroténoïdes, ainsi que d'autres molécules bioactives tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, etc (**Rapisarda et al., 2008**).

#### **➤ La vitamine C :**

La vitamine C ou acide ascorbique est un nutriment très abondant dans les légumes et les fruits tels que les agrumes, la plupart des mammifères sont capables de la synthétiser dans leur foie ou dans leurs reins, contrairement à l'homme qui doit l'assurer par l'alimentation. La vitamine C (**Figure 6**) est l'antioxydant hydrosoluble majeur et un excellent piègeur des ROS.



Les polyphénols possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (alcoolique (OH), carboxylique (COOH),...). Ces composés sont divisés en classes et présentent une grande diversité de structure en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base (un noyau benzénique)(**Muanda, 2010**).

Les principales classes des composés phénoliques sont : les acides phénoliques; les flavonoïdes et les tanins:

### a) Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont des dérivés d'acides benzoïques et d'acides cinnamiques (**Rentzsch, 2009**), les acides hydroxybenzoïques comprennent l'acide gallique, le p-hydroxybenzoïque, l'acide catéchique, vanillique et syringique, qui ont une structure (**Figure 8**) commune (C6–C1). en revanche, les acides hydroxycinnamiques sont des composés aromatiques d'une chaîne latérale à trois atomes de carbones (C6 – C3), tels que la caféine, d'acide férulique, les acides p-coumarique et sinapique (**Balasundram et al., 2006**).

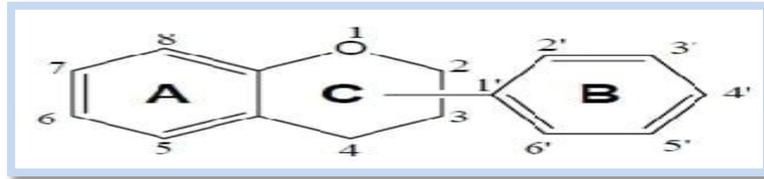


**Figure 8:** structure chimique des acides phénoliques ( **Manach et al., 2004**).

### b) Les flavonoïdes:

Les flavonoïdes sont les composés polyphénoliques les plus abondants contenus dans les végétaux. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Ghedira, 2005**). Leur structure (**Figure 08**) comprend un squelette composé de deux cycles aromatiques (A et B) porteurs de plusieurs fonctions phénol et réunis par une chaîne de trois atomes de carbone, ces derniers étant le plus souvent engagés dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène. La présence de plusieurs fonctions phénol confère à ces composés des propriétés antioxydantes ou oxydantes, suivant la position des phénols et le milieu où la réaction prend place (**Stoclet, 2011**). Pour cela, Les flavonoïdes sont des contributeurs majeurs dans l'activité antioxydante présente dans les agrumes (**Bohui et al, 2018**).L'écorces et les graines d'agrumes sont très riches en composés phénoliques, la peau est riche en flavonoïdes que les graines(**Sawalha et al., 2009**).

En fonction des particularités structurales (**Figure 9**), les flavonoïdes sont répartis en six grandes classes: anthocyanes (baies, fruits rouges, vin) ; flavanols (fruits, cacao, thé, vin) ; flavonols (oignons, brocolis, tomates, thé) ; flavones (tisanes, plantes aromatiques) ; flavanones (agrumes) ; isoflavones (soja, légumineuses) (**Morand, 2014**).



**Figure 9:** Structure de base des flavonoïdes ( **Erdman et al., 2007**).

**c) Les tannins:**

Les tanins constituent le troisième groupe important de composés phénoliques, ce sont des métabolites secondaires des plantes, leur conférant une protection contre les prédateurs (herbivores et insectes). Ils se divisent en deux catégories selon leur structures: les tanins hydrolysables (groupe principalement responsable des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes) et les tanins condensés (ils ne traversent pas la barrière intestinale, ils sont donc beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables (**Paolini, 2003**).

**IV.5. Activité antioxydante des Citrus :**

Les Citrus sont des fruits largement consommés dans le monde. Sur le plan nutritionnel, comme beaucoup de fruits, ils apportent des composés de nature organique et minérale connus pour jouer un rôle biologique primordial (**Rock et Fardet, 2014**).

En effet, la consommation fréquente des fruits et légumes est associée à un moindre risque de cancer et de maladies cardiovasculaires(**Liu et al., 2000, Bazzano et al., 2002**), en raison de leur forte activité antioxydante (**Baratto et al., 2003, Katalinic et al., 2006**) ainsi que leur activité de piègeur puissant contre les radicaux libres (**Kumaran et Karunakaran, 2007**).

En effet, Plus de 170 antioxydants provenant des agrumes ont été signalés dans la littérature actuelle, y compris les vitamines, les éléments minéraux, les composés phénoliques, terpénoïdes et pectine (**Zhuo Zou et al., 2015**). La nature chimique de ces composés, minérale ou organique, permet de les classer en antioxydants indirects comme Cu, Zn, Se, agissant comme cofacteurs d'enzymes antioxydantes ou en antioxydants directs comme piègeurs d'espèces chimiques initiatrices et/ou présentant un pouvoir réducteur: vitamines (A,B,C,E), polyphénols , caroténoïdes (**Rock et Fardet, 2014**).

# **Matériel et Méthodes**

**I. Matériel végétal:**

Le matériel végétal est constitué de l'orange amère ou bigarade (*Citrus aurantium*), plus précisément : les feuilles, les écorces et les pépins. La récolte a été faite manuellement dans la région d'Aïn-Témouchent, située dans le Nord Ouest Algérien, durant le mois de janvier 2020. Les fruits étaient bien murs et ne présentaient aucun signe de blessure ou d'infection.

**II. Préparation des échantillons:**

Les oranges amères récoltées ont été bien lavées à l'eau du robinet, pour les débarrasser de la poussière puis séchées et épluchés, Les écorces étaient coupées en petits morceaux.

Les oranges ont été coupées ensuite pour faciliter l'extraction des pépins, qui ont étaient lavés abondamment avec l'eau du robinet.

Les écorces et les pépins ainsi que les feuilles ont étaient mis dans l'étuve à 40°C pendant 24 heures. Une fois séchés (figure 10), ils ont été broyés à l'aide d'un mixeur électrique pour obtenir des poudres fines. Ces dernières ont été ensuite conservées hermétiquement dans des bocaux en verre et stockées à l'abri de la lumière pour les prochaines utilisations.

Les oranges amères destinées à l'extraction de l'huile essentielle, ont été soigneusement épluchées, afin de récupérer la partie flavédo des écorces fraîches.



**Figure 10** : écorces, feuilles et pépins après séchage (Photo originale).

## II.1. Préparation des extraits: (extractions des composés phénoliques)

Après une étude bibliographique sur les différents procédés et solvants d'extraction des composés phénoliques, nous avons opté pour le protocole de **M'hiri et al., (2014)**.

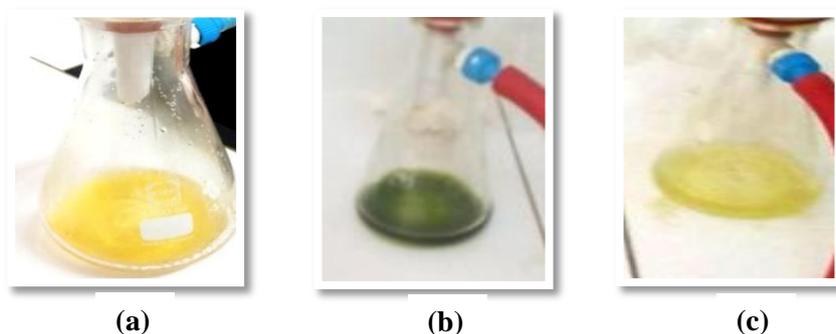
- **Mode opératoire:**

Une prise d'essai de 10g de poudre végétale (écorces, feuilles et pépins) est mise en contact avec l'éthanol/eau à 80%. En effet, l'éthanol et le méthanol sont des solvants qui donnent des taux élevés en composés phénoliques (**Li et al., 2006**). Cependant, nous avons choisi l'éthanol parce qu'il est plus respectueux pour l'environnement et donc plus utilisé dans les applications industrielles (**Bartnick et al., 2006**).

L'ensemble est laissé macérer sous agitateur magnétique pendant 1h pour extraire le maximum de molécules, à température de 35°C à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation, L'agitation des particules dans le solvant permet leur maintien en suspension et l'homogénéité des milieux. En plus, l'extraction a lieu par pénétration du solvant dans la cellule végétale, phénomène provoquant leur gonflement et la rupture des liaisons moléculaires de faible énergie. Les extractibles sont alors dissouts et diffusent progressivement des cellules vers le solvant (**Royer et al., 2010**).

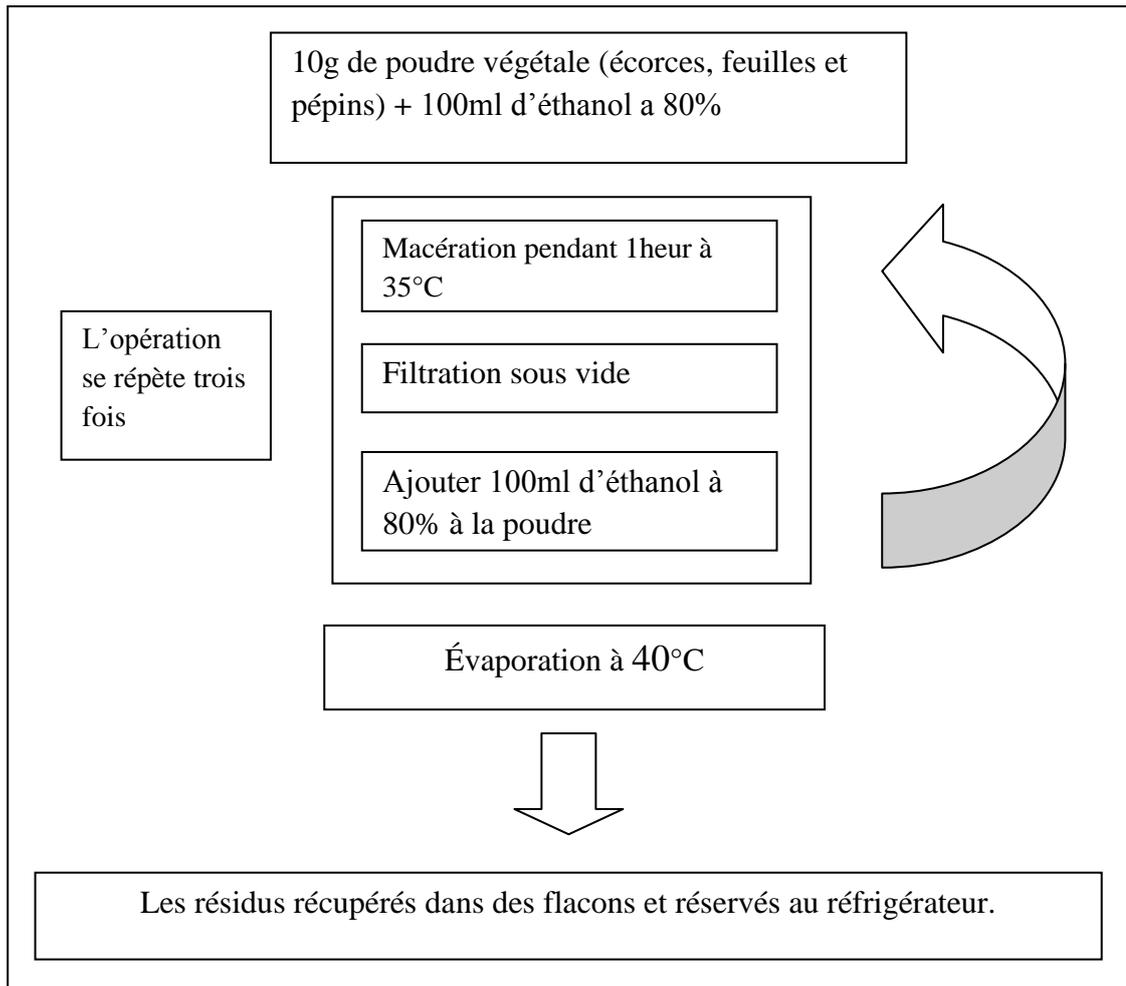
De chaque matière végétale, nous avons préparé 3 essais, avec renouvellement du solvant. En effet, trois extractions sont suffisantes pour obtenir plus de 95% de la teneur en composés phénoliques (**M'hiri, 2015**).

Les trois solutions sont réunies et filtrées sous vide, puis évaporées à sec sous pression réduite dans un rotavapor rotatif à une température de 40°C. Les résidus obtenus sont pesés et récupérés sous forme solide dans des flacons en verre hermétiquement fermés, bien étiquetés à l'abri de la lumière et conserver au le réfrigérateur.



**Figure11:**Les différents extraits d'écorces, feuilles et pépins (photo originale).

(a) : Extrait d'écorces; (b): extrait de feuille; (c): extrait de pépins.



- **Calcul du rendement:**

Nous avons déterminé le rendement en extrait sec des trois parties du *Citrus aurantium*, en calculant le rapport selon la formule suivante:

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{P1 - P2}{P3} \times 100$$

P1: poids du ballon après évaporation;

P2: poids du ballon avant évaporation;

P3: poids de la matière végétale initiale.

## **II.2. L'extraction de l'huile essentielle:**

Nous avons fait l'extraction de l'huile essentielle à partir de l'écorce fraîche du *Citrus aurantium*. Pour cela nous avons utilisé des fruits fraîchement récoltés, au niveau de la wilaya d'Aïn-Témouchent. Ces derniers ont été soigneusement lavés pour les débarrasser de la poussière, puis épluchés à l'aide d'un couteau en évitant d'inclure l'albédo (la matière blanche de l'écorce), ensuite ils ont été coupés en petits morceaux.

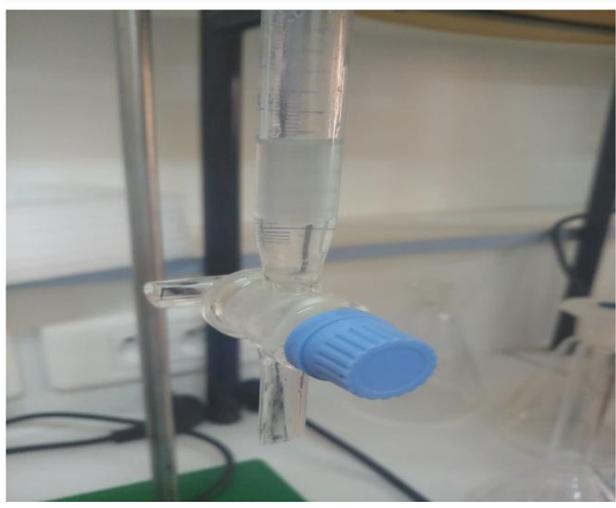
La quantité des zestes frais obtenue est ensuite utilisée dans le but d'obtenir l'huile essentielle en vue d'évaluer son activité antioxydante.

- **Protocole expérimentale:**

L'extraction de l'huile essentielle du *Citrus aurantium* a été obtenue par la technique d'hydrodistillation.

Des quantités de zestes du *Citrus aurantium* frais sont introduites dans un ballon contenant de l'eau distillée porté à ébullition pendant 3h. Après obtention de la première goutte d'huile essentielle, les vapeurs chargées de substances volatiles sont condensées dans un réfrigérant et l'huile se sépare de l'eau par deux phases organiques, surnageant (huile essentielle) et aqueuse par différence de densité.

L'huile essentielle extraite est conservée à une température de 4°C, dans des tubes en verre, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air et de la lumière pour éviter la dégradation des molécules.



**Figure 12:** extraction de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* par hydrodistillation.

- **Rendement en huile essentielle:**

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids d'huile essentielle extraite et le poids de la biomasse végétale utilisée (Foe *et al.*, 2016)

Nous avons calculé le rendement en huile essentielle extraite à partir de l'écorce du *Citrus aurantium* selon la formule suivante:

$$\text{Rdt (\%)} = (\text{P}_{\text{HE}}/\text{P}_{\text{mv}}) \times 100$$

- $\text{P}_{\text{HE}}$ : poids de l'huile essentielle récupérée (g).
- $\text{P}_{\text{mv}}$ : poids de la matière végétale (g).

### II.2.1. Propriétés physicochimiques de l'huile

#### II.2.1.1. L'indice de réfraction:

L'indice de réfraction est considéré comme un critère de pureté d'une huile, Il varie en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente ainsi qu'en fonction de la température à laquelle l'analyse se fait. Cet indice est proportionnel au poids moléculaire des acides gras ainsi qu'à leur degré d'insaturation (Novidzroet *al.*, 2019).

L'indice de réfraction ( $\text{N}_d^t$ ) 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 comme suit:

- Réglage du réfractomètre en mesurant les indices de réfraction d'eau distillée à 20 °C.
- Ouvrir le prisme secondaire et déposer quelques gouttes de l'huile essentielle sur la partie centrale du prisme principal, fermer ensuite le prisme secondaire.
- Attendre que la température soit stable, puis régler le réfractomètre d'une manière à obtenir une moitié supérieure claire et une autre moitié inférieure sombre au niveau du cadran.
- effectuer la mesure.



**Figure 13 :** réfractomètre (PCE instruments, 2020).

### II.2.1.2. Détermination de la densité:

La densité relative de l'H.E est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile et la masse égale de volume d'eau distillée à 20°C (Boughendjioua et Djeddi, 2017).

### III. Tests phytochimiques:

L'examen phytochimique permet de détecter la présence ou l'absence des constituants chimiques à partir d'extrait de plantes ou directement sur la poudre d'échantillon à analyser.

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les trois extraits (écorces, feuilles et pépins) du *Citrus aurantium*.

#### Protocole :

- **Flavonoïdes** : Ajoutez à la solution d'extrait à tester, quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl), l'apparition d'une coloration rose ou rouge indique la présence de flavonoïdes.
- **Tanins** : La présence de tanins est démontrée en ajoutant à chaque extrait dilué (1/10), 1 à 2 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> (0.1%), L'apparition d'une couleur vert foncé indique un tanins catéchiques ou noir bleu indique la présence de tanins galliques (Karumi et al., 2004).
- **Saponosides**: Ajoutez à 5 ml d'extrait un volume de 10ml d'eau distillée, agiter pendant 2mn, la présence des saponosides est confirmé par l'apparition d'une mousse persistante pendant 15 mn (Haddouchi et al., 2016).
- **Stéroïde**: 2 ml d'anhydride d'acide acétique ont été ajoutés au résidu de chaque extrait avec 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La couleur vert, bleu ou violet indique la présence de stéroïdes (Justin et al., 2014).
- **Terpénoïdes** : 5 ml de chaque extrait ont été mélangés dans 2 ml de chloroforme. 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré ont ensuite été ajoutés pour former une couche. Une coloration précipitée brun rougeâtre à l'interface formée indique la présence de terpénoïdes (Justin et al., 2014).
- **Alcaloïdes**: 1 ml de chaque extrait est pris en tubes avec 5 gouttes de réactif Wagner, l'apparition de un précipité, révèle la présence d'alcaloïdes (Wagner, 1983).

- **Mucilages** : Introduire 10 ml d'NaOH de ou MeOH dans un tube à essai contenant l'extrait, l'obtention d'un précipité violet ou bleu indique la présence de mucilages (**El-Haoud et al., 2018**).
- **Quinones** : La présence de quinones est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH 1/10 aux résidus, la couleur vire au jaune, rouge ou violet (**El-Haoud et al., 2018**).

### IV. Dosage des composés phénoliques:

#### IV. 1. Dosage des phénols totaux

L'estimation quantitative des polyphénols totaux dans les trois extraits, écorces, feuilles et pépins, du *Citrus aurantium* été réalisée à l'aide du réactif Folin-Ciocalteu (**Wong et al., 2006**).

- **principe:**

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans chaque extrait. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. (**Boizot et Charpentier, 2006**).

- **Mode opératoire :**

Une quantité de 100µl de chaque extrait (écorces, feuilles et pépins) est mélangée avec 2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) et laissée réagir pendant 5 min. Après on ajoute 2,5ml d'une solution saturée de  $Na_2CO_3$ . Après une heure à l'obscurité l'absorbance est mesurée à 725 nm (**Wong et al., 2006**).

Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique/gamme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS). Une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de l'acide gallique à différentes concentrations est faite dans les mêmes conditions que les échantillons.

#### **IV.2. Dosage des flavonoïdes:**

- **principe:**

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode décrite par **Kim et al., (2003)**. C'est une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510nm.

- **Mise on ouvre pratique:**

Une quantité de 100 µl de chaque extrait (écorces, feuilles, pépins) du *Citrus aurantium* est mélangée avec 0,4 ml d'eau distillée, et 0,03 ml d'une solution de nitrate de sodium  $\text{NaNO}_2$  à 5% .Après 5 minutes, 0,02ml d'une solution d' $\text{ALCL}_3$  à 10% est additionnée au mélange. Après 5 minutes on additionne au mélange 0,2 ml de solution  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1M) et 0,25 ml d'eau distillée. Après on agite l'aide d'un vortex et en mesure l'absorbance à 510nm.

La teneur en flavonoïdes est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par la catéchine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons.

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

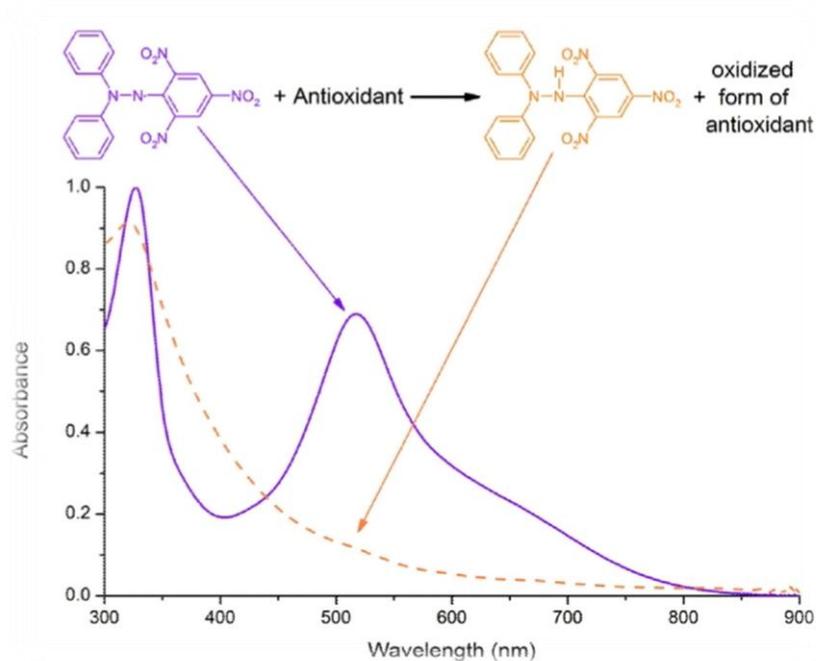
#### **V. Évaluation de l'activité antioxydante par le piégeage du radical libre DPPH**

L'activité antioxydante des extraits d'écorce, feuille, pépins et l'huile essentielle a été effectuée par le test DPPH.

- **Principe:**

Le DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable, de couleur violacée, soluble dans le méthanol ou l'éthanol. Il absorbe dans le visible à une longueur d'onde autour 515 nm en raison de la présence d'un électron non apparié. En présence d'un antioxydant (donneur d'hydrogène), l'électron devient apparié et l'intensité d'absorption diminue (**Wollinger et al., 2016**), se traduisant par la réduction du DPPH en 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine de couleur jaune. En effet, une meilleure activité anti radicalaire est indiquée par une faible absorbance (figure 14) (**Milardovic, 2014**).

Cependant, les absorbances mesurées à 515 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de nos échantillons.



**Figure 14 :** Courbe de réaction entre le radical DPPH (violet) et un antioxydant donnant la molécule DPPH neutralisée (orange).

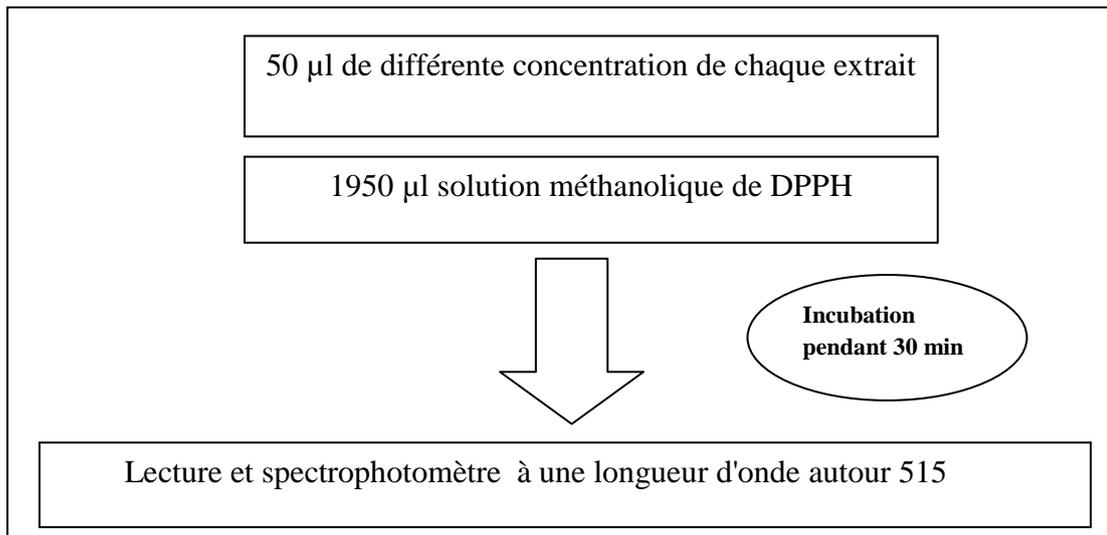
- **Mode opératoire:**

Le protocole expérimental utilisé pour déterminer la capacité antioxydante à piéger le radical DPPH et celui de **SanchezMoreno, (1998)**.

La solution DPPH est préparée par la solubilisation de 2,4mg dans 100ml de méthanol .Un volume de 50µL de différentes concentrations de chaque extrait (écorces, feuilles et pépins) est ajouté à 1950µL de la solution méthanolique du DPPH fraîchement préparé. Pour chaque concentration un blanc est préparé. Concernant le contrôle négatif, il est préparé en parallèle en mélangeant 50µL de méthanol avec 1950µL de la solution méthanolique de DPPH.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min, à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif.



- **Expression des résultats:**

Le calcul des pourcentages d'inhibition est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

- **Calcul des IC50:**

L'IC50 est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH. Elle a été par la suite calculée à partir de l'équation des courbes tracées qui déterminent le pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations.

# **Résultats et Discussions**

## I. Étude phytochimique

### I.1. Les tests phytochimiques

Les tests phytochimiques est un ensemble de méthodes réalisées sur différents extraits préparés à partir de matériel végétal réduit en poudre mettant en évidence la présence de métabolites secondaires. Les méthodes de détection consistent en une précipitation ou une coloration par des réactifs spécifiques. Ces tests ont permis de détecter les différentes familles de composés par des réactions de caractérisation.

Les résultats du screening phytochimique réalisé sur les trois extraits bruts du *Citrus aurantium* (écorces, feuilles et pépins) sont mentionnés dans le tableau N°3 :

	Ecorces	Feuilles	Pépins
<b>Flavonoïdes</b>	+	+	+
<b>Tanins</b>	+	-	+
<b>Saponosides</b>	-	-	-
<b>Stéroïdes</b>	-	-	+
<b>Terpenoïdes</b>	-	+	-
<b>Alcaloïdes</b>	-	-	-
<b>Mucilages</b>	+	+	+
<b>Quinones</b>	+	-	+

Nous remarquons que les trois extraits testés sont riches en flavonoïdes et en mucilages, tandis que les tanins galliques sont surtout présents dans les écorces et les pépins.

La famille des stéroïdes est présente dans l'extrait des pépins et absente dans celui des feuilles et écorces, contrairement aux terpenoïdes qui sont présents seulement dans les feuilles, et les quinones dans les écorces et pépins. Par contre, les saponosides et les alcaloïdes sont absents dans les trois extraits étudiés.

Nos résultats phytochimiques corroborent avec les travaux de Brix Gormat et al. (2015) qui ont montré la présence des flavonoïdes, tanins et stérols et l'absence des saponosides dans les pépins de l'orange amère de la région de Tlemcen. En revanche, les résultats d'Arora et Kaur (2013), ont montré la présence des alcaloïdes et les terpenoïdes et l'absence des quinones dans l'écorce d'orange, ce qui est contradictoire avec nos résultats. Aussi, l'étude de

Oulebsir-Mohandkaci et al., (2016) a montré la présence des tanins, des saponosides, des flavonoïdes, des mucilages et l'absence de alcaloïdes dans les feuilles d'orange amère dans la région d'Annaba (Est de l'Algérie).

Les résultats de ces tests phytochimiques sont préliminaires et qualitatifs, ils nous renseignent sur les phytoconstituants majoritaires présents dans les parties de l'orange amère. Cette différence dans les résultats peut être due à plusieurs facteurs tels que la nature du solvant, la méthode d'extraction, la période de récolte ou aux facteurs génétiques, climatiques et édaphiques de la région de la récolte (Lagha-benamrouche et al., 2017).

En effet, la composition chimique de l'ensemble des agrumes et de leurs sous-produits peut varier en fonction de l'écologie et du stade de maturation de ces derniers (Sun et al., 2005; Huang et al., 2007)

### I.2. Les rendements en extrait sec :

Les extractions des composés phénoliques dans les différentes parties du *Citrus aurantium*, nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait : écorce, feuilles et pépins.

Les taux de rendement de chaque partie analysée de l'orange amère sont exprimés en pourcentage (%) et sont illustrés dans la figure ci-dessous.

D'après les résultats, on observe que le rendement le plus élevé est celui de l'écorce ( $32,83 \pm 2,76$ ) suivi par les feuilles ( $20,30 \pm 3,79$ ) et enfin les pépins avec un faible rendement ( $8,75 \pm 0,91$ ).

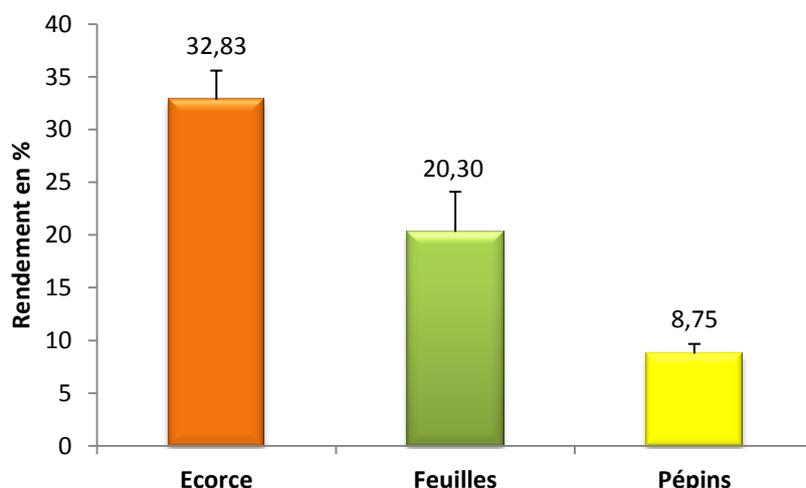


Figure15: Rendement des extraits secs d'écorces, feuilles et pépins du *Citrus aurantium*.

Le taux de rendement d'écorce obtenu dans notre travail est supérieur à celui obtenu par Muthiah *et al.*, (2012), estimé à 22,12%, dans les régions de Maduraie en Inde, qui ont utilisé l'éthanol comme solvant d'extraction. Cependant, notre résultat est presque similaire à celui obtenu par Meziani et Saidoune, (2017) avec un pourcentage de 36% ; ces derniers ont utilisé le méthanol comme solvant d'extraction. De même, le rendement de l'extrait des feuilles reste presque similaire à celui de Muthiah *et al.*, (2012) avec un pourcentage de 17,5% pour la même espèce.

Le taux de rendement d'extraction des pépins de la bigarade obtenu par Meziani et Saidoune, (2017) réalisé par le méthanol (36,6%) dans la région de Bejaïa est supérieur par rapport à celui obtenu dans notre travail.

Toutefois, Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est qu'une grandeur relative et semble être lié à plusieurs facteurs tels la méthode d'extraction choisie, le solvant utilisé et sa polarité, l'origine géographique de la plante étudiée ainsi que sa préparation (conservation, séchage et broyage) (**Ghalem *et al.*, 2014**). Cette présence peut être expliquée par la différence des méthodes et des solvants d'extraction utilisés, par des facteurs génétiques, climatiques et édaphiques de la région de la récolte (**Lagha-benamrouche *et al.*, 2017**). Par exemple, le séchage empêche la dégradation des écorces d'agrumes mais il peut affecter le rendement d'extraction et les composés phénoliques des citrus (**Giannuzzo *et al.*, 2003**). Aussi, l'extraction au solvant donne une récupération raisonnable, mais présente certains inconvénients, comme son évaporation qui ajoute des coûts supplémentaires et une possible perte de qualité (**Li *et al.*, 2006**).

### 1.3. Extraction et analyse de huile essentielle :

#### 1.3.1. Caractères organoleptiques :

L'huile essentielle extraite à partir des écorces fraîches du *Citrus aurantium*, par la technique d'hydrodistillation, est d'un aspect liquide visqueux et limpide, ayant une coloration transparente avec de fortes et persistantes odeurs caractéristiques, fraîches et aromatiques.

### 1.3.2 Rendement de l'huile essentielle:

Le résultat du rendement de l'huile essentielle obtenu à partir des écorces est illustré dans le tableau 4, Il est estimé par une moyenne de  $1,43 \pm 0,31$ .

Par comparaison aux autres études qui ont été faites sur les huiles essentielles extraites à partir de l'écorce de la même espèce du *Citrus aurantium*, le résultat obtenu 1,43% est supérieur à ceux rapportés par Hosni et al. (2010) sur *Citrus aurantium* tunisien (1,24%), et celui obtenu par Djenane, (2015) (0,60%) récolté en Algérie. Cependant, les résultats publiés par Oulebsir-Mohandkaci et al., (2016) ont montré un rendement plus élevé en HE (9,1%) extraite par hydrodistillation à partir des écorces fraîches de la bigarade.

L'ensemble des paramètres comme l'origine géographique, la méthode et la période d'extraction de l'huile ainsi que la maturité du fruit mais également l'organe de la plante utilisée et le degré de fraîcheur peuvent être la cause de ces différents rendements (**Djenane, 2015**).

### 1.3.3. Étude physicochimique :

Afin de contrôler la qualité de l'huile essentielle étudiée, nous avons déterminé la densité ainsi que l'indice de réfraction de cette huile (tableau 4) :

**Tableau 4 :** La Densité, l'indice de réfraction et le rendement en huile essentielle de l'écorce de *Citrus aurantium* extraite par la méthode d'hydro-distillation.

Taux	Rendement (%)	Densité	Indice de réfraction
Huile essentielle	$1,43 \pm 0,319$	$0,705 \pm 0,05$	1,473

#### ▪ La densité :

On remarque que le résultat de la densité de l'HE obtenue  $0,705 \pm 0,05$  est inférieur à celui de l'eau (1kg/L). On peut dire que l'huile essentielle de *Citrus aurantium* extraite à partir des écorces fraîches est conforme aux normes internationales. Selon l'association Française de Normalisation, les HE appartenant aux genres *Citrus* doivent avoir une densité maximale de 0,876 (**Afnor, 2002**). La densité est un critère très important pour évaluer la qualité et la naturalité d'une H.E dans différents domaines.

- **L'indice de Réfraction :**

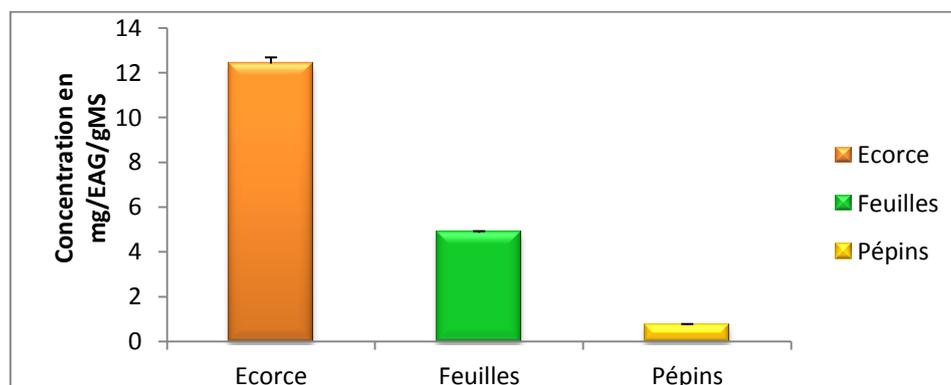
L'indice de réfraction de l'huile de notre échantillon est estimé à 1,473 ; ce résultat est similaire à celui obtenu par Boukhenouf et *al.*, (2019) de l'H.E des écorces de bigarade de la région de Mascara (Ouest d'Algérie) (1,472). En outre, notre résultat se situe dans l'intervalle de l'indice de réfraction obtenus par Pradhan et *al.*, (2019) à partir des huiles essentielles des écorces des différents genre de *Citrus* (*C. reticulata*, *C. maxima* et *C. jambhiri*) qui oscillent entre 1,48-1,49.

Ces résultats sont supérieurs à l'indice de réfraction de l'eau, qui est égale à 1,333. Cela explique la capacité importante de l'huile essentielle *Citrus aurantium* pour réfléchir la lumière, ce qui permet leur utilisation dans des domaine différents (Metoui et *al.*, 2015).

#### I.4. Teneurs en composés phénoliques :

Le dosage des polyphénols totaux dans les trois extraits (écorces, feuilles et pépins) a été réalisé par la méthode colorimétrique qui utilise le réactif de Folin-Ciocalteu. Une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de l'acide gallique à différentes concentrations est réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons (voir annexe 6). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique/gamme de matière végétale sèche (mg EAG/g MS).

D'après les résultats obtenus dans les trois extraits du *Citrus aurantium* (figure 16), on remarque que l'extrait d'écorce représente la teneur la plus élevée en polyphénols estimée à  $12,415 \pm 0,27$  mg EAG/g MS suivi par les feuilles et les pépins avec des concentrations de  $4,86 \pm 0,07$  mg EAG/g MS et  $0,77 \pm 0,01$  mg EAG/g MS respectivement.



**Figure 16:** Teneur en composés phénoliques des écorces, feuilles et pépins Du *Citrus .aurantium*.

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.

Les teneurs en composés phénoliques de l'écorce du *Citrus aurantium* ( $31,62 \pm 0,88$  mg GAE/g MS) cultivé en Algérie, déterminées par Lagha Benamrouche et Madani (2013) et celles obtenues par Ghasemi et al., (2009) (223,2 mg EAG/g MS) pour la bigarade Iranienne sont supérieures par rapport à nos résultats. D'autres études réalisées sur les feuilles du *Citrus aurantium* ont donné des taux de polyphénols plus élevés, de l'ordre de  $69,97 \pm 1,67$  mg GAE/g MS (Khettal et al., 2017) et de  $(44,41 \pm 0,49$  mg GAE/g MS) (Benamrouche et Madani, 2013).

En plus, Moulehi et al., (2012) ont trouvé des teneurs plus élevées en composés phénoliques dans les pépins des oranges amères cultivés en Tunisie (1,35 mg GAE/g MS, 0,68 mg GAE/g MS et 2,11 mg EGA/g MS) à différents stades de leur maturation (immature, semi-mature et mature respectivement).

La différence entre les résultats obtenus et ceux des différents travaux peut être liée aux conditions de travail, les solvants et les méthodes d'extractions utilisées ainsi que la température et la durée d'incubation.

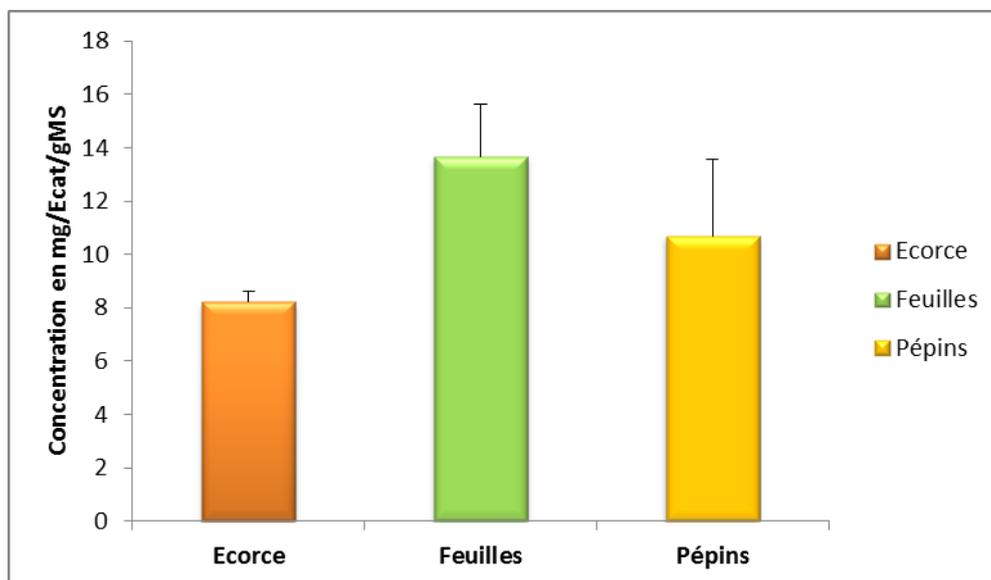
En général, les solutions d'éthanol ou de méthanol contenant de l'eau, en particulier celles constituées de 40 à 80% d'éthanol ou de méthanol, avaient une plus grande efficacité dans l'extraction des composés polyphénoliques que l'eau ou l'éthanol pur ou le méthanol (Suzuki et al., 2002).

En effet, la solubilité des composés phénoliques est influencée par la polarité du solvant, le degré de polymérisation des composés phénoliques, ainsi que l'interaction des composés phénoliques avec d'autres constituants alimentaires et la formation de complexes insolubles (Nacz et Shahidi, 2004). En plus, la présence de certains groupes chimiques (acide ascorbique, acides organiques, sucres, amines aromatiques) peuvent également réagir avec le réactif Folin-Ciocalteu (Ghafar et al., 2010).

### I.5. Teneurs en flavonoïdes :

Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits d'écorce, feuilles et pépins, ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et du nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ). Une courbe d'étalonnage a été réalisée avec la catéchine, comme molécule de référence, utilisée à différentes concentrations (voir annexe 9). La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme équivalent de catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg ECAT/g MS).

Selon les résultats présentés dans la figure 17, Les feuilles représentent la valeur la plus élevée en flavonoïdes  $13,67 \pm 1,96$  mg ECAT/g MS suivi par les pépins avec une concentration de  $10,68 \pm 2,88$  mg ECAT/g MS et l'écorce en dernier avec une teneur faible de  $8,12 \pm 0,39$  mg ECAT/g MS.



**Figure 17 :** Teneur en flavonoïdes d'écorces, feuilles et pépins du *Citrus aurantium*.

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

En comparant nos résultats à d'autres travaux, nous remarquons que les teneurs en flavonoïdes des feuilles des oranges amères de notre étude sont supérieures à ceux trouvés par Al-Anbari et Hasan (2015) avec une valeur de 1,235 mg ECAT/g MS, aussi, Lagha-Benamrouche et Madani (2013) ainsi que Khettal et al., (2017) ont trouvé des valeurs inférieures ( $3,25$  mg EQ/g MS et  $5,08 \pm 0,40$  mg QE/g MS respectivement).

Les teneurs des pépins de bigarade en flavonoïdes obtenues par Al- Anbari et Hasan, (2015) ( $3,713$  mg/g MS) (cultivé en Angleterre) ainsi que les valeurs de bixi gormat et al., (2015) pour l'orange amère de la région de Tlemcen qui ont utilisé deux solvants d'extractions acétate d'éthyle et n-butanol ( $0,033 \pm 0,004$  mg CE/gMS et  $0,043 \pm 0,005$  mg CE/g MS) sont inférieures à par rapport à celles trouvées dans notre étude.

Cependant, l'extrait de l'écorce des oranges amères de notre étude sont supérieurs à ceux de l'orange amère de la région de Bejaia ( $1,17 \pm 0,01$  mg CE/g MS) (Lagha-Benamrouche et Madani, 2013).

Plusieurs facteurs peuvent influencer les quantifications des flavonoïdes tels que la variété, les conditions environnementales, le mode d'extraction des substrats, la conservation, le degré de maturation des fruits et les facteurs génétiques (**Rapisarda et al., 1999; Barberan et Espin, 2001**).

Plusieurs flavonoïdes comme la naringine, l'hespéridine et la néohespéridine sont connus pour leur accumulation dans les espèces de *Citrus*, et sont responsables du goût amer de la plante (**Peterson et al., 2006**).

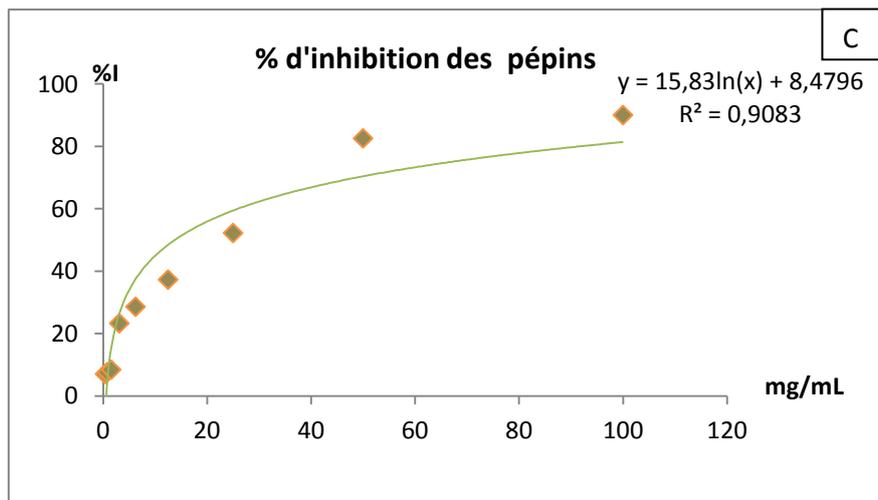
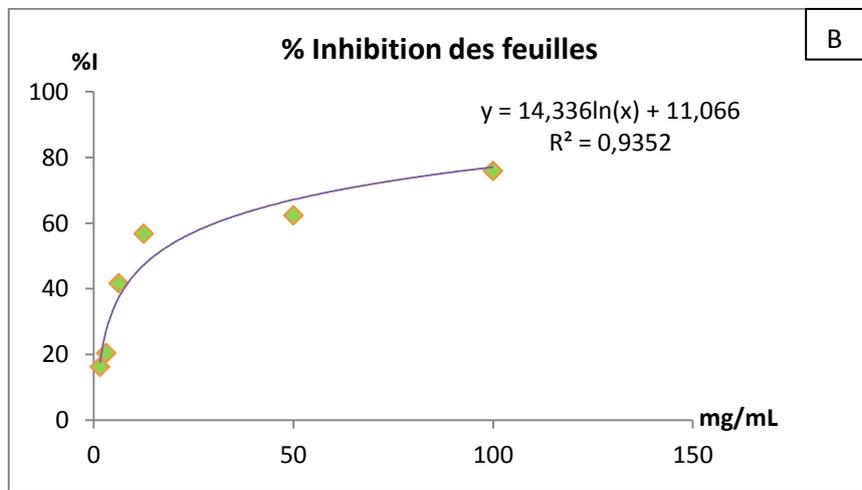
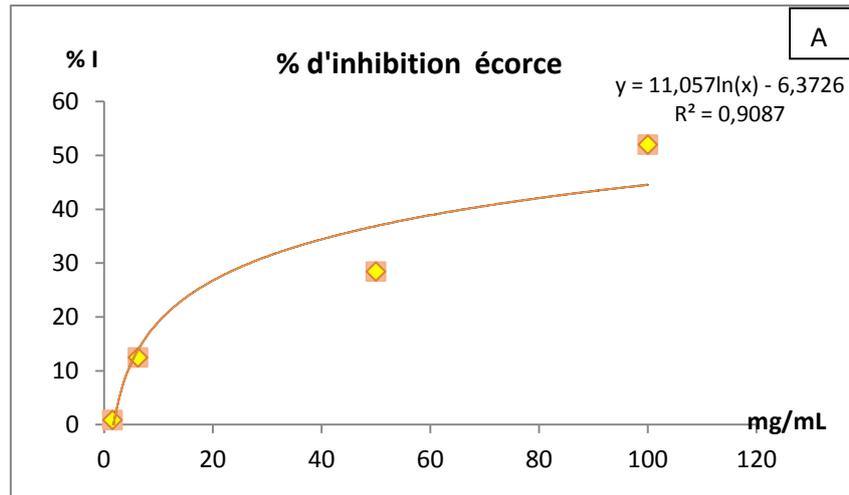
### II. L'activité antioxydante :

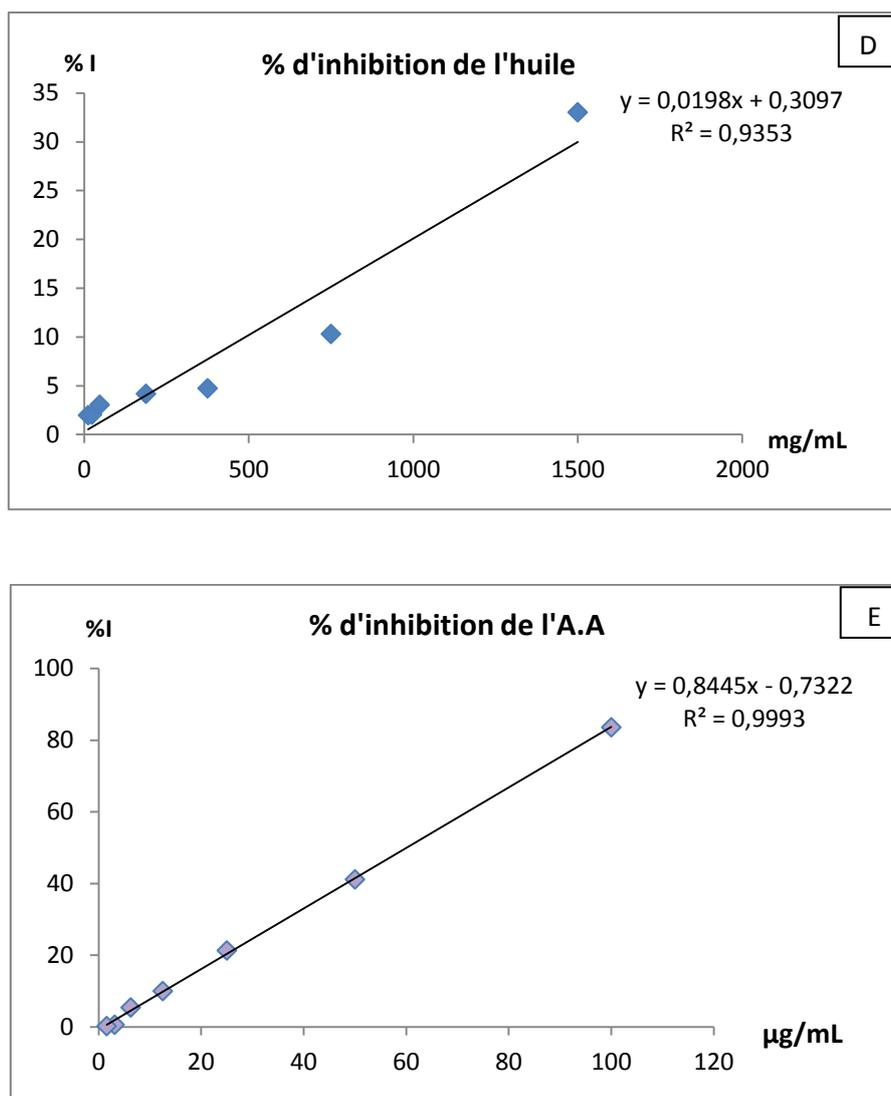
Il existe un certain nombre d'essais d'activité antioxydante dans la littérature avec différentes méthodologies. Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picarylhydrazyl) est la méthode la plus couramment utilisée pour déterminer l'activité antioxydante des matériaux naturels et synthétiques car elle est rapide et simple (**Akar et al., 2017**).

Cette activité antiradicalaire est basée sur la réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, suite à un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants qui se trouvent dans le milieu réactionnel se traduisant par le virage de la coloration violette vers la coloration jaune mesurable à 515 nm (**Hadbaoui, 2012**).

Nous avons évalué l'activité antioxydante des différentes parties du *Citrus aurantium* à savoir : les écorces, les feuilles, les pépins et l'huile essentielle extraite à partir des écorces fraîches de la même espèce par cette méthode de DPPH afin de déterminer l'extrait ou la partie de l'orange la plus active ou l'acide ascorbique est utilisé comme molécule de référence.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes représentées dans la figure 17 qui montrent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de nos extraits (écorce, feuilles, pépins, huile essentielle).





**Figure 18:** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits du *Citrus aurantium* et de l'acide ascorbique.

A : extrait écorces, B : Extrait feuilles, C : Extrait pepins, D : Huile essentielle, E : Acide ascorbique.

D'après les courbes illustrées précédemment, on remarque que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration pour tous les extraits étudiés (écorces, feuilles, pépins et l'huile essentielle). Il semble que l'activité antiradicalaire est fortement dépendante des concentrations des extraits, Plus l'extrait est concentré, plus l'activité est élevée. Autrement dit, le pourcentage d'inhibition du radical est proportionnel à la concentration des différents extraits utilisés.

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'extrait. En présence d'un radical libre DPPH°, l'atome H est transféré sur ce dernier pour le transformer en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de l'antioxydant donneur d'hydrogène (**Khoudali et al., 2014**), se traduisant par un phase constante qui s'accompagne par la saturation des couches électroniques du radical (**Bouyahya et al., 2017**).

Nous remarquons que l'extrait des pépins présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé estimé à 90,06%, suivi par l'extrait des feuilles, avec un pourcentage d'inhibition de 75,942% , ensuite l'écorce 53,03% ,et enfin l'H.E avec un pourcentage d'inhibition de 33,04%, alors que l'acide ascorbique a montré une grande capacité à inhiber le radical DPPH égale à 83,60 %.

L'étude réalisée par Lagha-Benamrouche et Madani, (2013) a montré que l'écorce de bigarade présente un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de 88% et celui des feuilles est de 99,5%. Ces valeurs sont supérieures à nos résultats. En revanche, le pourcentage d'inhibition obtenu de 24,36% par Meziani et Saidoune (2017) de l'extrait des pépins de la région de Bejaïa, est nettement inférieur à celui de la présente étude.

Ces différences s'expliqueraient par les différentes compositions chimiques des mêmes espèces d'agrumes dans différentes régions (**Teneva et al., 2019**).

- **Détermination des IC50 :**

Nous avons déterminé à partir des graphes la concentration correspondante à 50% d'inhibition (IC50, concentration inhibitrice à 50%) pour chaque extrait, c'est-à-dire la concentration requise pour piéger les radicaux DPPH à 50%, exprimées en déviation standard moyenne (**Talukder et al., 2013**). Plus la valeur de l'IC50 est petite, plus l'activité antiradicalaire de l'extrait est grande. Les valeurs d'IC50 obtenues (Tableau 5) permettent de classer la capacité de piégeage du radical DPPH par les extraits testés par rapport à l'acide ascorbique et entre elles.

**Tableau5** : Valeurs des IC50des différents extraits et de l'acide ascorbique.

Extraits	IC50 (mg/ml)
<b>Écorces</b>	51,41
<b>Feuilles</b>	15,029
<b>Pépins</b>	13,775
<b>Acide ascorbique</b>	0,060

D'après les valeurs des IC50 obtenues dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que l'extrait des pépins présente l'IC50 la plus faible (13,775mg/ml), suivi par l'extrait des feuilles (15,029 mg/ml) ensuite l'extrait des écorces (51,41 mg/ml). Cependant, l'acide ascorbique ayant l'IC50 le plus faible, de 0,060 mg/ml, possède alors la plus grande activité antiradicalaire comparativement aux autres extraits testés.

les travaux de Moulehi *et al.*,(2012) sur les pépins de l'orange amère ont révélé que l'augmentation des activités antioxydantes des extraits polyphénoliques au cours de la maturation pourrait être liée à leurs teneurs élevées en kampférol, naringine et néohespéridine.

D'autres travaux réalisés sur l'écorce du *Citrus aurantium* ont montré des valeurs d'IC50 (1,9 mg/ml) (Ghasemi *et al.*, 2009) et (0,19 mg / ml) (Jabrikaroui et Marzouk, 2013) largement inférieures à celles dans notre analyse.

D'autre part la valeur IC50 pour l'extrait de feuilles reste supérieure a celle obtenue par Muthiah *et al.*, (2012) (0,14225 mg/ml), et par Khettal *et al.*, (2017) (0,06844 mg/ml).

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle extraite à partir des écorces de l'orange amère a révélé qu'à une concentration de 1500 mg/ml, le taux d'inhibition ne dépasse pas les 33%.

On constate que notre huile essentielle est moins active, ce qui est peut être dû à sa composition chimique. Il a été rapporté que l'activité de piégeage des radicaux libres est fortement influencée par la composition phénolique de l'échantillon étudié. Cependant, les huiles essentielles ne contenant pas de composés phénoliques, mais riches en monoterpènes oxygénés ont des propriétés de piéger DPPH relativement importantes ( **Zouari *et al.*, 2011**).

En plus, Plusieurs auteurs attestent que la composition chimique et l'activité antioxydante 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**).

# **Conclusion et Perspectives**

Ces dernières années, la recherche s'est concentrée sur les plantes médicinales riches en antioxydants naturels et peu coûteux qui peuvent remplacer les additifs synthétiques qui pourraient être carcinogène et toxique.

La transformation des agrumes génère des sous-produits riches en composés phénoliques et en huiles essentielles auxquelles on attribue des capacités antioxydantes.

Le présent travail, nous a permis de réaliser tout d'abord une étude phytochimique à savoir, l'extraction des composés phénoliques et de l'huile essentielle et analyse quantitative des composés phénoliques, ensuite d'évaluer l'activité antioxydante des différents sous-produits (écorces, pépins et feuilles) et de huile essentielle du *C. aurantium*.

A l'issue des résultats obtenus, l'étude phytochimique des différentes parties de la bigarade ont révélé leur richesse en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les tanins, mucilage et les quinones, qui représentent une source prometteuse de molécules chimiques possédant des activités biologiques intéressantes. En outre, l'écorce d'orange amère s'est révélé une bonne source en huile essentielle.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits issus de l'espèce *Citrus aurantium* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait pépins possède la meilleure activité anti-oxydante, mais qui reste néanmoins nettement inférieure à celle de l'acide ascorbique. Cependant il s'agit des extraits bruts qui contiennent plusieurs composés, qui une fois purifiés, peuvent donner une meilleure activité ; d'où la nécessité d'approfondir les recherches pour identifier et purifier ces constituants.

En revanche, l'utilisation des écorces, feuilles et pépins et leurs transformations en produits bioactifs dans les industries est nécessaire pour préserver la santé de l'homme et pour minimiser les phénomènes de pollution.

Il serait donc intéressant de :

- Réaliser d'autres extraits et fractions par des solvants avec différentes polarités pour pouvoir extraire le maximum de composés bioactifs, et caractériser les principes actifs.
- Évaluer d'autres activités biologiques *in vitro* et *in vivo*, telles que l'activité anti-bactérienne, antifongique, anti-inflammatoire et anti-cancéreuse.

# **Références Bibliographiques**

- **Adida, H., Benariba, N., Bechiri, A., Chekroun, E., & Djaziri, R. (2015).** Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*. *Phytothérapie*. DOI 10.1007/s10298-015-0932-4.
- **AFNOR.(2000)** « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 661-663.
- **Ait Mohamed, L. (2006).** Etude physico-chimique de la qualité et de la conservation avant et après séchage solaire convectif de *Gelidium sesquipedale* (algue rouge) et du *Citrus aurantium* (orange amer). thèse de Doctorat, Faculté des sciences. Semlalia Marrakech: Université Cady Ayyad.
- **Akar, Z., Küçük, M., & Doğan, H. (2017).** A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 640-647.
- **Akhlaghi, M., Shabani, G., Rafieian-Kopaei, M., Parvin, N., Saadat, M., & Akhlaghi, M. (2011).** *Citrus aurantium* blossom and preoperative anxiety. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 61(6), 702-712.
- **Alloun, K. (2013).** *Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (Anethum graveolens L.), de la sauge (Salvia officinalis L.) et de la rue des montagnes (Ruta montana L.)* (Doctoral dissertation).
- **Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., ... & Chaouch, A. (2010).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *BASE*.
- **Arias, B. A. & Ramon-Laca, L. (2005).** Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 89-95.
- **Arora, M., & Kaur, P. (2013).** Phytochemical screening of orange peel and pulp. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2(12), 517-520.
- **Aruoma AO.(1997).** Extracts as antioxidant prophylactic agents. *Inform* ;8:1236–1242.
- **Aubert, B., & Vullin, G. (1997).** Pépinières et plantations d'agrumes. Editions Quae.
- **Azwanida, N. N. (2015).** A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196). 1-6.

- **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- **Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- **Baratto, M. C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., Basosi, R. & Pogni, R. (2003).** Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. *Free Radical Research*, 37, 405-412.
- **Barberan Tomas, F., Espin, J.C., (2001).** Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 853–876.
- **Bartnick, D.D., Mohler, C.M., Houlihan, M., (2006).** Methods for the production of food grade extracts. United States Patent Application. 20060088627.
- **Bayr, H. (2005).** Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33, S498-S501.
- **Bazzano, L. A., HE, J., Ogden, L. G., Loria, C. M., Vupputuri, S., Myers, L. & Whelton, P. K. (2002).** Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *The American journal of clinical nutrition*, 76, 93-99.
- **Bejar, A. K., Mihoubi, N. B., & Kechaou, N. (2012).** Moisture sorption isotherms—Experimental and mathematical investigations of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. *Food Chemistry*, 132(4), 1728-1735. doi:10.1016/.
- **Bendali, A., Oulersir, C., Djamel, E.H. & Djazouli, Z.E. (2019).** Impact de la formulation sur le potentiel antifongique de l'huile essentielle du Bigaradier *Citrus Aurantium L.*
- **Bensadok A. (2018).** La production des agrumes en hausse, le soir d'Algérie. Repéré à : <https://www.lesoirdalgerie.com/regions/la-production-des-agrumes-en-hausse-11053>.
- **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(6), 2123-2129.
- **Bohning, M.I., Seigenthaler, P., 2008.** Ces plates qui soignent les sportifs, Favre SA . Lausanne ed.

- **Bohui, P. S. G., Adima, A. A., Niamké, F. B., & N'Guessan, J. D. (2018).** Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales: *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, 46, 50-58.
- **Boizot, N., & 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, In: Numéro spécial*, 79-82.
- **Boubekri, C. (2014).** *Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanum melongena par des techniques électrochimiques* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
- **Boughendjioua, H., et Djeddi, S. (2017).** Organoleptic and physicochemical properties of Algerian lemon essential oil. *World journal of applied chemistry*, 2(5), 96-100 DOI : [10.11648/j.wjac.20170203.14](https://doi.org/10.11648/j.wjac.20170203.14).
- **Boukhenoufa, A., Meddah, A. T. T., Meddah, B., Gabaldón, J. A., & Sonnet, P. (2018).** COMPARATIVE STUDY OF ARTEMISIA HERBA ALBA ASSO AND CITRUS AURANTIUM ESSENTIAL OILS. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(3), 622.
- **Bousbia, N. (2011).** Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires (Doctoral dissertation). p. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique p31-p54.
- **Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2017).** Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. *Phytothérapie*, 15(6), 379-383.
- **Castillo, J., Benavente, O. & Del Rio, J. A. (1993).** Hesperetin 7-O-glucoside and prunin in Citrus species (*C. aurantium* and *C. paradisi*). 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.
- **Cerdagne Isabelle, (2004).** l'orange amère citrus aurantium var amara link thèse pour le diplôme d'état en docteur de pharmacie. Université de limoges P19.
- **Charpentier B (2008).** New therapeutic targets for antibodies and recombinant proteins in organ transplantation. *Bull Acad Natl Med* 192:883–93.

- **Chavanne P., (2011).** 200 remèdes au citron. Editions First – Grund, Paris, p. 255.
- **Chemat F, Abert-Vian M, Fernandez X (2013).** Microwaveassisted extraction of essential oils and aromas. In: Chemat F (ed). Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice. Springer, New York, pp 53–66.
- **Chouitah Ourida, (2014) ;** Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielles des feuille des feuilles de Gjycyrrhiza globra ; Thèse de doctorat ; Université d'Oran.
- **Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013).** Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 18-21.
- **Couic-Marinier, F., & Lobstein, A. (2013).** Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 26-30.
- **Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (1998).** Local and systemic consequences of severe ischemia and reperfusion of the skeletal muscle. Physiopathology and prévention. *Acta Chirurgica Belgica*, 98(4), 176.
- **Desmier, T. (2016).** *Les antioxydants de nos jours: définition et applications* (Doctoral dissertation, éditeur inconnu).
- **Dionne, S. D., Yammarino, F. J., Atwater, L. E., & James, L. R. (2002).** Neutralizing substitutes for leadership theory: Leadership effects and common-source bias. *Journal of applied psychology*, 87(3), 454.
- **Djenane, D. (2015).** Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4(2), 208-228.
- **Durand, D., Damon, M., & Gobert, M. (2013).** Le stress oxydant chez les animaux de rente: principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(5), 218-224.
- **El-Akhal, F., Guemmouh, R., Greche, H., & Lalami, A. E. O. (2014).** Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc (Valorization as a bio-insecticide of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* cultivated in center of Morocco). *J. Mater. Environ. Sci*, 5(S1), 2319-2324.
- **El-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., Bengueddour, R. (2018).** Screening phytochimique d'une plante médicinale: *Mentha spicata* L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, ISSN 2429-5396.
- **Erdman Jr, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., ... & Messina, M. (2007).** Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North

- America flavonoids workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of nutrition*, 137(3), 718S-737S.
- **Ersus, S., & Cam, M. (2007).** Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant 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.p.3-p.13.
  - **Farhat, A. (2010).** *Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application* (Doctoral dissertation).
  - **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, (11/12), 108-117.
  - **Favier, A. (2006, November).** Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396). Elsevier Masson.
  - **Fernandez, X., & Cabrol-Bass, D. (2007).** Relu et validé 05 avril 2019. Analyse des arômes.
  - **Ferrez, Y., & Royer, J. M. (2010).** Le genre Rubus en Franche-Comté, résultats des premières investigations. *Les Nouvelles Archives de la Flore jurassienne et du nord-est de la France*, 8, 57-66.
  - **Fleming T (2001).** PDR for herbal medicines. Citrus aurantium. Section edition. pp. 86-87.
  - **Foe, F. M. C. N., Tchinang, T. F. K., Nyegue, A. M., Abdou, J. P., Yaya, A. J. G., Tchinda, A. T., ... & Etoa, F. X. (2016).** Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 117.
  - **Franchomme, P., Jollois, R., Pénéol, D., Mars, J., & Mars, J. (1990).** *L'aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles: fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle*. R. Jollois.
  - **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(8), 698-704.
  - **Gavahian, M., & Farahnaky, A. (2018).** Ohmic-assisted hydrodistillation technology: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 153-161.

- **Ghafar, M. F., Prasad, K. N., Weng, K. K., & Ismail, A. (2010).** Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *African Journal of Biotechnology*, 9(3). pp. 326-330.
- **Ghalem, M., Merghache, S. & Belarbi, M. (2014).** Study on the antioxidant activities of root extracts of *Zizyphus lotus* from the western region of Algeria. *Pharmacognosy Journal*, 6, 32-42.
- **Ghasemi, K., Ghasemi, Y., & Ebrahimzadeh, M. A. (2009).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci*, 22(3), 277-281.
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- **Ghédira, K., et Goetz, P. (2015).** Citrus aurantium L. var. amara Link. *Phytothérapie*, 13(5), 320-327. doi : 10.1007/s10298-015-0983-6.
- **Giannuzzo, A. N., Boggetti, H. J., Nazareno, M. A., & Mishima, H. T. (2003).** Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*. *Phytochemical Analysis*, 14(4), 221-223. DOI: 10.1002/pca.706.
- **Guignard, (2001).** Botanique, systématique moléculaire, édition Masson, p:290  
Repéré à : Rawnak, M. H. M., & Imene, M. B. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles des pépins de *Citrus aurantium* et *Citrus réticulata* p.5.
- **Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J. C., Sousa, M. J., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2010).** Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 99-106. doi:10.1016/j.fct.2009.09.022.
- **Hadbaoui, Z. (2012).** *Evaluation de l'activité antioxydante des fractions lipidiques, protéiques et phénoliques de sorgho et de mil locaux* (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat: Université de Kasdi Merbah OUARGLA-ALGERIE).
- **Haddouchi, F., Chaouche, T. M., & Halla, N. (2016).** Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 1-9.
- **Hadjiakhoondi A, Baligh N (2005).** Practical Guidance of Medicinal Plants. Islamic Azad University Scientific Publication Center, Tehran:pp. 5-20.

- **Hadrich, B., Dahak, K., Abdenouri, N., & Kechaou, N. (2008).** Etude de séchage des feuilles de bigaradier. *Revue des énergies renouvelables*, 145-149. Repéré à : [https://www.cder.dz/download/smsts08\\_18.pdf](https://www.cder.dz/download/smsts08_18.pdf).
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- **Hamdani, S. (2018).** *Etude chimique et activité antioxydante des huiles essentielles des agrumes cultivés dans la région de Tlemcen* (Doctoral dissertation, 11-11-2018).
- **He, D., Shan, Y., Wu, Y., Liu, G., Chen, B., & Yao, S. (2011).** Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD–ESI/MS. *Food chemistry*, 127(2), 880-885.
- **He, X. G., Lian, L. Z., Lin, L. Z., & Bernart, M. W. (1997).** High-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L.). *Journal of Chromatography A*, 791(1-2), 127-134.
- **Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., ... & Sebei, H. (2010).** Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, 123(4), 1098-1104.
- **Houaoura M'hamed (2013).** Production des agrumes : comment augmenter le rendement ?publié dans el watan. Repéré à :<https://www.djazairress.com/fr/elwatan/401545?fbclid=IwAR2UDxOI599O7bSO9G1btCRI2WTNrOFAAzu90azWO7x75lLt6hCsB6sxxFk>.
- **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.
- **Justin, J. S., Milton, A., & Natesan, G. (2014).** Phytochemical evaluation of peel of *Citrus reticulata* Blanco using various solvent extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Business Management*, pg. 26-35 ISSN: 2310-6913.
- **Kaidi Sami (2019).** production d'agrumes en 2018 : plus de 14 millions de quintaux. EL MOUDJTAHID ,2019.repéré à : <http://www.elmoudjahid.com/fr/actualites/132932>
- **Kamal, G. M., Anwar, F., Hussain, A. I., Sarri, N., & Ashraf, M. Y. (2011).** Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal*, 18(4), 1275.

- **Kamran G, Youcef G, Ebrahimzadeh MA.(2009).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci.* 2009;22:277–281.
- **Karoui Iness Jabri et Marzouk, B. (2013).** Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium L.*) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed research international*, 2013. doi.org/10.1155.
- **Karumi Y., Onyeyili P.A., Oyuugbuaja V.O. (2004).** Identification of active principals of *M. Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *J.Med.SCI*, 4(3): 179-182.
- **Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. & Jukic, M. (2006).** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, 94, 550-557.
- **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. Repéré à :<https://om.ciheam.org/om/pdf/b43/00800063.pdf>.
- **Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010).** Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis L.*) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851-858.
- **Khettal, B., Kadri, N., Tighilet, K., Adjebli, A., Dahmoune, F., & Maiza-Benabdeslam, F. (2017).** Phenolic compounds from Citrus leaves: antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1). DOI: 10.1515/jcim-2016-0030.
- **Khoudali, S., Essaqui, A., Zertoubi, M., Azzi, M., & Benaissa, M. (2014).** Study of antioxidant activity and anticorrosion action of the methanol extract of dwarf palm leaves (*chamaerops humilis l.*) from morocco|[Étude de l'activité antioxydante et de l'action anti corrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*chamaerops humilis l.*) du maroc].
- **Kim D.O., Chun O.K., Kim Y. J., MoonH.Y. et Lee C.Y. (2003).** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums, *J. Agric. Food Chem* Vol. 51(22);p: 6509-6515.
- **Kumaran, A. & Karunakaran, R. J.( 2007).** In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 344-352.

- **Lafrenière, J., Couillard, C., Lamarche, B., & Lemieux, S. (2017).** Les caroténoïdes sériques comme biomarqueurs: une stratégie pour améliorer la validité de l'évaluation alimentaire. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research*, 79(1), 23-27.
- **Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013).** Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723-730.
- **Lagha-Benamrouche, S., Addar, L., Boudershem, H., Tani, S., & Madani, K. (2017).** Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Nature & Technology*, (18), 28-35.
- **Laurain-Mattar, D. (2018).** Critères de qualité des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(580), 18-20.
- **Leroy J.F. (1968).** Les agrumes. In : les fruits tropicaux et subtropicaux. Ed. presses Universitaires de France, 61-77.
- **Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006).** Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182-188. doi:10.1016/j.seppur.2005.07.005.
- **Liu, S., Manson, J. E., Lee, I.-M., Cole, S. R., Hennekens, C. H., Willett, W. C. & Buring, J. E. (2000).** Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *The American journal of clinical nutrition*, 72, 922-928.
- **Liu, Y., Heying, E., et Tanumihardjo, S. A. (2012).** History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety*, 11(6), 530-545. doi: 10.1111.
- **Loussert R. (1985).** *Les agrumes. Production.* Lavoisier, Paris, vol. n°:1, 113 p.
- **Lu, D., Cao, Q., Li, X., Cao, X., Luo, F., & Shao, W. (2009).** Kinetics and equilibrium of Cu (II) adsorption onto chemically modified orange peel cellulose biosorbents. *Hydrometallurgy*, 95(1-2), 145-152. doi:10.1016/j.hydromet.2008.05.008.
- **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., Guthrie, N., & Grohmann, K. (2001).** Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current medicinal chemistry*, 8(2), 135-153.
- **Marzouk, B. (2013).** Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed research international*, 2013.
- **Merouane, A. (2013).** *Caractérisation, activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de trois espèces de sauges (Salvia algeriensis, Salvia argentea et Salvia barrelieri)* (Doctoral dissertation, SAADI. A).
- **Metoui, N., Gargouri, S., Amri, I., Fezzani, T., Jamoussi, B., & Hamrouni, L. (2015).** Activity antifungal of the essential oils; aqueous and ethanol extracts from *Citrus aurantium* L. *Natural product research*, 29(23), 2238-2241.
- **Meziani Lamia et Saidoune Sabrina (2017),** Activités antioxydantes et antimicrobiennes des différentes parties de la bigarade. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université A. MIRA – Bejaia.
- **M'Hiri, N. (2015).** *Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine) p9-p10.
- **Milane, H. 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Université Louis Pasteur (Strasbourg).
- **Milardović, A. (2014).** *Determination of antioxidative activity of the aronia fruit and juice from the harvest year 2013* (Doctoral dissertation, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu).
- **Millet, F. (2014).** Huiles essentielles et essence de citronnier (*Citrus limon* (L.) Burm. f.). *Phytothérapie*, 12(2), 89-97.
- **Mohamed, L. A., Kouhila, M., Jamali, A., Lahsasni, S., Kechaou, N., & Mahrouz, M. (2005).** Single layer solar drying behaviour of *Citrus aurantium* leaves under forced convection. *Energy Conversion and Management*, 46(9-10), 1473-1483. doi:10.1016.
- **Moore, G. A. (2001).** Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *TRENDS in Genetics*, 17(9), 536-540.

- Morand, C. (2014). Intérêt des aliments riches en flavonoïdes pour le maintien de la santé cardio-métabolique. *Médecine des maladies Métaboliques*, 8(5), 477-482.
- **Morton, J. (1987)**. Sour Orange. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL. Repéré à :[https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/sour\\_orange.html](https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/sour_orange.html).
- **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. doi:10.1016/j.indcrop.2012.02.013.
- **Muanda, F. N. (2010)**. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Thèse de doctorat en Chimie organique. Ecole doctorale SESAMES Université Paul Verlaine-Metz*, 294.
- **Muanda, F., Koné, D., Dicko, A., Soulimani, R., & Younos, C. (2011)**. Phytochemical composition and antioxidant capacity of three malian medicinal plant parts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- **Muther, L. (2015)**. *Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant* (Doctoral dissertation, Thèse]: pharmacie: Université d'auvergne).
- **Muthiah, P. L., Umamaheswari, M., & Asokkumar, K. (2012)**. In vitro antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of Citrus. *International Journal of Phytopharmacy*, 2(1), 13-20. Repéré à :<https://www.researchgate.net/publication/272761111> In vitro antioxidant activities of leaves fruits and peel extracts of Citrus.
- **Nabil Bousbia ; (2011)** ; Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires ; thèse de Doctorat en Sciences de L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
- **Naczka, M., & Shahidi, F. (2004)**. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- **Nassima Brix Gormat, Meriem Belarbi, Zoubida Mami, Fatima zohra Djaziri (2015)**. Physico-chemical characteristics and antioxidant activity of phenolic 66olonizat and oil of Citrus auarantium seeds from Northwest Algeria. *International journal of phytomedicine*. 7: 370-378.
- **Novidzro, K. M., Wokpor, K., Fagla, B. A., Koudouvo, K., Dotse, K., Osseyi, E., & Koumaglo, K. H. (2019)**. Etude de quelques paramètres physicochimiques et

- analyse des éléments minéraux, des pigments chlorophylliens et caroténoïdes de l'huile de graines de *Griffonia simplicifolia*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(4), 2360-2373.
- **Omoba, O. S., Obafaye, R. O., Salawu, S. O., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2015)**. HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. *Antioxidants*, 4(3), 498-512.
  - **Orange Douce (*Citrus sinensis*)**,. 2016(Lucbor huile essentielle ): p. 1. Disponible sur <http://lucbor.fr/orange-douce.pdf>.
  - **Ortuño, A., Garcia-Puig, D., Fuster, M. D., Perez, M. L., Sabater, F., Porras, I., ... & Del Rio, J. A. (1995)**. Flavanone and nootkatone levels in different varieties of grapefruit and pummelo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(1), 1-5.
  - **Oulebsir-Mohandkaci Hakima., Ait Kaki Sabrina et Behidj-Benyounes Nassima.(2016)**.Phytochemical Study and Evaluationof Antimicrobial, Antioxidant and Insecticidal Activity of Essential Oils and Polyphenols of Bitter Orange (*Citrus Aurantium L.*).163-167. doi.org/10.15242/IJACEBS.C0516212.
  - **Paolini, V., Dorchies, P., & Hoste, H. (2003)**. Effets des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre. *Revue Alter Agri*, 61, 17-19.
  - **Paul, A., & Cox, P. A. (1995)**. An Ethnobotanical survey of the uses for *Citrus aurantium* (Rutaceae) in Haiti. *Economic Botany*, 49(3), 249.
  - **Perrotte, M. (2019)**. *Identification d'un profil de marqueurs périphériques lié aux scores cognitifs dans le plasma et les vésicules extracellulaires durant le développement de la maladie d'Alzheimer: évolution de marqueurs liés au stress oxydatif et aux mécanismes physiopathologiques* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique).
  - **Peterson, J. J., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B. & Holden, J. M. (2006)**. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of food composition and analysis*, 19, S74-S80.
  - **Pharmacopée européenne. (2016)**. 9e édition. Strasbourg: Conseil de l'Europe; Repéré à (internet) [réf. du 26.09.2017] disponible sur <https://www.passeportsante.net/fr/Actualites/Dossiers/DossierComplexe.aspx?doc=huiles-essentielles-legislation-europeenne>.

- **Polese J.M. (2008).** Culture d'agrume. Edition artémis.
- **Pradhan, A., Sharma, L., Bhutia, S. G., & Sherpa, N. D. (2019).** Characterization of essential oil from peel of three citrus species grown in Sikkim Himalaya. *Journal of Applied Horticulture*, 21(2), 157-163.
- **Preedy V.R., (2008),** tomatoes and tomato products : Nutritional medicinal and therapeutic properties CRC press, pp134.
- **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*. doi.org/10.1016.
- **Rahnama, S., Rabiei, Z., Alibabaei, Z., Mokhtari, S., Rafieian-kopaei, M., & Deris, F. (2015).** Anti-amnesic activity of Citrus aurantium flowers extract against scopolamine-induced memory impairments in rats. *Neurological Sciences*, 36(4), 553-560. DOI 10.1007/s10072-014-1991-2.
- **Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., & Aruoma, O. I. (2010).** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278(1), 75-87. doi:10.1016/j.tox.2010.01.012.
- **Rapisarda, P., Bianco, M. L., Pannuzzo, P., & Timpanaro, N. (2008).** Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. *Postharvest biology and technology*, 49(3), 348-354.
- **Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., De Pasquale, A., Saija, A., (1999).**Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orangejuices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4718–4723.
- **Rawson, N. E., Ho, C. T., & Li, S. (2014).** Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels. *Food Science and Human Wellness*, 3(3-4), 104-109.
- **Rentzsch, M., Wilkens, A., & Winterhalter, P. (2009).** Non-flavonoid phenolic compounds. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 509-527). Springer, New York, NY.
- **Saharaoui, L., & Hemptinne, J. L. (2009, January).** Dynamique des communautés des coccinelles (Coleoptera: Coccinellidae) sur agrumes et interactions avec leurs proies dans la région de Rouïba (Mitidja orientale) Algérie. In *Annales de la société entomologique de France* (Vol. 45, No. 2, pp. 245-259). Taylor & Francis Group.

- **Rivas, B., Torrado, A., Torre, P., Converti, A., & Domínguez, J. M. (2008).** Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2380-2387.
- **Rock, E., & Fardet, A. (2014).** Les antioxydants des agrumes: action en solitaire ou matricielle?. *Phytothérapie*, 12(2), 66-75. DOI 10.1007/s10298-014-0852-8.
- **Sahraoui, N., Vian, M. A., El Maataoui, M., Boutekdjiret, C., & Chemat, F. (2011).** Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD). *Innovative food science & emerging technologies*, 12(2), 163-170.
- **Sanchez-Moreno C. A Larrauri , J., Saura-Calixto, F. (1998).** A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *International Journal of Food Science Agricultural* 76; p: 270- 276.
- **Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- **Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K., & Therios, I. (2013).** Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*, 18(9), 10639-10647.
- **Sawalha, S. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2009).** Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS. *Food Chemistry*, 116(2), 567-574. doi:10.1016/.
- **Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013).** Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 1(6).168-182
- **Scalbert, A. & Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130, 2073S-2085S.
- **Sidana, J., Saini, V., Dahiya, S., Nain, P., & Bala, S. (2013).** A review on Citrus- “The boon of nature”. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 18(2), 20-27.
- **Souci S. W., Fachmann W. et Kraut H. (1994).** Fruits. In : « La composition des aliments ». 5ème édition. Ed. CRC Press. pp. 801-980.
- **Stoclet, J. C., & Schini-Kerth, V. (2011, March).** Flavonoides alimentaires et santé humaine. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 69, No. 2, pp. 78-90). Elsevier Masson.

- **Stohs, S. J. (2017).** Safety, efficacy, and mechanistic studies regarding Citrus aurantium (bitter orange) extract and p-synephrine. *Phytotherapy Research*, 31(10), 1463-1474. DOI: 10.1002.
- **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.
- **Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y., & Tsuji, K. (2002).** An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by Folin-Denis assay. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)* 49, 507–511.
- **Talukder, M. E. U., Aklima, J., Emran, T. B., Islam, S., Rahman, A., & Bhuiyan, R. H. (2013).** In vitro antioxidant potential of Momordica charantia fruit extracts. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 963-971.
- **Teneva, D., Denkova-Kostova, R., Goranov, B., Hristova-Ivanova, Y., Slavchev, A., Denkova, Z., & Kostov, G. (2019).** Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity of essential oil from Citrus aurantium L zest against some pathogenic microorganisms. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 74(5-6), 105-111.
- **Terol, J., Soler, G., Talon, M., & Cercos, M. (2010).** The aconitate hydratase family from Citrus. *BMC plant biology*, 10(1), 222.
- **Tessier, F., & Marconnet, P. (1995).** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & sports*, 10(1), 1-13.
- **Trabelsi, Hanène.(2018).** Un regard sur le marché mondial et Tunisien des Agrumes .p1,2 Repéré à :<http://www.onagri.nat.tn/uploads/veille/Note-de-veille-Agrumes.pdf>
- **Vaissière, M., & Escale, J. (2020).** Huiles essentielles & grossesse au travail. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 81(1), 13-23.
- **Wagner H., (1983).** Drogen analyse, Dünnschicht chromatographische Analyse von Arzneidrogen. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 522 pp.
- **Wollinger, A., Perrin, É., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., & Kunz, W. (2016).** Antioxidant activity of hydro distillation water residues from Rosmarinus officinalis L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), 754-765.
- **Wong S. P., Leong L. P. et Koh J.H.W.; (2006);** Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants; *Food Chemistry* 99; p: 775–783.

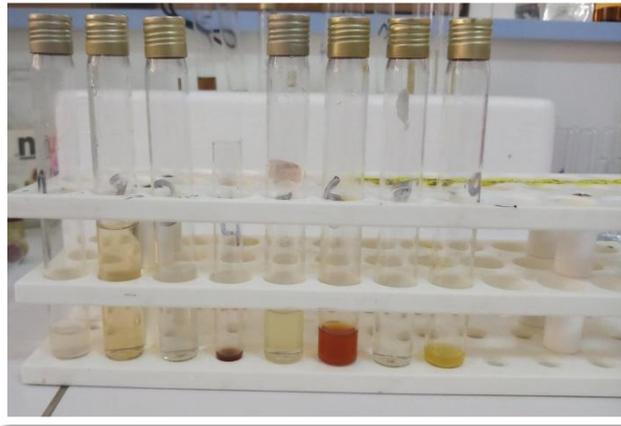
- **Yi, L., Ma, S., & Ren, D. (2017).** Phytochemistry and bioactivity of Citrus flavonoids: a focus on antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and cardiovascular protection activities. *Phytochemistry Reviews*, 16(3), 479-511. DOI 10.1007/s11101-017-9497-1.
- **Youn, J.-Y., Siu, K. L., Lob, H. E., Itani, H., Harrison, D. G. & Cai, H. (2014).** Role of vascular oxidative stress in obesity and metabolic syndrome. *Diabetes*, 63, 2344-2355.
- **Zadernowski, R., Czaplicki, S., & Naczki, M. (2009).** Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 112(3), 685-689.
- **Zargari A (1997).** Medicinal plant. Seventh edition. Tehran, Tehran Publication University, pp. 485-478.
- **Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016).** Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food chemistry*, 196, 885-896.
- **Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., & Ayadi, M. A. (2011).** Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut.(Lamiaceae). *Food and bioproducts processing*, 89(4), 257-265.

# **Les Annexes**

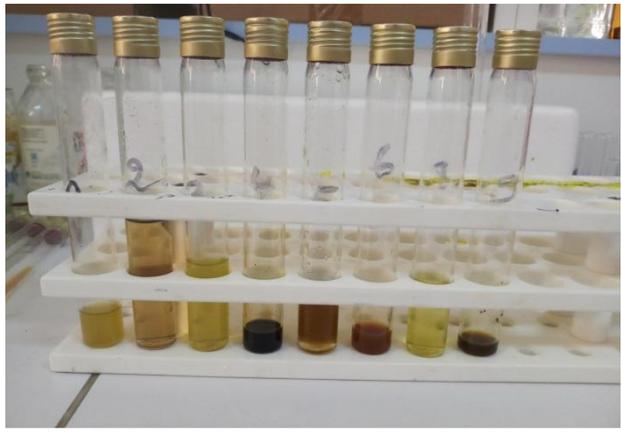
## Les annexes

**Annexe 1** : Tableau de Rendement d'écorces, feuilles et pépins du *Citrus aurantium*.

	Essai 1	Essai 2	Essai 3
<b>Ecorces</b>	35,6%	30,08%	32,8%
<b>Feuilles</b>	17,4%	18,9%	24,6%
<b>Pépins</b>	8,1%	9,4%	



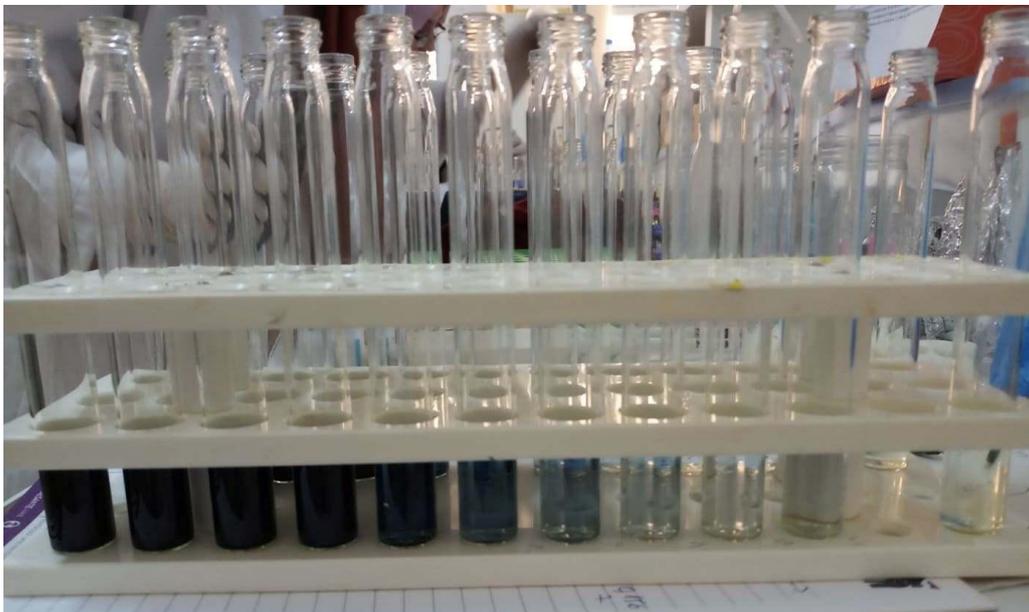
**Annexe 2** : résultats des tests phytochimiques d'écorce de *Citrus aurantium*.



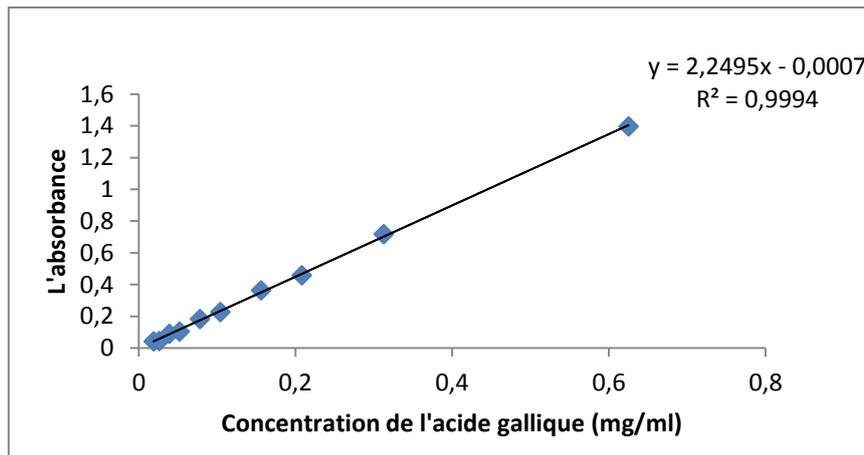
**Annexe 3** : résultats des tests phytochimiques des feuilles de *Citrus aurantium*.



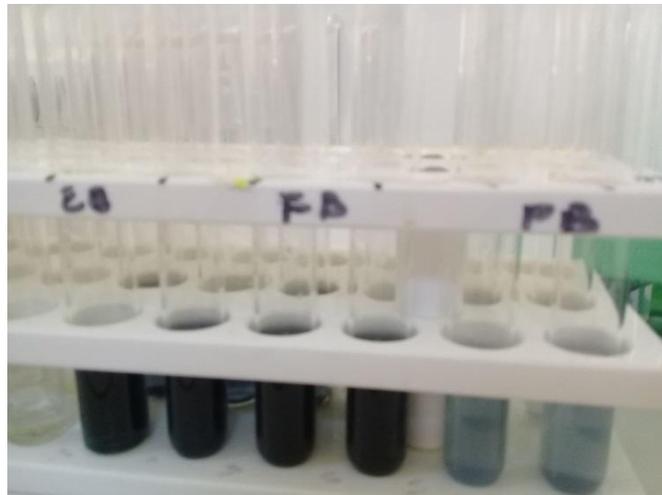
**Annexe 4** : résultats des tests phytochimiques des pépins *Citrus aurantium*.



**Annexe 5**: la gamme d'étalonnage d'acide gallique.



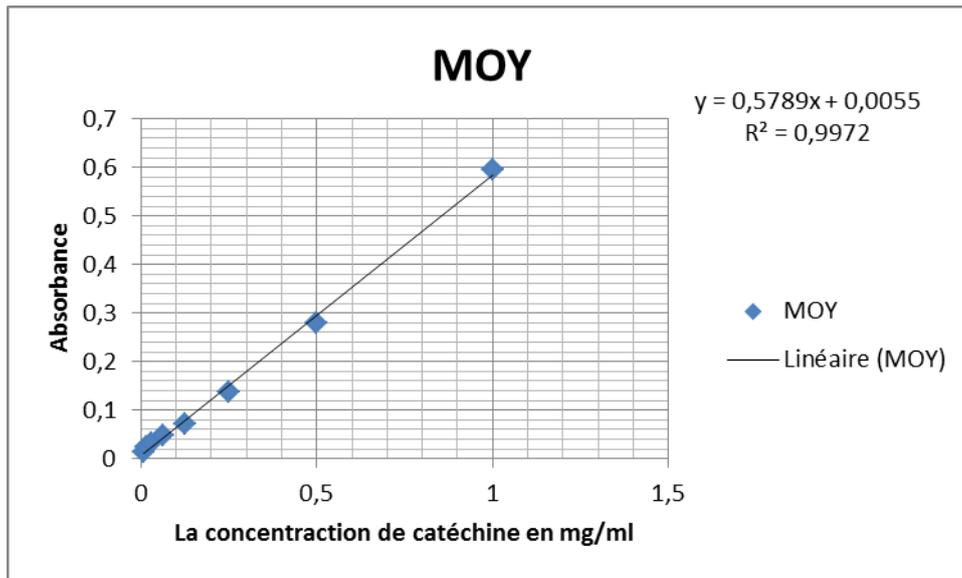
**Annexe 6:** La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



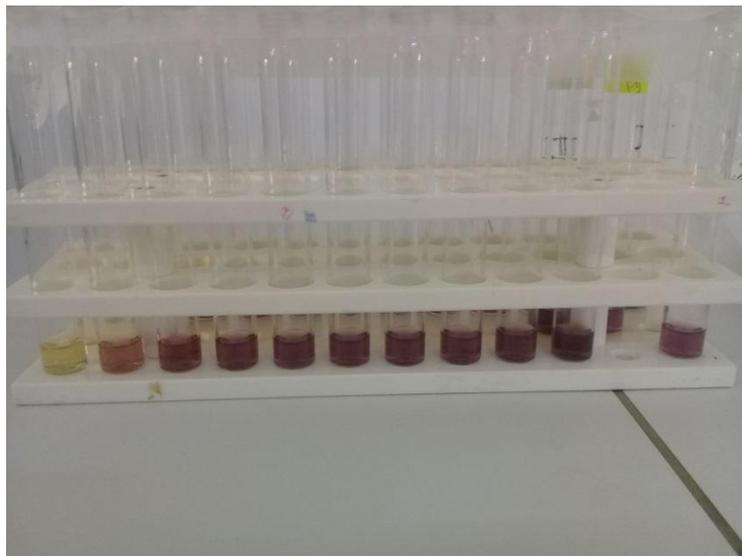
**Annexe 7 :** dosages des polyphénols d'écorce, feuilles et pépins de *Citrus aurantium*.



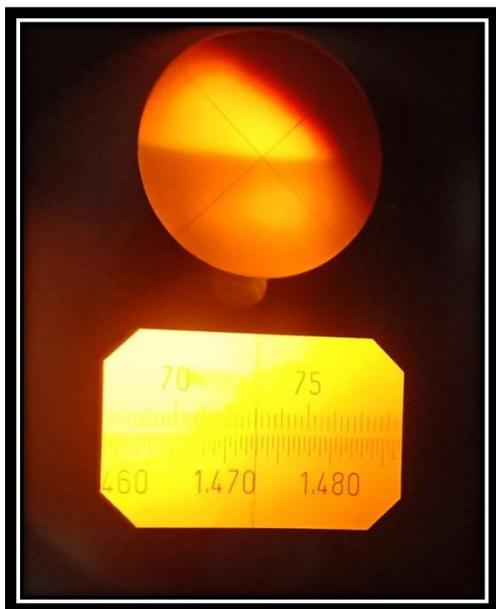
**Annexe 8:** la gamme d'étalonnage du catéchine.



**Annexe 9:** la courbe d'étalonnage du catéchine.



**Annexe 10 :** gamme d'étalonnage d'acide ascorbique .



**Annexe 11** : résultat de réfractomètre.



**Annexe 12** : extraction de l'huile essentielle par Hydrodistillation.

**Annexe 13** : La Densité, l'indice de réfraction et le rendement en huile essentielle de l'écorce de *Citrus aurantium* extraite par la méthode d'hydro-distillation.

Hydro distillation	Rendement (g)	La Densité (g/ml)	Indice de Réfraction
1	1,66	0,754	1,473
2	1,75	0,760	1,474
3	1,38	0,690	1,473
4	0,93	0,620	1,472
Moyenne	1,43	0,705	1,473
Écart type	0,3192961	0,0559017	0,00070711