

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministre de l'enseignement supérieur et la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université-Ain Témouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département des sciences de la nature et de la vie



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie
Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie
Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des
extraits bruts du *Citrus aurantium* dans la région
d'AinTémouchent**

Présenté Par :

- 1) Melle Mansouri Chaima
- 2) Mme KeddarWahiba
- 3) Mr Cheraka Imad Eddine

Devant le jury composé de :

Dr. BENNABI Farid	MCA	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Président
Dr. KHOLKHAL Fatima	MCB	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examinatrice
Dr. BRIXI GORMAT Nassima	MCB	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année Universitaire 2021/2022

Remerciements

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

*En premier lieu, nous remercions de tout notre cœur **Dr BRIXI GORMAT-BENMANSOUR Nassima**, Maître de conférences classe B à l'Université d'Ain Témouchent Belhadj Bouchaib, pour avoir accepté de nous encadrer et diriger ce travail par excellence. Aussi bien pour ses encouragements ces conseils judicieux, sa disponibilité tout au long de ce travail.*

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

***Dr. BENNABI Farid**, Maître de conférences classe A à l'Université Ain Témouchent Belhadj Bouchaib qui nous a honoré en acceptant d'être président de jury.*

***Dr. KHOLKHAL Fatima**, Maître de conférences classe B à l'Université Ain Témouchent Belhadj Bouchaib de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Aussi, nous remercions également **Mr MHAMEDI Walid**, Maître assistant classe B à l'Université Ain Témouchent Belhadj Bouchaib qui nous a aidé lors de notre travail et pour ces conseils techniques. Merci pour votre soutien, votre présence et votre gentillesse.*

Nos remerciements s'adressent aussi aux personnels du laboratoire de biochimie de l'Université Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent en particulier Mme MEFTAH Choukria, Mr Derif Ahmed d'avoir mis à notre disposition le matériel et les moyennes nécessaires à la réalisation de ce travail.

*A tous ceux qui nous ont apporté soutien, sacrifice et moments inoubliables
Tout au long de notre cycle universitaire.*

Merci.



Dédicace

Comme c'est beau d'offrir à une personne la chose la plus précieuse qu'elle ait pour le plus précieux. J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail :

A mes parents :

A ma chère mère :

Il n'y a pas de mots qui puissent exprimer la profondeur de mon amour et de mes remerciements, de sorte que si je passe toute ma vie à prier pour vous, je ne remplirai pas le droit à la fatigue, aux efforts et aux sacrifices que vous avez consentis pour moi continuellement au fil des années de mon étude.

A mon père :

*Tu es ma source de force et mon soutien
Tu es toute ma vie sans toi je ne pourrais pas être qui je suis aujourd'hui merci pour le soutien et l'amour que tu m'as donné depuis mon enfance
J'espère que ce travail est le fruit de vos efforts et sacrifices pour moi*

A ma chère Sœur :

*Tu es mon âme, mon refuge et le chemin de ma vie. Merci pour tes sacrifices avec moi
Que Dieu tout Puissant, vous garde en bonne santé et vous donne bonheur et longue vie.*

*À toute ma famille paternelle **MANSOURI**, et maternelle **BENHADI ET ZENASENI***

*A mon cher Encadrant **Dr BRIXI GORMAT NASSIMA** qui a été toujours avec nous*

A mes chères amies :Raouda, Wahiba, Imad Eddine, Zakaria

En souvenir de notre sincère amitié et de nos moments inoubliables.



Chaima



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

Aux être les plus chères au monde « mes parents »

Je dédie ce mémoire à mes parents, pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études.

Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être.

Chère mère et cher père, dans ce modeste travail, le fruit de tant de dévouements et de sacrifices ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour.

Puisse Dieu leur accorder santé, bonheur, prospérité et longue vie afin que je puisse un jour combler de joie leurs vieux jours.

*A mon cher frère **Abdrahim** et ma très chère sœur **Zahra**, je vous souhaite une longue vie pleine de bonheurs, santé et réussite.*

*A toute ma famille paternelle **CHERAKA** et maternelle **BESAYAH**.*

*A mon Encadrant« **Dr : BRIXI GORMAT Nassima** »*

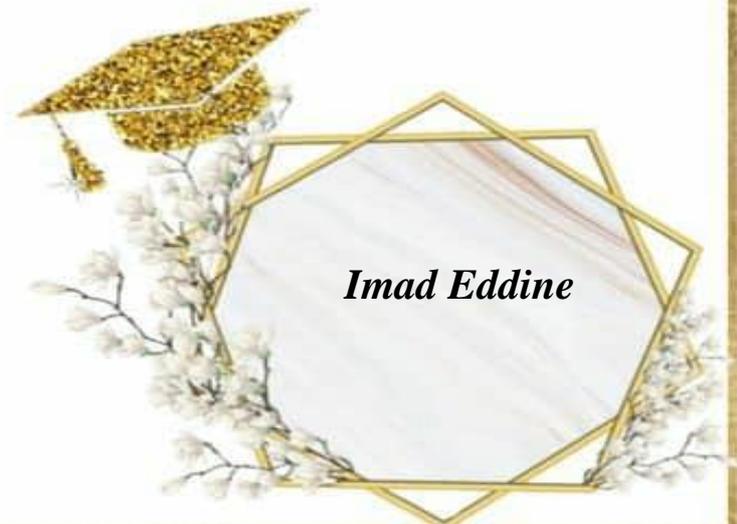
A l'ensemble des enseignants de la biochimie qui ont contribué à ma Formation scientifique

*A mes chères amies : **Wahiba, Chaima, Zakaria, Raouda***

En souvenir de notre sincère et profonde amitié.

Ainsi que tous mes amis de promotion Biochimie « 2020/2021 ».

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.





Dédicace

A ce qui a sacrifiés sa vie pour moi, a ce qui était toujours le guide, et la source de ma tendresse, et qui ma soutenue et encouragé durant toute mon existence que j'ai espéré sa présence en ce jour là ; mais le destin ne l'a pas permis pour sa pure âme de mes parents que dieu le tout puissant les accueille dans son vaste paradis.

A mon fils « SAID » que dieu le protège ; réussite succès et plein de bonheur dans sa vie.

A ma sœur adoré « SAIDA » qui j'aime beaucoup et son marie et ses enfants ; merci pour leurs amours et leurs encouragements.

A mes frères que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A toute ma famille paternelle et maternelle.

*A mon cher encadrant « Dr : **BRIXI GORMAT Nassima** » je la remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé.*

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

Aussi à ma directrice et directeur des ressources humaines et mon responsable de mon établissement, de pouvoir m'accorder leur soutien durant mes études.

*A mes chères amies et collègue de travail: **Chaima, Raouda, Imad Eddine, Zakaria, Fethi, Wassila, Khadidja, Nassima***

*Sans oublier mon binôme **Chaima** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*



Résumé

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'activité antioxydante et anti inflammatoire *in vitro* des différents extraits bruts (pépins, écorces et feuilles) du *Citrus aurantium* appartenant à la famille des *Rutacées* issue de la région d'Ain Témouchent. La première partie de cette étude consiste à faire l'extraction des polyphénols totaux du *Citrus aurantium* et la deuxième partie consiste à l'évaluer son activité antioxydante et anti-inflammatoire par les méthodes de l'inhibition de la dénaturation protéique et celle de la protection contre l'hémolyse.

Tout d'abord, Les extraits bruts de l'orange amère ; les pépins, feuilles et écorces, obtenus par macération dans le méthanol ont donné différents pourcentages de rendement estimés à 7,5% ; 16% et 28% respectivement.

Ensuite, l'évaluation du pouvoir antioxydant par les méthodes de piégeage des radicaux libres (DPPH) et le pouvoir réducteur (FRAP), ont révélé que l'extrait des feuilles du *C.aurantium* a enregistré la meilleure activité dans les deux méthodes. Cependant, il reste moins actif que l'acide ascorbique. De même, l'extrait des feuilles est doué d'activité anti-inflammatoire puisqu'il a présenté les pourcentages les plus élevés allant jusqu'à 80% par rapport aux autres extraits et même par rapport à l'acide salicylique dans les deux tests utilisés.

On peut dire que les trois extraits du *C. aurantium* sont des sources importantes pour lutter contre l'oxydation et l'inflammation, et peuvent être transformés en produits nutraceutiques.

Mots clés : *Citrus aurantium*, antioxydante, anti inflammatoire, DPPH, FRAP.

Abstract

The objective of our work is to evaluate the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of the various crude extracts (seeds, peels and leaves) of *Citrus aurantium* belonging to the *Rutaceae* family from the Ain Témouchent region. The first part of this study consists in extracting total polyphenols from *Citrus aurantium* and the second part consists in evaluating its antioxidant and anti-inflammatory activity by the methods of inhibition of protein denaturation and that of protection against hemolysis.

First of all, the raw extracts of bitter orange; the seeds, leaves and peels, obtained by maceration in methanol gave different yield percentages estimated at 7,5%; 16% and 28% respectively.

Then, the evaluation of the antioxidant power by the methods of scavenging free radicals (DPPH) and the reducing power (FRAP), revealed that the extract of the leaves of *Citrus aurantium* recorded the best activity in the two methods. However, it remains less active than ascorbic acid. Likewise, the extract of the leaves is endowed with anti-inflammatory activity since it presented the highest percentages of up to 80% compared to other extracts and even compared to salicylic acid in both tests used.

It can be said that the three extracts of *Citrus aurantium* are important sources to fight against oxidation and inflammation, and can be transformed into nutraceutical products.

Keywords: *Citrus aurantium*, antioxidant, anti-inflammatory, DPPH, FRAP.

ملخص

الهدف من عملنا هو تقييم نشاط مضادات الأكسدة والمضادة للالتهابات في المختبر للمستخلصات الخام المختلفة (البذور، اللحاء والأوراق) من الحمضيات أورانتيوم التي تنتمي إلى عائلة سذابية من منطقة عين تموشنت. يتكون الجزء الأول من هذه الدراسة من استخراج البوليفينول الكلي من أورانتيوم الحمضيات، بينما يتكون الجزء الثاني من تقييم نشاطه المضاد للأكسدة و المضاد للالتهابات من خلال طرق تثبيط مسخ البروتين وتثبيط الحماية من انحلال الدم. أولاً، المستخلصات الخام للبرتقال المر. أعطت البذور والأوراق و اللحاء التي تم الحصول عليها عن طريق النقع في الميثانول نسب إنتاجية مختلفة تقدر بـ 7,5 في المائة في 16 في المائة و28 في المائة على التوالي. بعد ذلك، أظهر تقييم القوة المضادة للأكسدة عن طريق طرق إزالة الجذور الحرة (DPPH) وتقليل الحديد (FRAP)، أن مستخلص أوراق النارج، سجل أفضل نشاط في الطريقتين. و مع ذلك، فإنه يظل أقل نشاطاً من حمض الأسكوربيك. و بالمثل، فإن مستخلص الأوراق يتمتع بنشاط مضاد للالتهابات حيث قدم أعلى نسب تصل إلى 80 في المائة مقارنة بالمستخلصات الأخرى و حتى مقارنة بـ حمض الساليسيليك في كلا الاختبارين. مكن القول إن المستخلصات الثلاثة من النارج هي مصادر مهمة لمحاربة الأكسدة و الالتهابات، و يمكن تحويلها إلى منتجات مغذية.

الكلمات المفتاحية: النارج، مضاد للأكسدة، مضاد للالتهاب، DPPH، FRAP.

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Introduction Générale	1
Partie I: Rappels bibliographiques	
I. Généralités sur les agrumes	3
II. l'espèce étudiée : <i>Citrus aurantium</i>	4
II.1. Description botanique	4
II.2. Description morphologique	5
II.3. Composition chimique	6
II.4. Utilisation et effet thérapeutique	7
III. Activités biologiques	8
III.1. Activité antioxydante	8
III.1.1. Définition des antioxydants	8
III.1.2. Les radicaux libres et les espèces réactives d'oxygène	8
III.1.3. Le stress oxydatif et ses conséquences	9
III.1.4. Les différents types d'antioxydants	10
III.1.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	12
III.1.6. Activité antioxydante des <i>Citrus</i>	13
III.2. Activité anti-inflammatoire	13
III.2.1. Rappel sur l'inflammation	13
III.2.2. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation	13
III.2.3. Les Cellules de l'inflammation	14
III.2.4. Les médiateurs inflammatoires	15
III.2.5. Les anti-inflammatoires	15
III.2.6. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	16

III.2.7.Citrus et activité anti-inflammatoire	16
---	----

Partie II: Matériel et Méthodes

I. Matériel	18
I.1.Matière végétale	18
I.2. Préparation des échantillons	18
II. Méthodes	19
II.1. Extraction des poly phénols totaux	19
II.1.1.Préparation des différents extraits	19
V. Evaluation des activités biologiques des extraits phénoliques de plante étudiée	21
V.1. Evaluation de l'activité antioxydant des différents extraits	21
V.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH	21
V.1.2. Test de la réduction du fer « FRAP »	23
V.2. Evaluation de l'activité anti inflammatoire des différents extraits	24
V.2.1. Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine)	24
V.2.2. Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)	26

Partie III: Résultats et Discussions

I. Les rendements en extrait sec	28
II. Evaluation de l'activité antioxydante	29
III. Activité anti inflammatoire	35
III.1. Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine)	35
III.2. Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)	36

Conclusion et Perspectives	39
-----------------------------------	-----------

Références Bibliographiques	40
------------------------------------	-----------

Les Annexes	53
--------------------	-----------

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdien.

AIS : anti-inflammatoire stéroïdien.

C. : *Citrus*

C° : Température en degrés Celsius

DO : Densité Optique.

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

DPPHH : 2,2 Diphényl 1 picryl hydrazine.

ERO : espèces réactives de L'oxygène

Fe : Fer

Fe²⁺ : Oxyde ferreux.

Fe³⁺ : Oxydeferrique.

FeCl₃: chlorure de fer

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power Assay.

GPX : glutathion peroxydase

GSH : le tripeptide glutathion

HRBC : globules rouges humains (en anglais, humanredbloodcells).

I% : Pourcentage d'inhibition

IC₅₀ : concentration de l'huile essentielle nécessaire pour inhiber 50%.

J-C : Jésus-Christ

O₂ : oxygène

PH : le potentiel hydrogène.

RDL : radical libre

Rdt : Rendement d'extraction.

Si : Silicium

SOD : superoxyde dismutase

Zn : Zinc

Liste des figures

Figure 1 : Fleurs, feuilles et fruit du <i>Citrus aurantium</i> .	4
Figure 2 : Coupe équatoriale d'une orange amère.	6
Figure 3 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.	8
Figure 4: Origine des différents radicaux libres oxygénés réactives de l'oxygène	9
Figure 5 : la balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants	10
Figure 6: Les échantillons du <i>Citrus aurantium</i> après le séchage	18
Figure 7: Séchage des échantillons dans l'étuve à 40°C.	19
Figure 8: Les différents extraits d'écorces, feuilles et pépins.	20
Figure 9 : Evaporateur rotatif sous vide .	21
Figure 10: Réaction du DPPH avec un antioxydant	21
Figure 11 : schéma du protocole de piégeage du radical DPPH	22
Figure12: Protocole du pouvoir réducteur FRAP	24
Figure 13: Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine	25
Figure14 : Prélèvement et préparation de la suspension érythrocytaire	26
Figure15: Protocole de stabilisation membranaire	27
Figure16: Rendement des extraits secs d'écorces, feuilles et pépins du <i>Citrus aurantium</i> .	28
Figure17: Pourcentages d'inhibition du DPPH par les extraits du <i>Citrus aurantium</i> et de l'acide ascorbique.	30
Figure18 : les valeurs d'IC50 des différents extraits et de l'acide ascorbique.	32
Figure19: Le pouvoir réducteur des différents extraits du <i>Citrus aurantium</i> et de l'acide ascorbique.	34
Figure20: Pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique des différents extraits et de l'acide salicylique.	35
Figure21: Pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges du <i>Citrus aurantium</i> et de l'acide salicylique.	37

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition et valeur nutritive de la bigarade.	7
Tableau 2: Les systèmes de défense antioxydant.	11
Tableau 3: Les cellules de l'inflammation.	14
Tableau 4: Les types anti-inflammatoire.	15

Liste des annexes

Annexe 1: Test de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique et des extraits du <i>Citrus aurantium</i> .	53
Annexe 2: Test de FRAP des différents extraits du <i>Citrus aurantium</i> .	53
Annexe 3: Test d'Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine) des extraits du <i>Citrus aurantium</i> .	54
Annexe 4: Test de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire).	54
Annexe 5: Le pouvoir réducteur des différents extraits du <i>Citrus aurantium</i> et de l'acide ascorbique.	55
Annexe 6: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique des différents extraits et de l'acide salicylique.	55
Annexe 7: Pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges du <i>Citrus aurantium</i> et de l'acide salicylique.	55

Introduction Générale

Les plantes médicinales sont des ressources précieuses de composés naturels pour prévenir et combattre différentes maladies, notamment les dommages cellulaires, l'inflammation, le cancer, etc. Il y a une augmentation de l'utilisation des plantes par les populations comme ressources d'antioxydants naturels et anti-inflammatoires (**Thanh et al., 2017**).

Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine traditionnelle, grâce à leurs activités biologiques et leurs métabolites secondaires utilisés comme principes actifs ou modèles chimiques. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour les soins de santé primaire (**Bouzouita et al., 2008 ; Ventrella et Marinho, 2008 ; Ladohetal., 2014**).

Les agrumes sont l'une des cultures fruitières les plus importantes au monde et sont principalement consommés frais ou sous forme de jus en raison de leur valeur nutritionnelle et de leur saveur particulière (**Ghfar et al., 2010**). Cependant, de grandes quantités de sous-produits (les déchets) sont produites (55% du poids des produits). Ils sont constitués d'écorces, des pépins restant après l'extraction du jus et constituent un sérieux problème environnemental pour leur élimination (**Moulehi et al., 2012**).

Parmi ces plantes, on a le genre *Citrus* (*Citrus aurantium*) fait partie des espèces qui ont été utilisées à des fins médicinales en raison des divers composés bioactifs (les composés phénoliques, les huiles essentielles et les vitamines). Les parties les plus utilisées à des fins médicinales sont l'écorce du fruit, les fleurs et les feuilles (**Sarrou, 2013**).

En outre, Les fruits immatures sont parfois marinés ou utilisés comme condiment, tandis que la peau du *Citrus aurantium* contient du limonène, principal constituant de l'huile essentielle, des polyphénols tels que : des flavonoïdes, des hespéridines et des néohespéridines (**Sarrou, 2013**).

A cet égard, Les polyphénols sont des agents réducteurs associés à d'autres agents réducteurs alimentaires tels que la vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes, ils protègent les tissus de l'organisme contre le stress oxydatif, ils sont communément appelés antioxydants(**Scalbert et al. 2000**).

Dans cette perspective, de la valorisation des sous-produits agricoles et leur intérêt dans le plusieurs domaines. En raison, de leur composition eu produits bioactifs que s'insère l'objectif de notre thème de mémoire de master dont le but d'évaluer *in vitro* leur activité antioxydante et anti-inflammatoire des différentes parties étudiées du *Citrus aurantium* : écorces, feuilles et pépins d'Ain témouchent. Ce travail porte sur :

Introduction Générale

- Extraction des composés bruts d'écorces, feuilles et pépins.
- Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante (effet scavenger vis-à-vis du DPPH et le pouvoir réducteur).
- Evaluation *in vitro* de l'activité anti inflammatoire (Inhibition de la dénaturation protéique et la stabilisation de la membrane des globules rouges humaines).

Rappels bibliographiques

I. Généralités sur les agrumes

Le mot agrume vient de latin (*acrumen*= saveur) acre, qui désignait autrefois un arbre aux feuilles acides (Faucon, 2015), dites hespéridés, regroupant les fruits de la famille des *Rutacées* (Jardin Musée Balaguier, 2015).

Les agrumes sont des petits arbres ou arbustes, leur taille peut varier de 2 à 10 mètres de haut suivant les espèces. Leur frondaison est généralement compacte et leurs feuilles sont persistantes, à l'exception des *Poncirus*. Leurs fruits, sous forme quartiers remplis de petites vésicules très juteuses, constituent leur principale originalité (Bénédicte et Michel, 2011).

Les agrumes, originaire d'Asie tropicale et subtropicale ont été disséminés au cours des siècles dans différentes régions du monde (Aubert et al., 1997).

L'histoire des agrumes, selon Weber et al., (1967), datant de 4000 ans avant J-C. La culture des agrumes a commencé en Chine. Le Citron a été le premier agrume introduit en Europe par Théophraste en 310 avant J-C. Les Romains importaient des oranges et des citrons de leurs provinces comme produits de luxe coûteux pour leurs banquets (Bousbia, 2011).

La diffusion des agrumes dans le reste du monde a été lente, en particulier en Europe du Sud et en Afrique du Nord (Liu et al., 2012). Le dernier agrume à avoir atteint l'Europe fut le citronnier au début du 19e siècle. Depuis, il est devenu l'un des agrumes les plus appréciés et n'a cessé de croître (Bousbia, 2011).

L'Algérie est un pays riche en agrumes dont l'exploitation est d'un grand intérêt pour une utilisation dans différents domaines tels que la thérapie (Chentouh et al., 2018). En effet, la production d'agrumes a atteint plus de 14 millions de quintaux (Mq) en 2018, dont plus de 11 Mq d'oranges et enfin près de 2,5 Mq de clémentine (Kaidi, 2019).

Les agrumes sont les espèces de 3 genres principaux du groupe *citrinae*: *Citrus* (la majorité des agrumes), *Fortunella* (les kumquats) et *Poncirus* (Bénédicte et Michel, 2011).

Le genre *Citrus* très complexe, est sujet à controverse et varie en fonction des botanistes (Bénédicte et Michel, 2011), qui contient 130 genres avec plusieurs variétés importantes (Sidana et al., 2013), 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).

D'après **Guignard (2001)**, la classification des agrumes est comme suit :

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

II. l'espèce étudiée : *Citrus aurantium*

II.1. Description botanique

Le bigaradier (orange amer) est un arbrisseau épineux très décoratif de 4 à 5 m de hauteur (**Hadrich et al., 2009**), avec des fleurs blanches parfumées (figure 1) (**Fugh-Berman et Myers, 2004**).

L'oranger amer appartient à la famille des *Rutaceae*, genre *Citrus*, il est aussi appelé oranger de Séville, il pousse sous un climat subtropical (**Deterre, 2012**).



Figure 1 : Fleurs, feuilles et fruit du *Citrus aurantium* (**Ghédira et Goetz, 2015**).

- Les feuilles du bigaradier sont vert vif, coriaces, persistantes, simples, alternes (une feuille par nœud) (**Giraud, 1993**). Elles ont une faible odeur et un goût amer, elles sont de forme ovales, subacuminées au sommet, avec des pétioles articulés et plus ou moins ailés, et les feuilles mesurent environ 8 cm de long et 4 cm de largeur (**Ecartin, 2011**).

- Les fleurs mesurent jusqu'à 25 mm, blanches et très parfumées (**Escartin, 2011**). Elles se composent de 4 à 5 pétales qui se chevauchent et sont souvent recourbées vers l'arrière (**Polese, 2008**).

- Le fruit mesure environ 7 cm de diamètre, avec une peau (écorce) dure et une pulpe acide. Il est très résistant au froid, à l'excès d'eau et à certaines maladies (**Deterre, 2012**).

- Les graines (pépins) sont blanches à vert pâle, plates et anguleuses, et sont polyembryonnées (**Polese, 2008**).

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

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Magnoliophyta
- **Classe** : Magnoliopsida
- **Sous classe** : Rosidae
- **Ordre** : Sapindales
- **Famille** : *Rutaceae*
- **Genre** : *Citrus*
- **Espèce** : *Citrus aurantium*

II.2. Description morphologique

Le fruit est composé de deux parties : la peau (écorce) également appelée péricarpe et la pulpe appelée endocarpe (**Ladaniya, 2008**). Les écorces de citrus sont subdivisées en épicarpe ou flavédo (surface périphérique colorée) et mésocarpe ou albédo (**Rafiq et al., 2016**) (figure 2).

- **Épicarpe ou flavédo**: est la partie la plus externe de l'écorce, colorée en jaune orangé ou en rouge (**Tenscher et al., 2005**). Il contient de nombreuses glandes sécrétrices d'essences aromatiques qui sont réparties de façon irrégulière (**M'Hiri, 2015**).

- **Mésocarpe ou albédo** : représenté la couche intermédiaire douce et blanche de la peau (**Ramful et al., 2010**). Il forme avec l'épicarpe (**Bousbia, 2011**). Le péricarpe est constitué d'un exocarpe correspondant au flavédo et d'un mésocarpe correspondant à l'albédo (**Ladanyia, 2008**).

- **Endocarpe ou pulpe** : c'est la partie comestible du fruit (**Kimball, 1999**). Divisé en segments ou carpelles avec des vésicules juteuses (**Guimarães et al., 2010**).

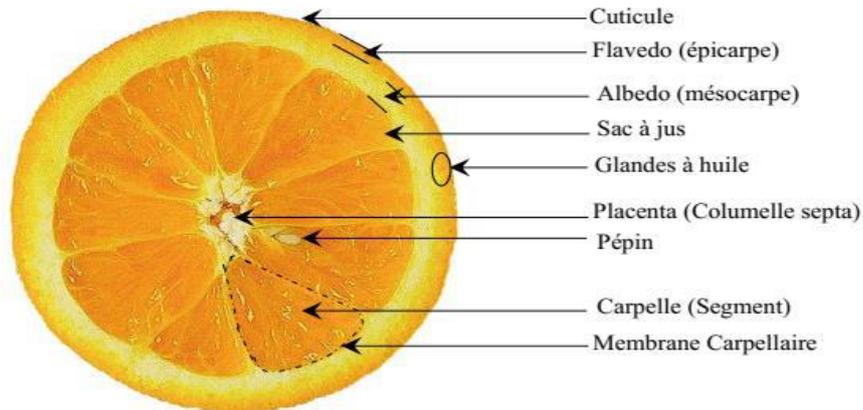


Figure 2 : Coupe équatoriale d'une orange amère (**Hendrix et Redd, 1995**).

II.3. Composition chimique

La peau d'orange (l'écorce) est principalement composée de la cellulose, d'hémicellulose, substances pectiques, des pigments de chlorophylle (flavonoïdes, anthocyanines et caroténoïdes), des huiles essentielles et d'autres composés de faible poids moléculaire comme le limonène (**Lu et al., 2009**). Le limonène est considéré comme le principal composé de l'écorce et de l'huile essentielle d'orange amère (**Marzouk, 2013**). L'écorce contient d'autres composés tels que, les glucides, les minéraux, des protéines et peu de lipides (**Lu et al., 2009**).

Les feuilles sont riches en chlorophylle, qui est responsable de la pigmentation verte (**Bejar et al., 2012**). Des nutriments (glucides, lipides et protéines), des acides aminés, des composés aromatiques complexes (**Anoop, 2012**). C'est également une source importante de composés bioactifs, y compris des antioxydants tels que l'acide ascorbique, les flavonoïdes et les compositions phénoliques (**Aruoma, 1997 ; Kamran, 2009**).

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

Tableau 1 : Composition et valeur nutritive de la bigarade (Souci *et al.*, 1994).

Composant (g)	La bigarade
Eau (%)	85,70
Glucides (g/100g)	8,25
Fibres alimentaires (g/100g)	1,6
Acides organiques (g /100g)	1,13
Protides (g /100g)	1,00
Lipides (g /100g)	0,2
Vitamines C (mg /100g)	49,35
Carotène (µg)	19,83
Vitamine B1 (thiamine) (µg)	79
Vitamine B2 (riboflavine) (µg)	42
Vitamine B3 (nicotinamide) (µg)	300
Vitamine B9 (Ac.folique) (µg)	42
Vitamine E (tocophérol) (µg)	320

II.4. Utilisation et effet thérapeutique

L'orange amère contient de nombreux composés bénéfiques pour la santé, notamment des polyphénols, de l'acide ascorbique, des caroténoïdes et des tocophérols (Ercan *et al.*, 2011).

Les *Citrus aurantium* ont été utilisés en médecine traditionnelle pour leurs activités biologiques, par exemples : les soins de la peau, les effets sédatifs, gastriques, anti-inflammatoires et antirhumatismaux (EL-Akhal, 2014 ; Hadjiakhoondi et Baligh, 2005 ; Fleming, 2001 ; Zargari, 1997).

La fleur d'oranger amer est utilisée pour traiter les troubles neurologiques tels que l'hystérie et la neurasthénie (Akhlaghi *et al.*, 2011).

En phytothérapie, ce fruit est utilisé pour faciliter la digestion et réduire les gaz (Escardine, 2011). Il possède également des propriétés antiallergiques en raison de sa richesse en quercétine, hespéridine et diosmine, qui sont des inhibiteurs de l'histamine, un neurotransmetteur impliqué dans les réponses allergiques et inflammatoires (Gonzalez Molina *et al.*, 2010).

En infusion, la consommation d'agrumes frais ou de leurs jus semble être associée à des profils lipidiques améliorés, à la survie des personnes âgées, à un risque de cancer plus faible, à une tension artérielle plus basse et à un risque d'accident plus faible. Accident vasculaire cérébral, maladie coronarienne, traitement de l'obésité (Ramful et al., 2011).

III. Activités biologiques

III.1. Activité antioxydante

III.1.1. Définition des antioxydants

Les agrumes sont populaires dans le monde entier en raison de leur saveur agréable et de leur bienfaits nutritionnels, et sont des sources potentielles d'antioxydants naturels (Deng et al., 2022). Les principaux antioxydants sont soit des (pro-)vitamines ou des minéraux, tels que la vitamine C (acide ascorbique), le β -carotène (précurseur de la vitamine A), la vitamine E (dont l' α -tocophérol est le plus actif), soit des familles de molécules comme les caroténoïdes (dont le lycopène), ou les polyphénols et flavonoïdes (Latino-Martel et Bachman, 2012). De façon générale, Les antioxydants sont des composés qui peuvent retarder, inhiber ou empêcher l'oxydation des matières oxydables en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif (Kim et Lee, 2004).

III.1.2. Les radicaux libres et les espèces réactives d'oxygène

Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés (électron célibataire) sur leur couche extrême (figure3) (Carange, 2010).

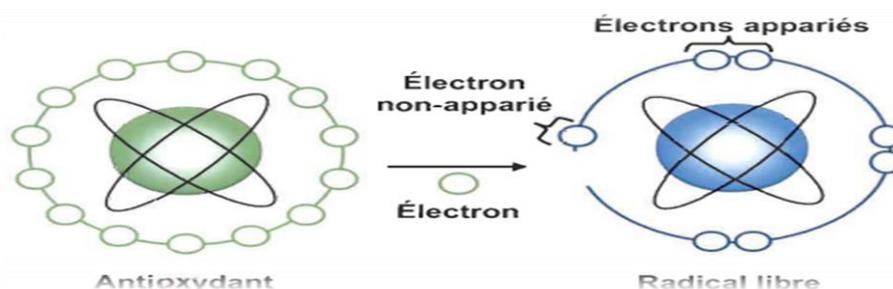


Figure 3 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant (Carange, 2010).

Ce sont des espèces chimiques, instables, très réactives, et possèdent un temps de demi-vie, d'existence indépendante, qui peuvent être formées par la perte ou le gain d'électrons a

partir d'un composé non radical. Ils peuvent aussi apparaître au moment de la rupture symétrique d'une liaison covalente après laquelle chaque atome conserve un électron et devient un radical libre (Tessier et Marconnet, 1995).

Les ERO radicalaires sont O_2^\bullet , OH^\bullet , 1O_2 et non radicalaire est H_2O_2 (figure 4) (Seifried, 2007).

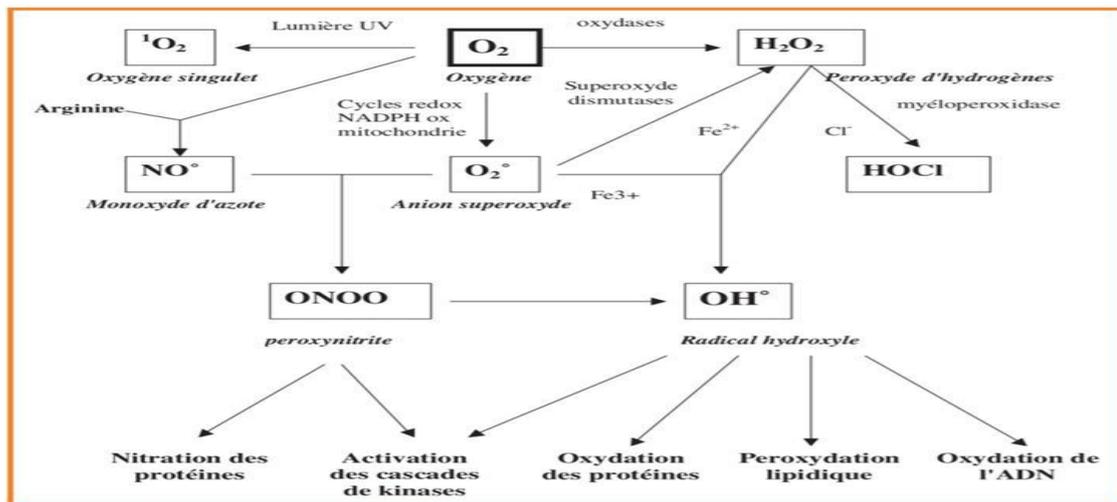


Figure 4: Origine des différents radicaux libres oxygénés réactifs de l'oxygène (Favier, 2003).

Les ERO sont principalement formés lors de l'oxydation des lipides par le cycle de Krebs et lors de la chaîne de transport mitochondriale d'électrons qui a pour but de produire de l'énergie. Les radicaux libres sont formés suite à l'oxydation des glucides, la glycation non enzymatique des protéines et leur subséquente dégradation. La présence d'une faible concentration de ERO est importante pour le maintien d'un statut redox cellulaire normal ; par contre, une production excessive de ERO endommage les lipides (peroxydation des lipides), les protéines et l'ADN compromettant les fonctions cellulaires (Hocine et Gorine, 2017).

III.1.3. Le stress oxydatif et ses conséquences :

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Baudin, 2020), et leur neutralisation par des antioxydants (Frapont et Preiser, 2017).

Normalement, la production des radicaux libres est permanente mais faible (sous la forme de médiateurs tissulaires ou de résidus des réactions énergétiques ou de défense). Une telle

production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, lesquels sont adaptatifs par rapport au niveau des radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux (figure 5) (Favier, 2006).

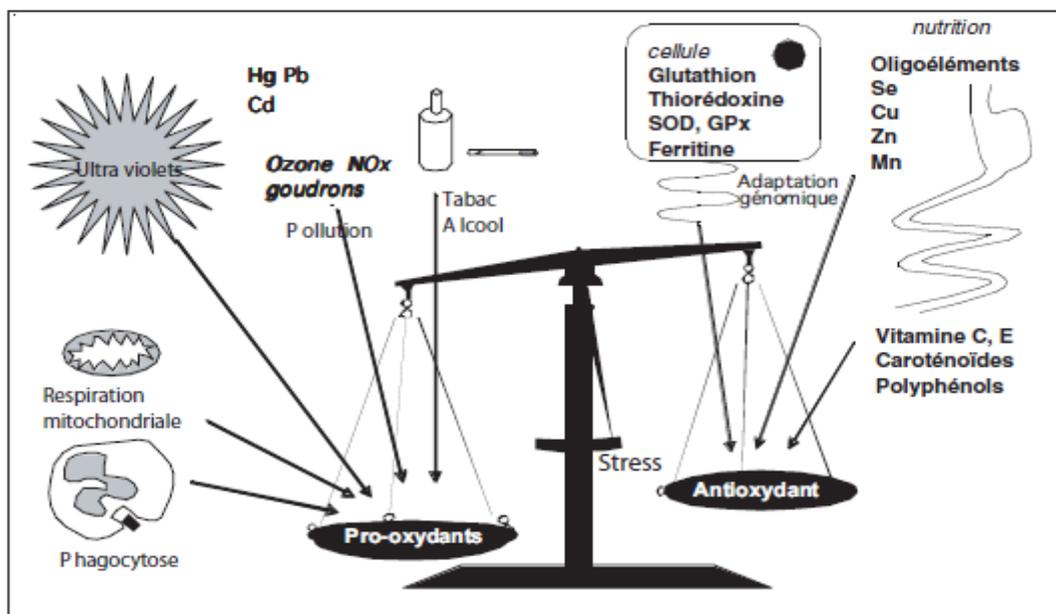


Figure 5 : la balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

Les radicaux libres excessive provoquent des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Favier, 2003).

III.1.4. Les différents types d'antioxydants

Les cellules sont capables de se défendre contre les effets néfastes des radicaux oxygénés dans des conditions physiologiques normales grâce à leurs propres mécanismes antioxydants, notamment les systèmes enzymatiques, les vitamines, les éléments et certaines molécules antioxydants (tableau 2) (Parihar et al., 2008).

Tableau 2 : Les systèmes de défense antioxydant.

Système enzymatique		Références
Supéroxyde dismutase (SOD)	-C'est l'un des antioxydants enzymatiques intracellulaires les plus efficaces. -Sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. $2H + + 2O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2$	(Rahman, 2007) ;(Favier, 2003)
Catalase	-Est une enzyme tétramérique composée de quatre sous-unités identiques, qui contient un seul groupe ferriprotoporphyrine. -Une molécule de catalase peut convertir environ 6 millions de molécules de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène chaque minute. $2 H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	(Mates et al., 1999) ;(Rahman, 2007)
Glutathion Peroxydase (GPX)	-Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les catalases à cofacteur fer, présentes dans les hématies et les peroxysomes hépatiques, et les glutathions peroxydases à cofacteur sélénium $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$	(Favier, 2003) ;(Mates et al., 1999) ;(Rahman, 2007)
Système non enzymatique		Références
Polyphénoles	-Sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal.	(Boubkri, 2014)
Oligoéléments	-Le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant.	(Mader, 2010)
Les caroténoïdes	-Les caroténoïdes sont des antioxydants qui piègent les radicaux libres en agissant comme immunomodulateurs, Certains caroténoïdes ont aussi le potentiel d'agir comme précurseurs de la vitamine A.	(Lafrenière, 2017)
Vitamine C (acide ascorbique)	-Il s'agit d'un antioxydant hydrosoluble important, avant tout, un excellent piègeur des EOA (HO^{\cdot} ou $O_2^{\cdot-}$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique.	(Rahman, 2007) ;(Haleng et al., 2007)
Vitamine E (Le tocophérol)	-Un antioxydant de caractère ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxydes (ROO^{\cdot}) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique.	(Rahman, 2007) ;(Haleng et al., 2007)

III.1.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* :

- **La méthode l'inhibition 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)**

Le DPPH est une poudre de couleur foncée de molécules stables de radicaux libres, soluble dans le méthanol ou l'éthanol (Wollinger *et al.*, 2016). Il absorbe dans une longueur d'onde comprise entre 512 et 517 nm (Sanchez-Moreno, 2002), en raison de la présence d'un électron non apparié. Au fur et à mesure que cet électron s'apparie en présence d'un antioxydant (donneur d'hydrogène). La force d'absorption qui diminue peut être utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des composés (Wollinger *et al.*, 2016).

- **La méthode de la capacité de réduction antioxydante du fer (FRAP)**

La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. L'existence de réductones est la clé du pouvoir réducteur, ces derniers présentent leurs activités antioxydants par l'action de casser la chaîne des radicaux libres en donnant un atome d'hydrogène. Dans le dosage, la présence de réducteurs dans l'échantillon provoque la réduction du Fe^{3+} /complexe de ferricyanure au Fe^{2+} /formferreuse, de sorte que le pouvoir réducteur de l'échantillon pourrait être surveillé en mesurant la formation de bleu de Prusse de Perl à 700 nm (Pan *et al.*, 2008).

- **Test de blanchiment de β -carotène**

Cette technique de spectrophotométrie UV consiste à mesurer la β -carotène à 470 nm résultant de l'oxydation du carotène par les produits de dégradation de l'acide linoléique. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée de manière non spécifique par la chaleur (50°C) (Laguerre *et al.*, 2007).

- **Piégeage du radical hydroxyle**

Il existe plusieurs façons de déterminer la capacité à former des radicaux hydroxyles. Cette méthode comprend un mélange de chlorure ferrique (FeCl_3) et l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), qui en présence d'acide ascorbique forme Fe^{2+} -EDTA, forme oxydée de l'acide ascorbique. Après addition de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), Fe^{3+} -EDTA et HO^\cdot sont formés. C'est la réaction de Fenton, qui génère le radical hydroxyle hautement réactif. ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \text{HO}^\cdot$) (Miguel, 2010).

- **Piégeage du radical superoxyde (O_2^\cdot)**

La xanthine oxydase est une enzyme déshydrogénase qui transfère des électrons au nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+), le réduisant en NADH, et oxyde la xanthine ou l'hypoxanthine en acide urique. L'activité de piégeage vis-à-vis de l'anion superoxyde des

antioxydants est mesurée en termes d'inhibition de la génération d'anion superoxyde, et donc avec une réduction de la production de formazan (**Miguel, 2010**).

III.1.6. Activité antioxydante des *Citrus*

Depuis longtemps, les produits naturels notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques (**Djamil, 2020**), en raison de leur forte activité antioxydante (**Barattoet al., 2003; Katalinic et al., 2006**). Les fruits couramment consommés, tels que les *Citrus* (**Djamil, 2020**). Ces derniers composés de trois familles de molécules, l'acide ascorbique (vitamine), la cryptoxanthine (caroténoïdes) et les flavanones (polyphénols) (**Rock et Fard et, 2014**) dont la plupart se trouvent au niveau de leurs feuilles et écorces (**Zhang et al., 2018**), qui jouent un rôle important dans le système de défense contre les radicaux libres (**Tripoli et al., 2007**). Chacun des composés possédant aussi des activités biologiques indépendantes de leur propriété antioxydante (**Rock et Fardet, 2014**).

III.2. Activité anti-inflammatoire

III.2.1. Rappel sur l'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'organisme contre les agressions d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse, indispensable à son intégrité (**John et Shcherazade, 2021**).

L'inflammation se caractérise par des manifestations clé : la rougeur, la chaleur, l'enflure et la douleur. Elle est reconnue comme un type de réponse immunitaire non spécifique (**Ouali et Sadouni, 2017**). Cette réponse immunitaire protectrice peut être parfois néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, des anomalies de régulation et de production des cellules intervenant dans l'inflammation (**John et Shcherazade, 2021**).

L'inflammation et ses pathologies associées constituent de plus en plus un problème majeur de santé. Leur traitement est souvent basé sur l'apport des anti-inflammatoires, non stéroïdiens (AINS) et des glucocorticoïdes (**John et Shcherazade, 2021**).

III.2.2. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation

Une réaction inflammatoire est l'un des modes de réponse les plus fréquents de l'organisme, provoquée par différents pathogènes d'origine infectieuse (bactéries, virus ou parasites), immunologiques, traumatismes physiques ou chimique (intervention chirurgicale, microcristaux) et nécrose tissulaire, elle peut manifester de manière aigue ou chronique (**Aiteur et Amrani, 2017**).

- **Inflammation aiguë**

L'inflammation aiguë est un processus à court terme caractérisé par les signes classiques de l'inflammation : gonflement, rougeur, douleur, chaleur et perte de fonction. Elle survient tant que le stimulus néfaste est présent et cesse une fois que le stimulus est éliminé. Le processus d'inflammation aiguë est initié par les vaisseaux sanguins locaux du tissu lésé, sous l'effet des médiateurs chimiques libérés par les cellules résidentes et immunitaires ; l'expression des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et la libération des facteurs chimiotactiques du site enflammé (**Ferdjioui, 2020**).

- **Inflammation chronique**

L'inflammation chronique est une réponse ubiquiste de l'organisme face à un agent persistant, le passage à la chronicité représente l'une des évolutions de la réaction inflammatoire (**Cavaillon, 1993**). L'inflammation chronique n'est pas caractérisée par les signes classiques de l'inflammation aiguë. Cependant, les tissus enflammés de façon chronique sont caractérisés par l'infiltration de cellules immunitaires mononucléaires (monocytes, macrophages, lymphocytes et plasmocytes) (**Ferdjioui, 2020**).

III.2.3. Les Cellules de l'inflammation

La réaction inflammatoire résulte d'un réseau d'interactions complexes entre les cellules (**Molet, 1996**). Ils jouent un rôle primordial (tableau 3) dans le déclenchement et le maintien des réponses immunitaires (**Séguier, 2000**).

Tableau 3 : Les cellules de l'inflammation (**Ferdjioui, 2020**).

Type	Fonction
Neutrophiles	Sont les premières cellules immunitaires qui s'infiltrent aux tissus blessés, elles arrivent en grand nombre en réponse aux chimiokines libérés par les cellules blessées et nécrotiques, détruisent les microbes envahisseurs.
Macrophages	Résidentes dans les tissus ou infiltrées, jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée, le développement normal des tissus, l'homéostasie des organismes et la réparation des tissus endommagés.
Lymphocytes	Les lymphocytes jouent un rôle fondamental dans le système immunitaire, ils participent à la réponse immunitaire spécifique contre les microorganismes et les substances étrangères, les cellules tumorales et le rejet de greffe. Ils se retrouvent dans le sang, la lymphe, les organes et les

	tissus lymphoïdes (thymus, ganglions lymphatiques, rate et appendice...).
Cellules tueuses naturelles (NK)	Ont diverses fonctions biologiques, notamment la reconnaissance et la destruction des cellules infectées par les virus et les cellules néoplasiques, ont également un rôle immunorégulateur car elles sécrètent plusieurs cytokines, comme l'interféron (IFN) γ .

III.2.4. Les médiateurs inflammatoires

Une variété de médiateurs chimiques du système circulatoire, des cellules inflammatoires et des tissus lésés contribue activement à ajuster l'inflammation. Les médiateurs chimiques libérés comprennent les amines vasoactives comme l'histamine et la sérotonine, le peptide (par exemple, la bradykinine), et les eicosanoïdes (par exemple, thromboxanes, leucotriènes et prostaglandines) (Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

III.2.5. Les anti-inflammatoires

La prise des anti-inflammatoires présente souvent des risques gastro-intestinaux (ulcère gastroduodénaux, perforation, sténose), des risques rénaux tels que l'insuffisance rénale aiguë et parfois des complications cardiaques (John et Shcherazade, 2021). La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèse du type anti-inflammatoire (tableau 4) non stéroïdien ou stéroïdien (corticoïdes) (Moffouk, 2019).

Tableau 4 : Les types anti-inflammatoire (Moffouk, 2019).

Type	Fonction
Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	-ont été utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur, la fièvre et l'inflammation. -Ce sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques
Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	-ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. -Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tels que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de

	l'intestin et les maladies auto-immunes
Anti-inflammatoires d'origine végétale	-sont de nature chimique variée (polyphénols, flavonoïdes, saponines, alcaloïdes). -La plupart de ces métabolites agissent en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes.

III.2.6. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

- Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine)

La dénaturation des protéines conduit à une perte de structure tertiaire et de structure secondaire d'une protéine. Les protéines perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées. C'est une des principales causes de l'inflammation (**Thanh et al., 2017**).

Pour cette raison, L'albumine est une protéine globulaire bien connue qui a tendance à s'agréger dans des assemblages macromoléculaires sa structure tridimensionnelle, dans le processus global d'agrégation de la solution aqueuse d'albumine humaine, un rôle tout aussi important est également joué par les changements conformationnels de la protéine (**Militello et al., 2003**).

- Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)

L'inflammation est la réponse tissulaire à une blessure et implique un processus complexe de réactions enzymatiques. La vitalité des cellules dépend de l'intégrité de leur membrane. Si les globules rouges (RBC) sont exposés à des substances nocives telles que le milieu hypotonique, la lyse de sa membrane se produira accompagnée d'une hémolyse et d'une oxydation de l'hémoglobine (**Habibur Rahman et al., 2015**).

L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule entraînant la rupture de sa membrane. Une lésion de la membrane des globules rouges rendra la cellule plus sensible aux dommages secondaires par peroxydation lipidique induite par les radicaux libres (**Labuet et al., 2015**).

III.2.7. Citrus et activité anti-inflammatoire

L'inflammation joue un rôle central dans plusieurs maladies, notamment les réponses cardiovasculaires, cancéreuses, neurodégénératives et allergiques. Les *Citrus* riches en

Rappels bibliographiques

flavonoïdes ont été utilisés en médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires, la plupart des études ont clairement démontré que l'hespéridine est capable de diminuer significativement les médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, les enzymes et les molécules d'adhésion (**Tejada et al., 2018**).

De manière significative, une grande partie de l'activité des flavonoïdes des agrumes semble avoir un impact sur les cellules endothéliales sanguines et microvasculaires, et il n'est pas surprenant que les deux principaux domaines de recherche sur les actions biologiques des flavonoïdes des agrumes aient été l'inflammation et le cancer (**Benavente et Castillo, 2008**).

Matériel et Méthodes

Ce travail repose sur le protocole expérimental suivant :

- L'extraction des polyphénols d'espèce végétale étudiée *Citrus aurantium*.
- Evaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de l'oranger amère.

Notre travail était effectué au niveau du laboratoire du département de biologie, faculté des sciences et technologie Universitaire BELHADJ BOUCHAIB de Ain Témouchent.

I. Matériel

I.1. Matière végétale

Comme cite précédemment, le matériel végétal est constitué de l'orange amer ou bigarade (*Citrus aurantium*). La récolte a été faite manuellement dans la région d'Ain-Témouchent, située dans le Nord-Ouest Algérien, durant le mois de décembre 2021.

I.2. Préparation des échantillons :

Les oranges amères récoltées ont subi un nettoyage et lavage à l'eau du robinet, afin de les débarrasser de la poussière puis séchés à l'air libre (figure 6).

Les oranges ont été épluchées afin de récupérer les écorces, ensuite ils ont été coupés pour faciliter l'extraction des pépins, qui ont été lavés abondamment avec l'eau du robinet.

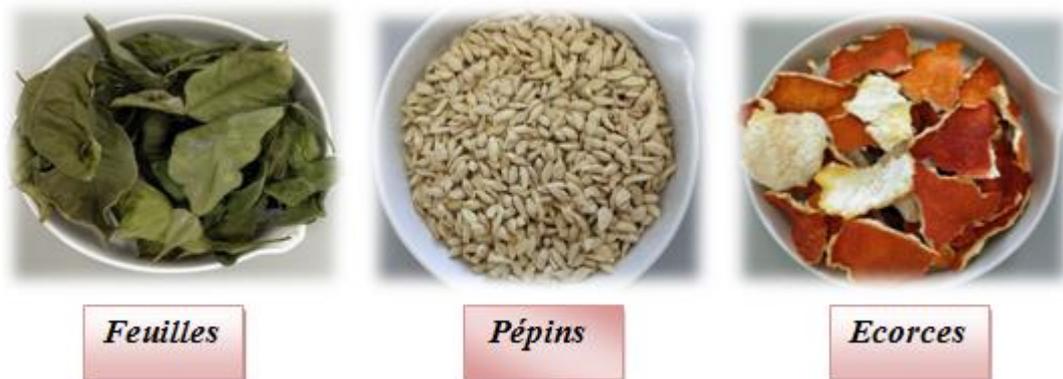


Figure 6 : Les échantillons du *Citrus aurantium* après le séchage (Photo originale, 2022).

Les écorces, les pépins ainsi que les feuilles ont été mis au séchage à l'air libre pendant deux semaines puis dans l'étuve à 40°C pendant 48 heures (figure 7).

Une fois séchés, ces derniers ont été broyées finement à l'aide d'un mixeur électrique afin d'obtenir des poudres fines. Ils sont placés par la suite dans des bocaux en verre et stockées à l'abri de la lumière pour les prochaines utilisations.



Figure 7 : Séchage des échantillons dans l'étuve à 40°C (Photo originale, 2022).

II. Méthodes

II.1. Extraction des poly phénols totaux

II.1.1. Préparation des différents extraits

Afin d'évaluer l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des différentes parties du *Citrus aurantium* des extraits bruts (pépins, écorces, feuilles) ont été préparés :

- **Mode opératoire**

L'extraction par macération à froid (température ambiante) au méthanol (70%), car c'est le solvant le plus recommandé pour extraire le maximum de composés phénoliques, possède l'avantage d'être éliminé facilement (**Ribéreau-Gayon, 1972**).

Une prise d'essai de 10 g de poudre végétale (écorce, feuilles et graines) a été mise en contact avec 100 ml de solvant (70 ml méthanol, 30 ml d'eau distillé). Sous agitation douce pendant 24h pour extraire le maximum de molécules, et protéger de la lumière. Les particules sont agitées dans le solvant pour maintenir la suspension et l'homogénéité du milieu. De plus, l'extraction s'effectue par pénétration de solvant dans les cellules végétales, phénomène qui provoque leur gonflement et la rupture des liaisons moléculaires de basse énergie. Les extractibles se dissolvent alors et diffusent progressivement des cellules vers le solvant (**Royer et al., 2010**).

De chaque matière végétale, nous avons préparé 2 essais avec renouvellement du solvant dans un volume 100ml (70ml de méthanol 30ml de l'eau distillée).

Les deux solutions sont réunies et filtrées sur papier filtre Wattman IDL Ø 240mm (figure 8), puis évaporées à sec sous pression réduite dans un rotavapor rotatif à une température de 40°C pour éliminer le méthanol (figure 9), puis séché dans l'étuve à 45°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 conservés au réfrigérateur.

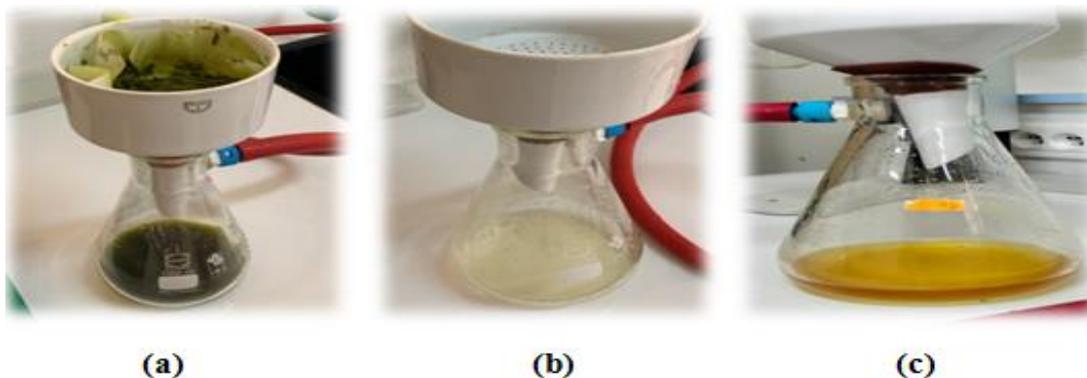


Figure 8: Les différents extraits d'écorces, feuilles et pépins (photo originale, 2022).

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

- **Calcul du rendement :**

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

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

Rdt : Rendement (en %).

P1: poids du ballon après évaporation.

P2: poids du ballon avant évaporation.

P3: poids de la matière végétale initiale.



Figure 9 : Evaporateur rotatif sous vide (Photo originale, 2022).

V. Evaluation des activités biologiques des extraits phénoliques de plante étudiée

V.1. Evaluation de l'activité antioxydant des différents extraits

Nous avons utilisé deux méthodes pour évaluer le potentiel antioxydant *in vitro* de nos extraits bruts, préparés à partir des pépins, écorces et les feuilles du *Citrus aurantium* ainsi que celui d'un standard (l'acide ascorbique). Les activités étudiées dans le présent travail sont le pouvoir antiradicalaire de DPPH et le pouvoir réducteur de fer (FRAP).

V.1.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

➤ Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH•. Les antioxydants réduisent le DPPH• (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) de la couleur violette en 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (annexe 1) en acceptant un atome d'hydrogène (Brand-Williams *et al.*, 1995) selon la réaction (figure 10).

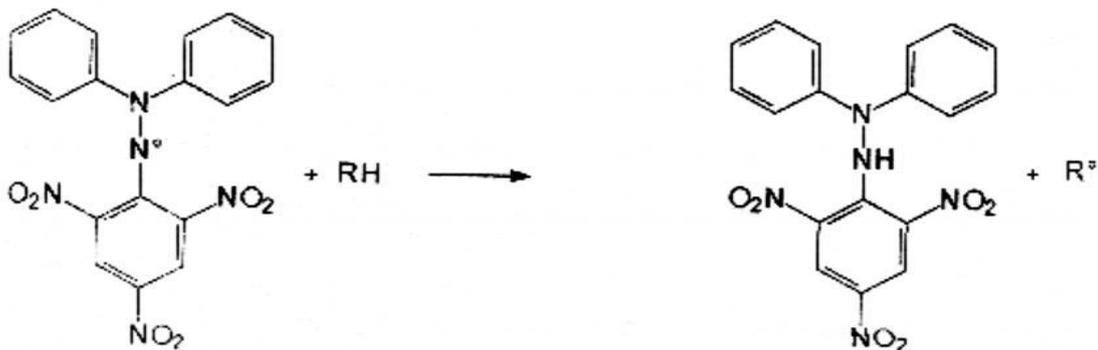


Figure 10 : Réaction du DPPH avec un antioxydant (ObameEngonga, 2009).

➤ Le protocole d'expérience

Le protocole expérimental suivi dans cette étude est effectué selon la méthode décrite par **Bougandoura et Bendimerad, (2013)**, avec quelques modifications (figure 11).

La solution DPPH est préparée par la solubilisation de 2,5 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.

50µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 0,075 à 10mg/ml) sont ajoutés à 1950µL de la solution méthanolique du DPPH. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1950µL de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydante standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 2 fois(**Bougandoura et Bendimerad, 2013**).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = [(Abs0 - Abs1)/(Abs0)] \times 100$$

Abs0:absorbance du contrôle.

Abs1: absorbance de l'échantillon test.

Les valeurs d'IC50 de chaque extrait a été déterminé à partir de l'équation des courbes tracées.

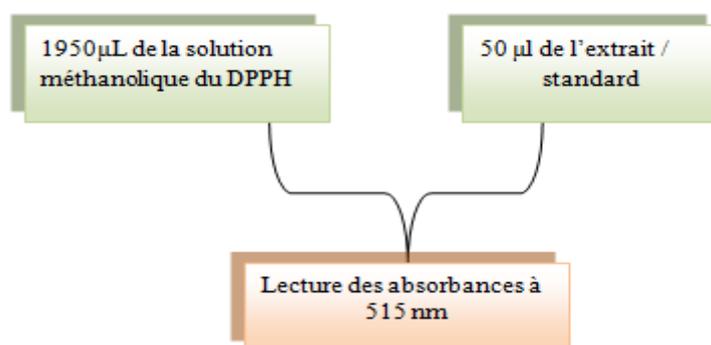


Figure 11 : schéma du protocole de piégeage du radical DPPH (**Bougandoura et Bendimerad, 2013**).

V.1.2. Test de la réduction du fer « FRAP »

➤ Principe

Cette méthode est utilisée pour évaluer la capacité des extraits à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanide $-\text{Fe}^{3+}$ en fer ferreux $-\text{Fe}^{2+}$ (Mouffouk, 2019).

Le Fe^{2+} qui résulte peut-être évaluer en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm. En effet, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination «semi quantitative» des concentrations des antioxydants, qui participent à la réaction redox (Mouffouk, 2019).

➤ Le protocole d'expérience

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Karagözler *et al.*, (2008).

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,075 à 10 mg/ml) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M ; pH 6,6 et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. Ensuite, nous ajoutons 2.5ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes. Un aliquote (2,5ml) de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 500 μL d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$) à 0.1% fraîchement préparée. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Bougandoura et Bendimerad, 2013).

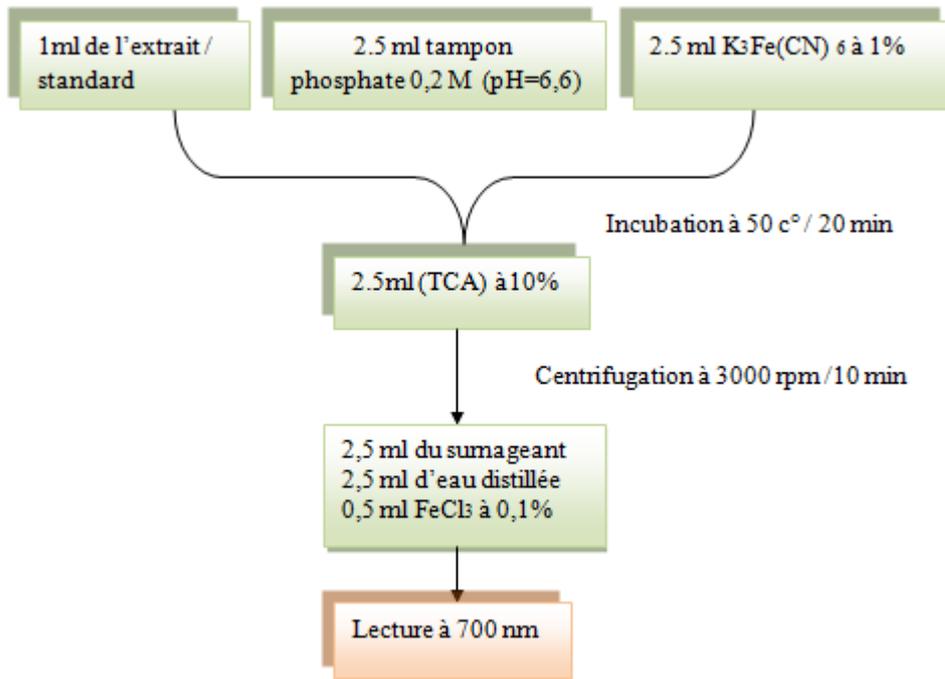


Figure 12 : Protocole du pouvoir réducteur FRAP (Bougandoura et Bendimerad, 2013).

V.2. Evaluation de l'activité anti inflammatoire des différents extraits

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits méthanoliques de la plante étudiée a été évaluée selon deux méthodes sont l'inhibition de la dénaturation des protéines et la stabilisation de la membrane des globules rouges humaines.

V.2.1. Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine)

L'effet inhibiteur *in vitro* des extraits bruts de *Citrus aurantium* a été déterminé en utilisant une méthode de dénaturation protéique décrite par Kaletal., (2012), avec quelques modifications.

Cette méthode consiste la préparation de quatre solutions :

➤ **La solution test (0,5 ml)** composé de 450 μ L de la solution aqueuse d'albumine humaine (solution aqueuse à 5 % P/V) et 500 μ L des extraits de la plante avec des concentrations variées (100, 300,500 μ g/ml).

➤ **La solution standard (0,5 ml)** composé de 450 μ L de la solution aqueuse d'albumine (solution aqueuse à 5 % P/V) et 500 μ L de la solution standard ; l'acide salicylique avec des différentes concentrations (100, 300,500 μ g/ml).

➤ **La solution contrôle test (0,5 ml)** composé de 450 μ L de la solution aqueuse d'albumine (solution aqueuse à 5 % P/V) et 500 μ L d'eau distillé.

➤ **La solution contrôle produit (0,5 ml)** composé de 450 μL d'eau distillé et 450 μL des extraits de la plante avec des concentrations variées (100, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 20 min, ensuite la température a été augmentée pour maintenir les échantillons à 57°C pendant 3 minutes. Après refroidissement, nous avons ajouté 2,5 ml de la solution phosphate saline (PH=6,3) aux solutions ci-dessus (**Habibur Rahman et al., 2015**).

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à 255 nm. Le témoin représente 100 % de dénaturation des protéines. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines été calculée comme suit :

$$I\% = [100 - (\text{DO de la solution test} - \text{DO de contrôle produit} / \text{DO de contrôle test})] \times 100$$

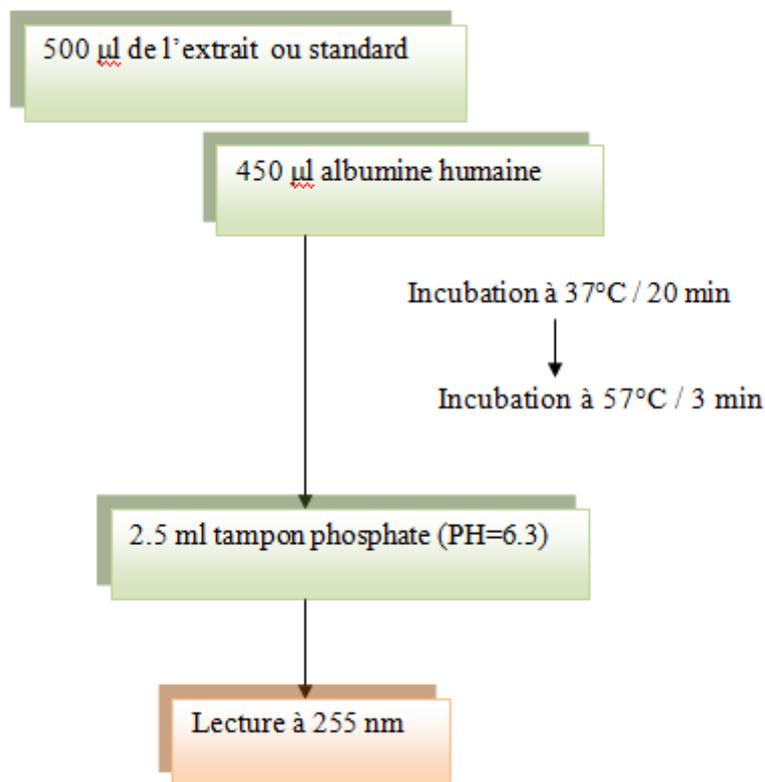


Figure 13 : Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine

(**Habibur Rahman et al., 2015**).

V.2.2. Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)

➤ Préparation de la suspension d'érythrocytes

Cinq millilitres de sang recueillis auprès d'un volontaire humaine en bonne santé, qui n'a pas pris de médicament anti-inflammatoire pendant 15 jours avant le prélèvement de sang frais récupérer a été mis dans des tubes héparines. Le sang a été centrifugé à 3000 tr pendant 10 min et les cellules emballées ont été séparées et lavées avec une solution d'iso-saline (figure 14). Une suspension de globules rouges humaines à 10% v/v a été préparée avec de l'iso-saline (Mouffouk, 2019 ;Kar et al., 2012).



Figure 14 : Prélèvement et préparation de la suspension érythrocytaire (Mouffouk, 2019).

• Réalisation des tests

L'activité hémolytique *in vitro* des extraits du *Citrus aurantium* a été réalisée par la méthode de Kar et al., (2012), avec quelques modifications.

Cette méthode consiste à préparation de trois solutions :

➤ **La solution d'essai** : composé de 1 ml du tampon phosphate (PH=7,4), 2 ml solution saline hypotonique, 1 ml d'extrait végétal de concentration variée (100, 300 et 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$) et 0,5 ml des globules rouge humains à 10%v/v de la suspension érythrocytaires.

➤ **Le test de contrôle** : composé de 1 ml tampon phosphate (PH=7,4), 2 ml solution saline hypotonique, 1 ml d'eau distillé et 0,5 ml (les globules rouge humains) à 10%v/v de la suspension érythrocytaires.

➤ **La solution standard** : composé de 1 ml de tampon phosphate (PH=7,4), 2 ml de solution salée hypotonique, 1 ml d'acide salicylique de concentration variée (100, 300 et 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$) et 0,5 ml (les globules rouge humains) à 10% v/v de la suspension érythrocytaires.

Tous les mélanges ont été incubés à 37 ° C pendant 30 min, puis centrifugé à 3000 tr pendant 20 min. L'hémoglobine libre dans le surnageant a été mesurée au spectrophotomètre UV-Vis à 560 nm (Kumar et al., 2011).

Le pourcentage de stabilisation a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ stabilisation} = \frac{[(\text{Densité optique de contrôle} - \text{Densité optique de l'échantillon}) / \text{Densité optique de contrôle}] \times 100}$$

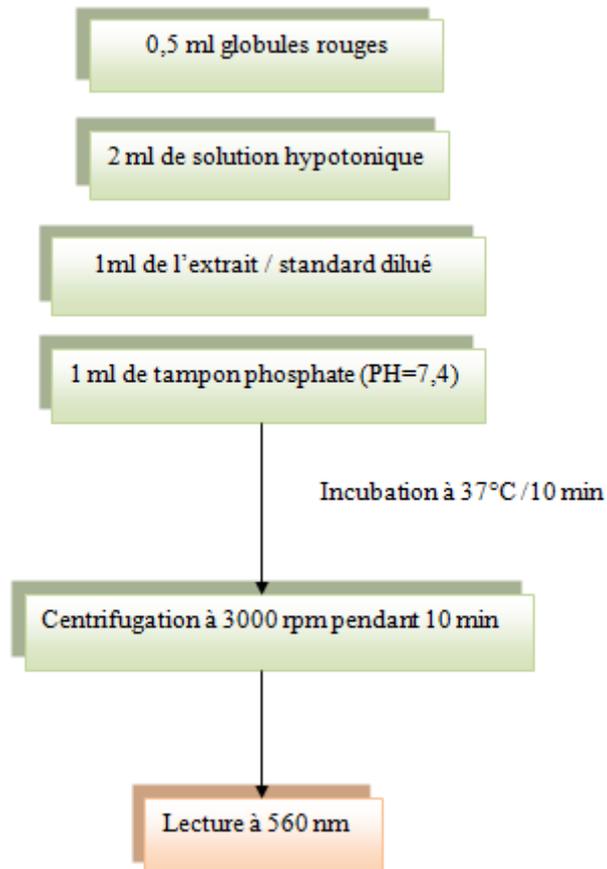


Figure 15 : Protocole de stabilisation membranaire (Kar *et al.*, 2012 ; Kumar *et al* 2011).

Résultats et Discussions

I. Les rendements en extrait sec :

Les extractions des composés phénoliques des différentes parties du *Citrus aurantium*, nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait c'est-à-dire : écorces, feuilles et pépins.

Les rendements des extraits bruts à partir de 10 g de poudre du *Citrus aurantium*, exprimés en pourcentage qui sont représentées dans la figure 16.

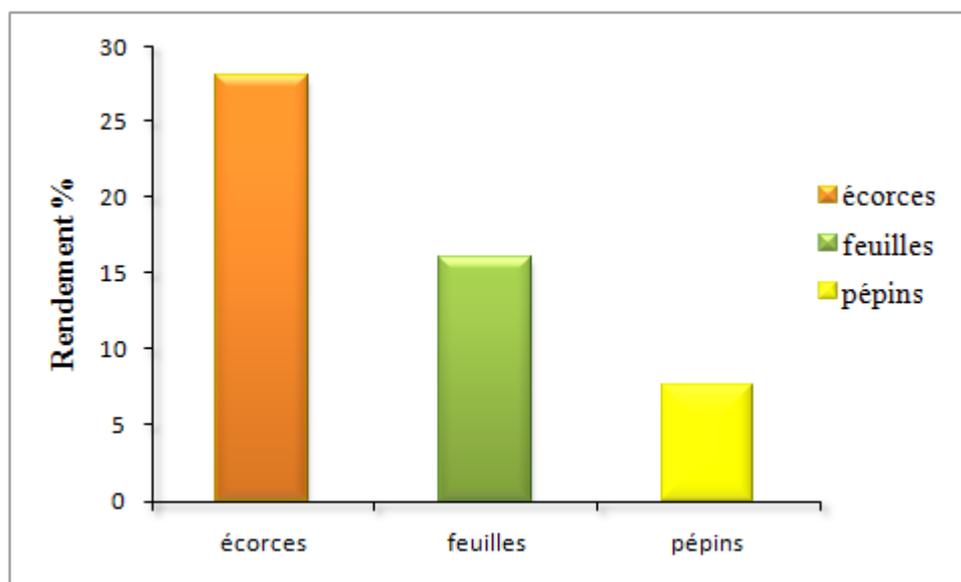


Figure16 : Rendement des extraits secs d'écorces, feuilles et pépins du *Citrus aurantium*.

D'après les résultats, les pourcentages enregistrés sont compris entre 7,5 et 28 %, le plus élevé a été enregistré dans l'extrait d'écorce (28 %), suivi par les feuilles (16 %) et les pépins (7,5%) respectivement.

Concernant le taux de rendement de l'extrait d'écorce obtenu dans la présente étude est différent de celui rapporté par **Ziaur (2006)**, qui ont testé l'effet de plusieurs solvants d'extraction sur l'écorce de la bigarade et ont montré que la quantité maximale d'extrait d'écorce estimée à 19,87 % a été repérée dans l'extrait méthanolique et 15% dans l'acétone, ce qui est largement inférieur à nos résultats.

En revanche, notre résultat est proche de celui obtenu par **Muthiah et al., (2012)**, dans la région de Maduraie en Inde. Ces derniers ont utilisé l'éthanol comme solvant d'extraction ; ils ont enregistré un pourcentage de 22,12%.

Cependant, le taux de rendement d'extraction de l'extrait des feuilles obtenu par **Meziani et Saidoune, (2017)**, réalisé par le méthanol estimé à 30,3% est largement supérieur à celui obtenu dans notre travail (16%).

De même, Le taux de rendement de l'extrait des pépins obtenu dans notre travail (7,5%) est largement inférieur à celui obtenu par **Brixi Gormat et al, (2015)**, estimé à 38.21 % dans la région de Tlemcen.

Cette différence dans les rendements peut s'expliquer par l'influence de plusieurs facteurs tels que : les méthodes d'extraction et les solvants utilisés, ainsi que par des facteurs génétiques, climatiques et pédologiques dans la région de récolte (**Lagha-benamrouche et al., 2017**). Par exemple, Le séchage affecte le rendement d'extraction, ce processus est recommandé avant l'étape d'extraction car il inhibe les enzymes et permet également de conserver la poudre pendant une longue période sans modification significative (**Owen et Johns, 1999**).

II. Evaluation de l'activité antioxydante

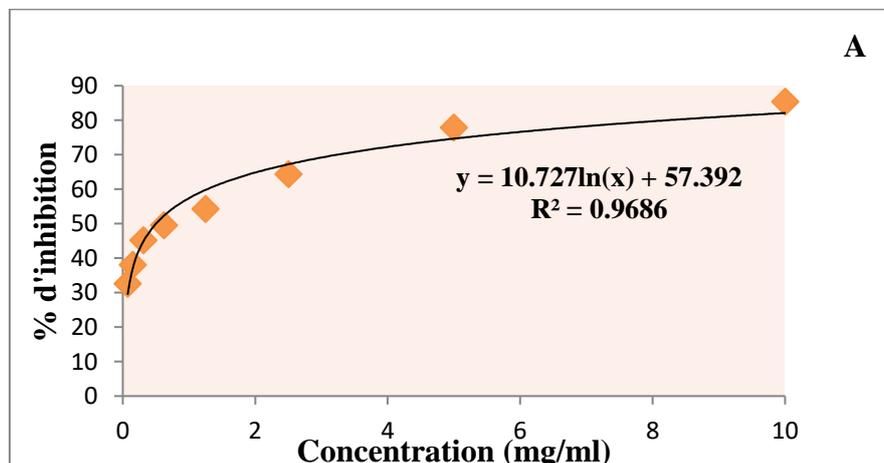
Le potentiel antioxydant des différents extraits végétaux peut être mesuré à l'aide de nombreux tests *in vitro*. Nous avons utilisé deux méthodes : la capacité de piéger les radicaux libres (DPPH) et le pouvoir réducteur (FRAP) (**Bozin et al., 2008**).

➤ Test de piégeage du radical libre DPPH

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH \cdot) est l'un des substrats les plus couramment utilisés pour l'évaluation rapide de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité et la simplicité du dosage (**Bozin et al., 2008**).

L'activité anti-radicalaire des extraits du *Citrus aurantium* (écorces, pépins et feuilles) vis-à-vis de ce radical a été évaluée par spectrophotomètre à 515 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif (antioxydant standard).

Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes qui expriment le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de nos extraits et de l'acide ascorbique et qui sont représentées dans la figure 17.



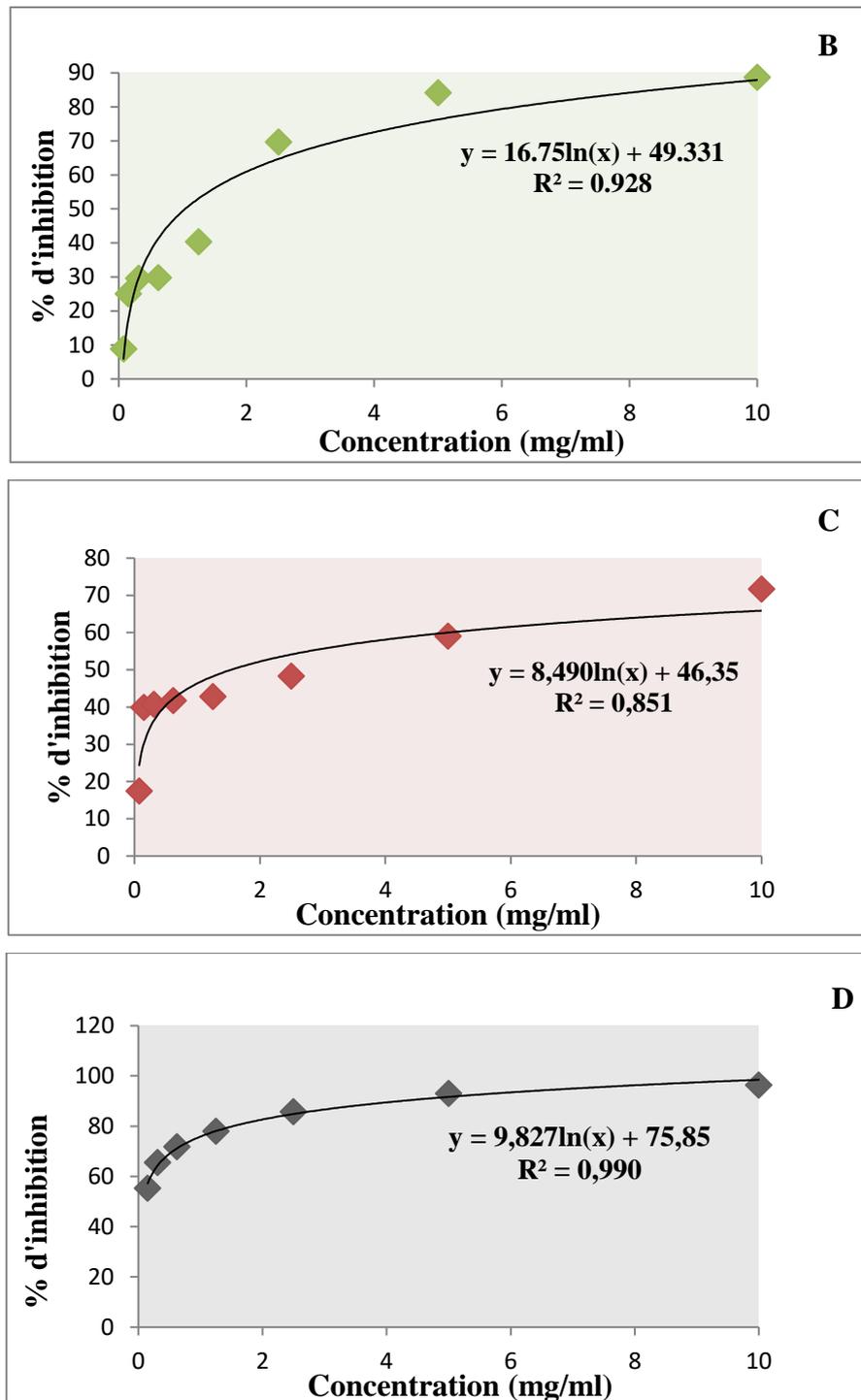


Figure 17 : Pourcentages d’inhibition du DPPH par les extraits du *Citrus aurantium* et de l’acide ascorbique (A : écorces, B : feuilles, C : pépins, D : acide ascorbique).

D’après les résultats obtenus, le pourcentage d’inhibition augmente avec l’augmentation des concentrations des extraits et de l’acide ascorbique dans le milieu réactionnel. Il apparaît que l’activité du radical libre DPPH est dépendante de la concentration de l’extrait, plus l’extrait est concentré, plus l’activité est élevée (Safdar et al., 2017 ; Li et Sun, 2017). À

partir de là, nos extraits (pépins, écorces et feuilles) possèdent une activité antiradicalaire à dose dépendant (IC50 (mg/ml)), déduite graphiquement à partir de la courbe d'inhibition (figure 17).

Tout d'abord, nous remarquons que l'activité inhibitrice du radical libre DPPH par l'acide ascorbique a été la plus élevée estimée à 93% et à cette même concentration (10 mg/ml), les feuilles du *Citrus aurantium* ont indiqué un pourcentage d'inhibition égal à 87 %, suivi par l'extrait des écorces avec un pourcentage d'inhibition de 80%, ensuite les pépins 61%. Par rapport au standard (l'acide ascorbique), l'extrait des feuilles possèdent une bonne capacité de neutralisation du radical libre DPPH.

Les études menées par **Lagha-Benamrouche et Madani, (2013)** sur les extraits du *Citrus aurantium* ont montré que les pourcentages d'inhibition des extraits d'écorce et des feuilles estimés à 88% et 99,5% respectivement restent relativement supérieurs à nos résultats.

En comparant les résultats des extraits des feuilles obtenus dans notre étude (87 %) à ceux réalisés par d'autres espèces du *Citrus* tels que le *Citrus limettioides* (*Limbanimbu*) (59,85 %) **Janoti et ses collaborateurs, (2014)**, on voit bien qu'ils sont différents et même largement supérieurs.

Par ailleurs, l'étude d'**Al-Juhaimi, (2014)** réalisée sur les extraits des écorces des différents agrumes, présentait un potentiel antioxydant modéré à savoir 46,98% ; 67,58% ; 68,57% pour le citron, oranges, mandarines respectivement.

Cependant, le pourcentage d'inhibition des extraits des pépins obtenu par **Meziani et Saidoune, (2017)** estimé à 24,36% est largement inférieur à celui trouvé dans la présente étude (61%).

Nous avons ensuite déterminé pour chaque extrait la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH (la valeur IC50) (**Mezouar et al., 2014**). En fait, la capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son IC50 est petite (**Lagha-Benamrouche, 2018**).

À partir des équations des régressions linéaires des graphes représentés dans Figures 17, nous avons calculé les IC50 des extraits du *Citrus aurantium* (feuilles, pépins et écorces, qui sont représentées dans la figure 18.

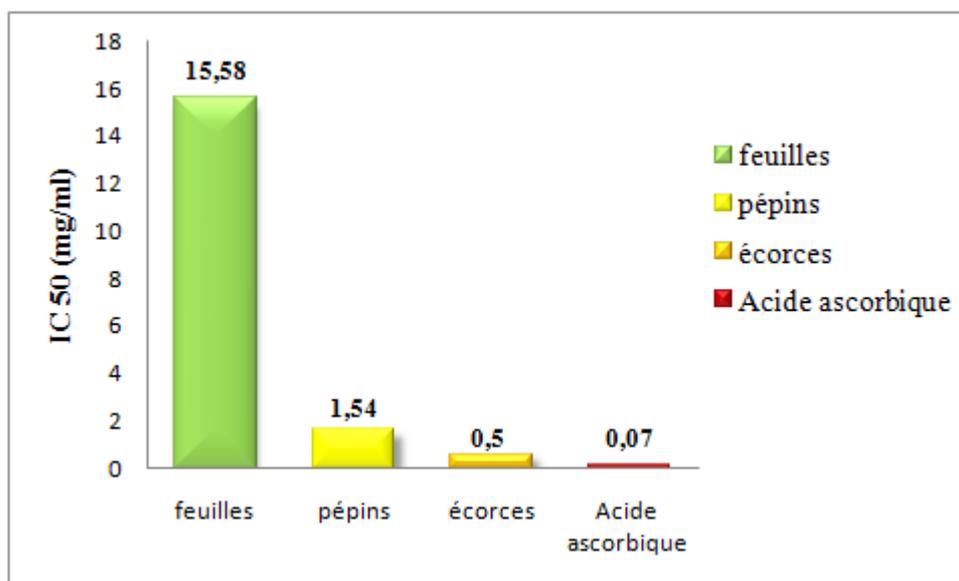


Figure 18: les valeurs d'IC50 des différents extraits et de l'acide ascorbique.

Selon les résultats enregistrés, les trois extraits ; écorces, pépins et feuilles sont dotés d'un pouvoir antioxydant, leur IC50 respective est de 0,50 mg/ml ; 1,54 mg/ml et 15,58 mg/ml. Elle reste cependant, relativement faible que celle de l'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,07 mg/ml.

En comparant nos résultats à d'autres, nous avons remarqué que l'extrait d'écorce (0,50 mg/ml) présente un meilleur effet scavenger que celui obtenu dans l'étude réalisée par **Ghasemiet ses collaborateurs, (2009)** sur l'écorce du *Citrus aurantium* avec une valeur d'IC50 estimé à 1,9 mg/ml.

D'un autre côté, l'étude de **Khettal et al., (2017)** réalisée sur l'extrait des feuilles du *C. aurantium* ont rapporté une valeur d'IC50 plus faible (0,068 mg/ml) que celle enregistré par la notre (15,58 mg/ml).

Quant à la valeur d'IC50 enregistrée dans notre extrait de pépins (1,54 mg/ml), en la comparant avec celui du *Citrus sinensis* issu de la région Bénin de Nigéria (0,18 mg/ml) **Oikeh et al., (2013)**, elle est plus élevée et donc moins active.

On peut dire que, la cinétique de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la concentration et de la conformation structurale du composé (**Li et Sun, 2019**). Pour chaque composé testé, le pourcentage de la réduction de la DPPH augmentait en fonction de la dose à une plage de concentration donnée.

En outre, Il a été prouvé que les composés phénoliques y compris les acides phénoliques et les flavonoïdes, sont largement distribués dans les plantes en tant que responsables de

l'effet scavenger des radicaux libres et de protection contre les stress biotiques et abiotiques (Zhang et Tsao, 2016).

De même, il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique le tocophérol et les flavonoïdes réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène. En effet, les polyphénols contenus dans les extraits du *Citrus aurantium* sont probablement responsables de l'activité antioxydante de ces extraits (Bougandoura et Bendimerad, 2013).

Cependant, les résultats de l'activité antiradicalaire obtenus par nos extraits (pépins, écorces et feuilles) sont différents que ceux repérés dans d'autres études, ce qui peut-être expliquer par les différentes substances chimiques contenues dans la composition des espèces d'agrumes qui se trouvent dans différentes régions (Teneva et al., 2019).

En plus, la variation dans les résultats pourrait s'expliquer par la différence de réactivité des extraits due à leur complexité chimique, la variation des polarités des extraits étroitement liées aux différentes procédures adoptées pour l'extraction du matériel végétal, les conditions expérimentales et le protocole expérimental utilisé ainsi que les facteurs liés à la croissance de l'espèce végétale elle-même (région de récolte, climat et stade de maturité) (Moffouk, 2019) ou biologiques tels que: la lumière, les précipitations, la saison, type de sols, le patrimoine génétique (El-Haoud et al., 2018).

➤ Test de la réduction du fer « FRAP »

Le test du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant (le fer ferrique Fe^{3+}) en lui cédant un électron pour former le fer ferreux Fe^{2+} , c'est une technique rapide, simple, facile et reproductible, considérée comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle des composés végétaux (Moffouk, 2019).

Nous avons testé le pouvoir réducteur des extraits bruts du *Citrus aurantium* et de l'acide ascorbique spectrophotométriquement à 700 nm. Cependant, l'augmentation de l'absorbance signifie une augmentation de pouvoir réducteur (FRAP).

Les résultats obtenus (annexe 5) ont permis de tracer des courbes qui expriment le pouvoir réducteur de tous les échantillons testés (extraits et standard) en fonction des concentrations représentées dans la figure 19.

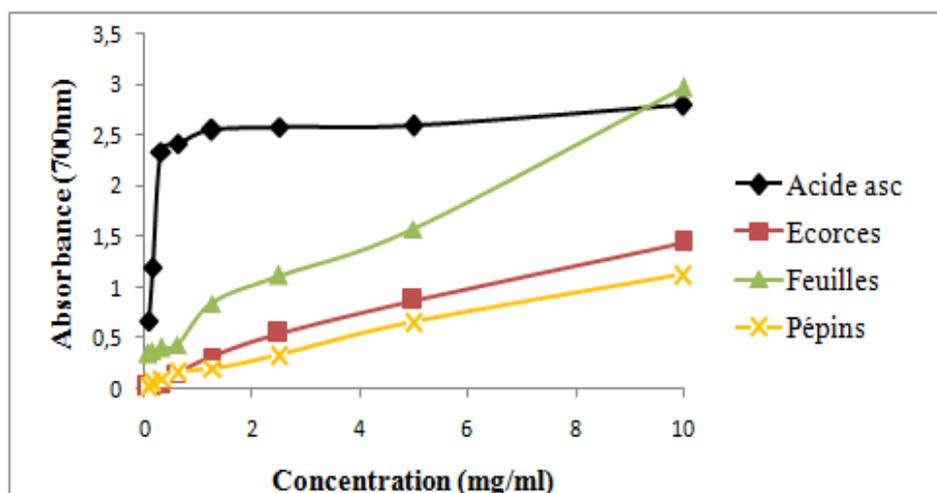


Figure 19 : Le pouvoir réducteur des différents extraits du *Citrus aurantium* et de l'acide ascorbique.

En comparant le pouvoir réducteur de nos extraits (feuilles, écorces et pépins) par rapport à celui de l'acide ascorbique à la concentration de 0,62 mg/ml. Nous remarquons que l'extrait des feuilles a montré la meilleure activité réductrice du fer estimée à 0,45 suivi par l'extrait des pépins (0,18) et enfin l'extrait des écorces (0,15). Cependant ce pouvoir réducteur reste inférieur à celui de l'acide ascorbique avec une absorbance estimée à 2,42.

A la même concentration, le pouvoir réducteur des écorces issues de notre région reste inférieur à celui rapporté par **Lagha-Benamrouche et Madani, (2013)** sur le *Citrus aurantium* de la région de Boumerdès (0,25). D'après ces mêmes auteurs, les résultats obtenus pour l'extrait des feuilles (0,251) sont inférieurs par rapport à celui obtenu dans notre travail (0,45).

Cependant, les travaux d'**El Oikeh, (2014)**, réalisés sur l'extrait des pépins du *Citrus sinensis* de la région de Benin (Nigéria) ont montré un effet antioxydant par la méthode du FRAP (0,19) similaire à celui obtenu pour notre extrait (0,18).

On peut dire que les extraits étudiés du *C. aurantium* exercent une activité antioxydante différente qui peut être liée à leur composition phénolique et dépend fortement de leurs structures (**Brixi Gormat, 2017**).

Les composés phénoliques sont largement répandus dans le règne végétal. Ces composés servent d'antioxydants importants en raison de leurs propriétés redox, qui présentent une fonction importante dans la neutralisation des radicaux libres. Ainsi, ils empêchent l'oxydation de diverses molécules biologiques (**Brixi Gormat et al., 2015**).

III. Activité anti inflammatoire

Afin évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des différents extraits végétaux du *Citrus aurantium*, nous avons utilisé deux tests : inhibition de la dénaturation protéique et évaluation de la protection contre l'hémolyse érythrocytaire.

III.1. Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine)

Afin d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire des substances bioactives des extraits étudiés, un test d'inhibition de la dénaturation d'albumine a été suivi. En effet, la conformation d'une protéine est liée à la structure secondaire et tertiaire, elle est réalisée par l'intermédiaire de liaisons de faible énergie. La dénaturation résulte d'une modification des structures quaternaire, tertiaire et secondaire sans fragmentation de la chaîne peptidique sous l'effet de divers agents chimiques (acide, base) ou physiques (chaleur, pH) (Karthiketal., 2013).

Nous avons évalué l'activité anti-inflammatoire des différents extraits du *Citrus aurantium* (les écorces, les feuilles, les pépins) spectrophotométriquement à 255 nm. L'acide salicylique est utilisé comme standard.

Les résultats de l'effet protecteur de nos extraits (annexe 6) contre la dénaturation protéique (albumine humaine) sont représentés dans la figure 20.

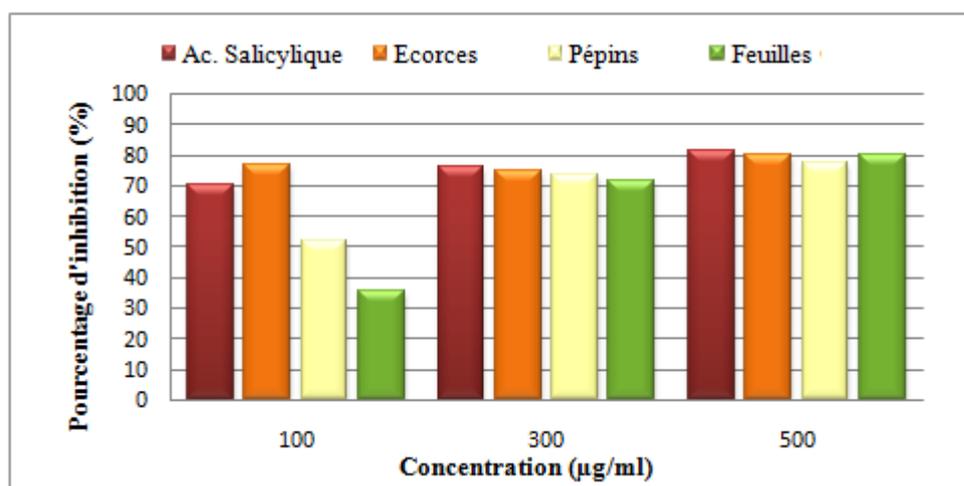


Figure 20: Pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique des différents extraits et de l'acide salicylique.

A partir des résultats obtenus des pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique à différentes concentrations d'extraits méthanoliques d'écorces, feuilles et pépins du *Citrus aurantium*, on constate que le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation des

concentrations pour les extraits et pour l'acide salicylique. En effet, aux mêmes concentrations (100 µg/ml, 300 µg/ml), les écorces présentent le meilleur effet inhibiteur de la dénaturation de l'albumine (76,95% et 74,64%) que l'acide salicylique (70,03% et 70,08%) respectivement. Cependant, à la concentration de 500µg/ml, l'extrait des feuilles dépasse celui de l'écorce avec un pourcentage d'inhibition estimé à 80,26%, presque similaire à celui de l'acide salicylique (81,12%). De même, celui des pépins reste inférieur (76,95%) à celui de l'acide salicylique.

L'étude de **Kashfia et al., (2021)** réalisée sur les oranges douces (*Citrus sinensis*) estime des valeurs plus importantes (88,29%) que celles enregistrées par notre extrait des pépins.

La stabilisation des protéines par nos extraits met probablement en jeu des polyphénols et leurs métabolites qui, selon **Sangita et al., (2012)** agissent comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation.

III.2. Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)

La méthode de stabilisation membranaire des globules rouges a été utilisée pour étudier l'activité anti-inflammatoire *in vitro* car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale (**Marliyah et Ananthi, 2015**).

L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule entraînant la rupture de sa membrane. Un tel type de lésion de la membrane érythrocytaire causera des dommages secondaires par peroxydation lipidique induite par les radicaux libres. On s'attend donc à ce que les composés ayant des propriétés de stabilisation de la membrane offrent une protection significative de la membrane cellulaire contre les substances nocives (**Rahman et al., 2015**). Ces derniers peuvent limiter la réponse inflammatoire en inhibant la libération des constituants lysosomiques des neutrophiles activés tels que les enzymes bactéricides et les protéases (**Kumari et al., 2015**).

Nous avons évalué l'activité anti-inflammatoire de nos extraits spectrophotométriquement à 560 nm. Le standard utilisé était l'acide salicylique. Selon nos résultats, nous avons noté que le pourcentage de stabilisation érythrocytaire augmente avec l'augmentation des concentrations des extraits et de l'acide salicylique dans le milieu réactionnel avec des pourcentages différents (figure 21 ; annexe 7).

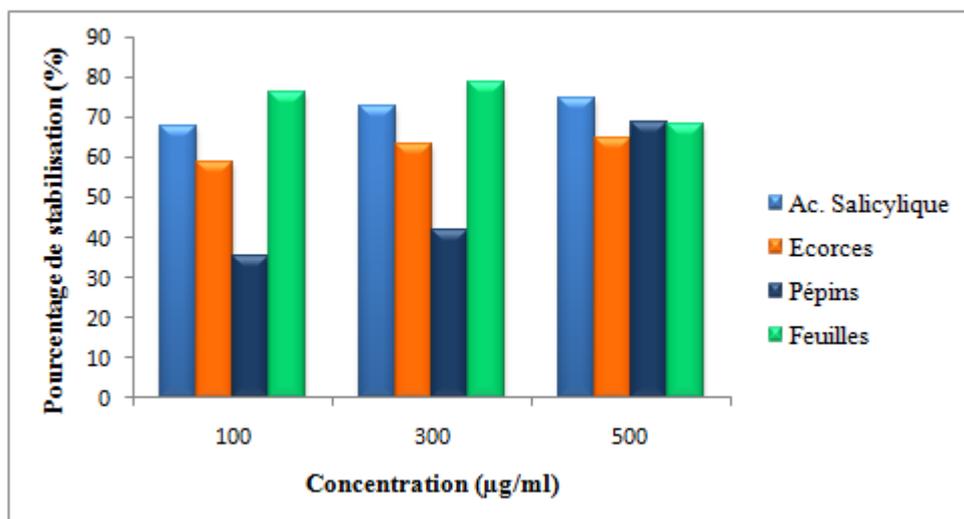


Figure 21: Pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges du *Citrus aurantium* et de l'acide salicylique.

Pour des concentrations allant de 100 à 500 µg/ml, les trois extraits ont montré une activité anti-hémolytique avec un pourcentage de stabilisation allant jusqu'à 78,96% représenté par l'extrait des feuilles et même supérieur à celui de l'acide salicylique entre 100 et 300 µg/ml.

L'extrait des écorces a donné un pourcentage de stabilisation maximale estimé à 68,78% à la concentration de 500 µg/ml. Cependant, à la concentration de 300 µg/ml, l'extrait des pépins quant à lui a enregistré un pourcentage de stabilisation érythrocytaire élevée estimée à 78,96%.

Récemment une étude réalisée par **Anjali et ses collaborateurs (2021)** sur l'écorce du *Citrus nobilis* dans la région de l'Inde, a enregistré, à la concentration de 100 µg/ml, un pourcentage de stabilisation estimé à 60% légèrement supérieure à nos résultats (58,82%).

Selon **Malleshappa et ses collaborateurs, (2018)** tous les extraits des agrumes : l'orange (*Citrus aurantium*);pomelo (*Citrus grandis*) et citron (*Citrus medica*), ont montré une stabilisation significative vis-à-vis de la lyse de la membrane HRBC induite par l'hypotonie à différentes concentrations.

Différentes études menées sur les effets bénéfiques des polyphénols tels que les flavonoïdes qui possèdent une activité anti-inflammatoire remarquable. Ce sont l'un des polyphénols les plus courants et un grand nombre de ces composés ont été évalués sur la santé humaine, à l'état libre ou sous forme de glycosides (**Lenoir, 2011 ; Karthik et al.,2013 ; Tejada et al.,2018**).

Selon **Serafini** et ses collaborateurs (2010), les actions anti-inflammatoires des flavonoïdes *in vitro* ou dans des modèles cellulaires impliquent l'inhibition de la synthèse et des activités de différents médiateurs pro-inflammatoires tels que les eicosanoïdes, les cytokines, les molécules d'adhésion et la protéine C-réactive. Les activités moléculaires des flavonoïdes comprennent l'inhibition des facteurs de transcription tels que NF-kB et l'activation de la protéine-1 (AP-1), ainsi que l'activation du facteur 2 lié au facteur nucléaire-érythroïde 2 (Nrf2).

En plus, les cytokines inflammatoires produites et régulées au niveau de la transcription peuvent soit améliorer, soit inhiber le processus inflammatoire. Il a été observé que plusieurs flavonoïdes sont capables de diminuer l'expression de différentes cytokines/chimiokines pro inflammatoires, notamment le TNF α , l'IL-1b, l'IL-6, l'IL-8 et la protéine 1 chimiotactique des monocytes, dans différents types cellulaires tels que les macrophages, lymphocytes T et cellules mononucléaires du sang (**Serafini et al., 2010**).

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Récemment, nous avons assisté à une augmentation de l'utilisation des plantes médicinales, en raison de leurs propriétés thérapeutiques pour l'homme. Certaines études ont montré que ces plantes contiennent des composés qui agissent comme anti-inflammatoires et antioxydants.

Dans le but de découvrir une des plantes aromatiques médicinales de la famille de Rutacées, issue de la région d'Ain Témouchent, en l'occurrence *Citrus aurantium*. Nous avons contribué à l'exploration de l'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire des extraits bruts.

Tout d'abord, le rendement des extraits bruts du *Citrus aurantium* a montré que l'extrait d'écorce présente le pourcentage la plus élevée (28%) par rapport aux autres extraits ; feuilles et pépins estimés à 16% et 7,5% respectivement.

D'après les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par les deux méthodes DPPH et FRAP, nous avons constaté que l'extrait des feuilles présente le meilleur pouvoir antioxydant par rapport aux autres extraits, il reste cependant inférieur à celui de l'acide ascorbique considéré comme un puissant antioxydant.

Enfin, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire étudiée par la méthode d'inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine) et la stabilisation membranaire des globules rouges du *C. aurantium*, a révélé que les trois parties (feuilles, pépins et écorces) possèdent des capacités anti-inflammatoires importantes atteignant 79% pour la méthode de stabilité érythrocytaire et un pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique allant jusqu'à 80% pour l'extrait des feuilles.

Des essais préliminaires et complémentaires seront nécessaires à différents niveaux tels que :

- Tester ces sous-produits de l'orange amère sur d'autres pathologies comme la COVID-19, le diabète et le cancer.
- Détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires des composés actifs présents dans les extraits du *Citrus aurantium*.
- Détermination des autres activités biologiques, à savoir les propriétés antifongique, antitumorale, anti-infectieuse...etc.

Références Bibliographiques

A

Abdulkhaleq, L. A., Assi, M. A., Abdullah, R., Zamri-Saad, M., Taufiq-Yap, Y. H., & Hezmee, M. N. M. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary world*, 11(5), 627.

AITEUR Kahina et AMRANI Hadjer (2017), Activité anti-oxydante et anti-inflammatoire de la nigelle. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université A. MIRA – Bejaia.

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.

Al-Juhaimi, F. Y. (2014). Citrus fruits by-products as sources of bioactive compounds with antioxidant potential. *Pak. J. Bot.*, 2014. 46(4): 1459-1462.

Aruoma, O. I. (1997). Extracts as antioxidant prophylactic agents. *Inform*, 8(12), 1236-1242.

Aubert, B., & Vullin, G. (1997). *Pépinières et plantations d'agrumes*. Editions Quae.

Aymard, P., Durand, D., & Nicolai, T. (1996). The effect of temperature and ionic strength on the dimerisation of β -lactoglobulin. *International journal of biological macromolecules*, 19(3), 213-221.

B

Baratto, M. C., Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Romani, A., Visioli, F., ... & Pogni, R. (2003). Antioxidant activity of galloyl quinic derivatives isolated from *P. lentiscus* leaves. *Free radical research*, 37(4), 405-412.

Baudin, B. (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020(522), 22-30.

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/.

BEN SEDDIK, K. Z., & BEN SEDDIK, M. O. (2021). *L'effet de méthode d'extraction sur la production d'huiles essentielles à partir de citrus aurantium (région de Ghardaïa)* (Doctoral dissertation).

- Benavente-Garcia, O., & Castillo, J. (2008).** Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6185-6205.
- Bénédicte ET Michel, B. (2011).** *Agrumes comment les choisir ET cultiver facilement. Les éditions eugenulmer*, 8 rue Blanche, Paris, N° d'édition: 440-01.p.127.
- 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.
- Boubekri, C. (2014).** *Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanum melongena par des techniques électrochimiques* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
- Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* sp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, (9), 14.
- 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. 128p.
- 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.
- Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., & Chaabouni, M. M. (2008).** Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. (2008).** Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food chemistry*, 111(4), 925-929.
- Brand-Williams, W., M. Cuvelier & C. Berset (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- BRIXI GORMAT, N., BELARBI, M., MAMI, Z., DJAZIRI, F. A. (2015).** Physico-Chemical Characteristics and antioxidant Activity of Phenolic compounds and oil of *Citrus aurantium* Seeds from Northwest Algeria. *International Journal of Phytomedicine* 7, 370- 378.

Ƨ

Carange, J. (2010). *Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection?* (Doctoral dissertation, Université du Québec à Trois-Rivières).

Cavaillon, J. M. (1993). Cytokines et inflammation. *Veterinary Research*, 24(4), 368-369.

Chentouh, S., Boulahbel, S., Adjaj, F., Tolba, M., Alloua, N., MOUMEN, Y., & BENTAYEB, Y. (2018). Effets des extraits organiques de *Buniumincrassatum* sur quelques paramètres hématologiques chez les lapines de population la race locale. *Revue des bio ressources*, 8(2), 9-9.

Ƨ

Deng, M., Jia, X., Dong, L., Liu, L., Huang, F., Chi, J., ... & Zhang, R. (2022). Structural elucidation of flavonoids from Shatianyu (*Citrus grandis* L. Osbeck) pulp and screening of key antioxidant components. *Food Chemistry*, 366, 130605.

Deterre, S. (2012). Influence des étapes de production du parfum issu des écorces d'orange amère (*Citrus aurantium* L. ssp. *amara*) sur la qualité aromatique (Doctoral dissertation, Paris, AgroParisTech).

Djamil, P. K. (2020). *Profil phénolique de quelques ressources végétales et pouvoir antioxydant* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem).

Ƨ

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*, 266-233.

Ercan, B. ET Ilhami, G.U. (2011). Polyphénol contents and *in vitro* antioxydant activities of lyophilised aqueous extract of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, 44: 1482-1489.

Escartin I. (2011). Guide des agrumes. Fondation d'entreprise pour la protection Et la valorisation du patrimoine végétal. L'Institut Klorane. p.13

F

- Faucon, M. (2015).** Traité d'aromathérapie scientifique et médicale : Fondements & aide à la prescription. Édition sang de la terre, Paris, pp: 39-455.
- 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.
- Ferdjioui, S. (2020).** *Activités biologiques de deux plantes médicinales MentharotundifoliaL. et Lamium amplexicauleL* (Doctoral dissertation).
- Ferdjioui, S. (2020).** *Activités biologiques de deux plantes médicinales MentharotundifoliaL. et Lamium amplexicauleL* (Doctoral dissertation).
- Fleming T (2001).** PDR for herbal medicines. *Citrus aurantium*. Section edition. pp. 86-87.
- Fraipont, V., & Preiser, J. C. (2017).** Mise à jour sur l'utilisation des pharmanutriments chez le patient agressé—deuxième partie: antioxydants, acide gras oméga-3. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 31(1), 16-23.
- 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.

G

- 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).
- 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.
- Ghédira, K., & Goetz, P. (2015).** *Citrus aurantium L. var. amara* Link. *Phytothérapie*, 13(5), 320-327.
- Gonzalez-molina, E., Dominguez-perles, R., Moreno, D.A. ET Garcia-viguera. (2010).** Natural bioactive compounds of *citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 327-345.
- 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 reticulata* 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.

H

Hadjiakhoondi A, Baligh N (2005). Practical Guidance of Medicinal Plants. IslamicAzadUniversity Scientific Publication Center, Tehran:pp. 5-20.

Hadrich, B., Dahak, K., Abdenouri, N., &Kechaou, N. (2009).Etude de séchage des feuilles de bigaradier. *Revue des énergies renouvelables*, 145-149.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.

Hendrix, C. M., &Redd, J. B. (1995).Chemistry and technology of citrus juices and by-products. In *Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages* (pp. 53-87). Springer, Boston, MA.

I

İ , Ö., Özç , M. M., & A juh m , F. (2017). Effect of location and Citrus species on total phenolic, antioxidant, and radical scavenging activities of some Citrus seed and oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), 1-8.

J

Janoti, D. S., Rana, M., & Rawat, A. K. S. (2014). Comparative antioxidant activity of essential oil of leaves of *Citrus limettioides* and *Citrus pseudolimon* of Nainital District. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5), 24-26.

Jardin MuséeBalaguier. (2015), CANOPE édition.

John, K. K., &Shcherazade, D. O. S. F. (2021).Activité Anti-inflammatoire Et Études Phytochimiques De L'extraitAqueux Des ÉcorcesDistemonanthusBenthamianusBaill.(Caesalpinioideae): Leguminosae-Caesalpinioideae). *Europeanscientific Journal*, 17(7), 74-93.



- Kaidi Sami. (2019).** Production d'agrumes en 2018 : plus de 14 millions de quintaux. EL MOUDJTAHID ,2019.reperé 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.
- Kar, B., Kumar, R. S., Karmakar, I., Dola, N., Bala, A., Mazumder, U. K., & Hadar, P. K. (2012).** Antioxidant and in vitro anti-inflammatory activities of *Mimusopselengi* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S976-S980.
- Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygun, D. A. (2008).** Antioxidant Activity And Proline Content Of Leaf Extracts From *DorystoechasHastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.
- Karthik, K., Bharath, R.P., Venu Priya, R., Sunil Kumar, K., Ranjith Singh, B., Rathore. (2013).** Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* byin-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* 2320 –3471.
- 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.
- 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.
- Kim, D. O., & Lee, C. Y. (2004).** Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(4), 253-273.
- Kumar, G., Karthik, L., & Rao, K. V. B. (2011).** Hemolytic activity of Indian medicinal plants towards human erythrocytes: an in vitro study. *Elixir Appl Botany*, 40(5534), e5537.
- Kumari, C. S., Yasmin, N., Hussain, M. R., & Babuselvam, M. (2015).** Invitro anti-inflammatory and anti-artheritic property of rhizoporamucronata leaves. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 6(3), 482-485.

L

- Labu, Z.K., Laboni, F.R., Tarafdar, M., Howlader, M.S.I. et Rashid, M.H (2015).** Membrane stabilisation as a mechanism of anti-inflammatory and thrombolytic activities of ethanolic extract of arial parts of *Spondiaspinanata* (family: Anacardiaceae) *PhOL*, 2: 44-51.
- Ladoh, Y. C. F., Dibong, S. D., Nyegue, M. A., Djembissi, T. R. P., Lenta, N. B., Mpondo, M. E., ... & Wansi, J. D. (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmantheracapitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*, 84, 7636-7643.
- 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.
- Lagha-Benamrouche, S., Addar, L., Boudershem, H., Tani, S., & Madani, K. (2018).** Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Revue Nature et Technologie*, 10(1), 112-115.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-282.
- Latino-Martel, P., & Bachman, P. (2012).** Nutrition chez le patient adulte atteint de cancer: compléments alimentaires antioxydants pendant et au décours du traitement des cancers. *Nutrition clinique et métabolisme*, 4(26), 238-246.
- Li, L. Sun, B. (2017).** Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-18.
- Li, L., & Sun, B. (2019).** Grape and wine polymeric polyphenols: Their importance in enology. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(4), 563-579.

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.

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.

M

Mader, SS. (2010). Biologiehumaine, 1ère édition. Bruxelles : Edition De Boek.

Malleshappa, P., Kumaran, R. C., Venkatarangaiah, K., & Parveen, S. (2018). Peels of citrus fruits: A potential source of anti-inflammatory and anti-nociceptive agents. *Pharmacognosy Journal*, 10(6s).

Mangambu, M. D. D., Mushagalusa, K. F., & Kadima, N. J. (2014). Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, RD Congo). *Journal of Applied Biosciences*, 75, 6211-6220.

Marliyah M. and Ananthi T. In vitro anti-inflammatory activity of seed extract of Zea Mays (L.), 2015. *J. Journal of Global Biosciences*. Vol. 4, n°5, p. 2168-2173.

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.

Matés, J. Perez-Gomez, C. Nunez Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *ClinicalBiochemistry Journal*, Vol 32, pp. 595-603.

Meziani Lamia et Saidoune Sabrina (2017), Activités antioxydants 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.

Mezouar, D., Lahfa, F. B., Djaziri, R., & Boucherit-Otmani, Z. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante de *Berberis vulgaris L.* *Phytothérapie*, 12(5), 297-301.

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.

Miguel, M.G, 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review *Flavour and Fragrance Journal* 25, 291-312.

Références Bibliographiques

Milind, S. L. (2008). Citrus fruit: biology, technology and evaluation. *London WC1X 8RR, UK: Elsevier*, 1-4.

Militello, V., Vetri, V., & Leone, M. (2003). Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophysicalchemistry*, 105(1), 133-141.

Molet, S. (1996). *Interactions des cellules endothéliales humaines avec les médiateurs de l'inflammation: application à la pathologie respiratoire* (Doctoral dissertation, Lille 1).

MOUFFOUK, C. (2019). *Evaluation des activités biologiques et étude de la composition chimique de la plante Scabiosastellata L* (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).

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.

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.

N

Nawrin, K., Billah, M. M., Ahmed, F., Hossin, A., Tushar, R. R., & Islam, M. N. (2021). Protective potential of *C. sinensis* fruit peel aqueous extract on in vitro inflammation.

O

ObameEngonga, L.C. (2009). Etude phytochimique, activités antimicrobiennes et antioxydantes de quelques plantes aromatiques et médicinales africaines. Thèse de doctorat unique pour l'obtention du grade de docteur ès sciences biologiques appliquées. Université d'Ouagadougou. 258p.

Oikeh, E. I., Oriakhi, K., Omoregie, E. S. (2013). Proximate Analysis and Phytochemical Screening of *Citrus sinensis* Fruit Wastes. *The Bioscientist Journal*. 1(2):164-170.

Oikeh, E. I. (2014). Phenolic content and in vitro antioxidant activities of sweet orange (*Citrus sinensis* L.) fruit wastes. *Archives of Basic and Applied Medicine*, 2(2), 119-126.

OUALI Thilili & SADOUNI Yamina (2017). Evaluation *in vitro* des activités antioxydante et anti inflammatoire des huiles essentielles de l'écorce de *Citrus limon*. Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université A. MIRA – Bejaia.

OUGUELMANE, A., & HOUICHITI, R. (2020). Etude des activités biologiques d'une plante aromatique médicinale locale" *Citrus aurantium* (Doctoral dissertation, Université de Ghardaïa).

Owen, P. L., & Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of ethnopharmacology*, 64(2), 149-160.

P

Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., ... & Huang, F. (2008). Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel. *Food chemistry*, 106(3), 1264-1270.

Parihar, A., Parihar, MS., Milner, S. (2008). Bhat S. Oxidative stress and antioxidant mobilization in burn injury. *Burns*, 34:6-17.

Polese J.M. (2008). Culture d'agrumes. Edition artémis.

R

Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S., Bashir, N., Nazir, F. & Nayik, G. A. (2016). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. doi.org/10.1016.

Rahman, H., Eswaraiah, M. C., & Dutta, A. M. (2015). In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza Sativa* Var. joha rice (an aromatic indigenous rice of Assam). *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 15(1), 115-121.

Rahman, H., Eswaraiah, M. C., & Dutta, A. M. (2015). In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza Sativa* Var. joha rice (an aromatic indigenous rice of Assam). *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 15(1), 115-121.

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219.

Ramful D., Tarnus E., Aruoma O. I., Bourdon E., Bahorun T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps; *Food Research International*; 44: 2088-2099.

Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., & Aruoma, O. I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedro 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.Repéré:https://www.researchgate.net/publication/272761111_In_vitro_antioxydant_activities_of_leaves_fruits_and_peel_extract_of_Citrus.

Ribéreau-Gayon, P. (1972). Propriétés chimiques des phénols. In "les composés phénoliques des végétaux ". Edition Dunod Paris, p: 29-57.

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.

Royer, M., Houde, R., Stevanovic, T. (2010). Volet 2: Technologies de Conversion, sciences du bois et de la forêt,CRB,. Université Laval de Canada p. 118.

J

Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., &Saddozai, A. A. (2017).Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata L.*) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(3), 488–500.

Sanchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Int. Journal of Food Science Tech.* 8 : 121-137.

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.

Sangita, C., Priyanka, C., Protapaditya, D., Sanjib, B. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein Asian Pacific. *Journal of Tropical Biomedicine*, S178-S180.

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.

Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.

Séguier, S. (2000). *L'inflammation gingivale et les cellules de Langerhans au cours des parodontopathies chez l'homme* (Doctoral dissertation, Paris 5).

Seifried, H. E., Anderson, DE., Fisher EI, Milner JA. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal o Nutritional Biochemistry*; 18: 567–579.

Références Bibliographiques

Sidana J, Saini V, Dahiya S, Nain P, Bala S (2013). A review on citrus ‘the boon of nature. Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 18: 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.

Srivastava, A. K. (Ed.). (2012). Advances in citrus nutrition. Springer Science & Business Media.

T

Tejada, S., Pinya, S., Martorell, M., Capó, X., Tur, J. A., Pons, A., & Sureda, A. (2018). Potential anti-inflammatory effects of hesperidin from the genus citrus. *Current medicinal chemistry*, 25(37), 4929-4945.

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.

Tessier, F., & Marconnet, P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & sports*, 10(1), 1-13.

Teuscher, E., Anton, R., & Lobstein, A. (2005). *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Tec & Doc.

Thanh, T. B., Duc, L. V., Thanh, H. N., & Tien, V. N. (2017). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of isolated compounds of ethanol extract from *Sanchezia speciosa* Leonard’s leaves. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 28(1), 79-84.

Thanh, T. B., Duc, L. V., Thanh, H. N., & Tien, V. N. (2017). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of isolated compounds of ethanol extract from *Sanchezia speciosa* Leonard’s leaves. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 28(1), 79-84.

Tripoli, E.; La Guardia, M.; Giammanco, S.; Di Majo, D.; Giammanco, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* 2007, 104, 466–479.

V

Ventrella, M. C., & Marinho, C. R. (2008). Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. *Brazilian Journal of Botany*, 31(3), 457-467.

W

Webber, H.J., Reuther, W., ET Batcholor, L.D. (1967). The citrus industry, volume 1: History, world distribution, botany and varieties. Edition. University of California press.

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. *ComptesRendus Chimie*, 19(6), 754-765.

Z

Zargari A (1997). Medicinal plant. Seventh edition. Tehran, Tehran Publication University, pp. 485-478.

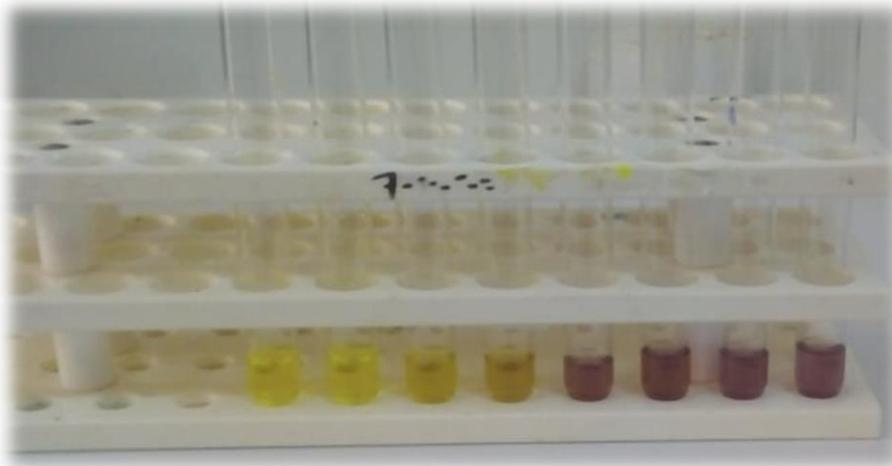
Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.

Zhang, H., Yang, Y., & Zhou, Z. (2018). Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1), 256–263.

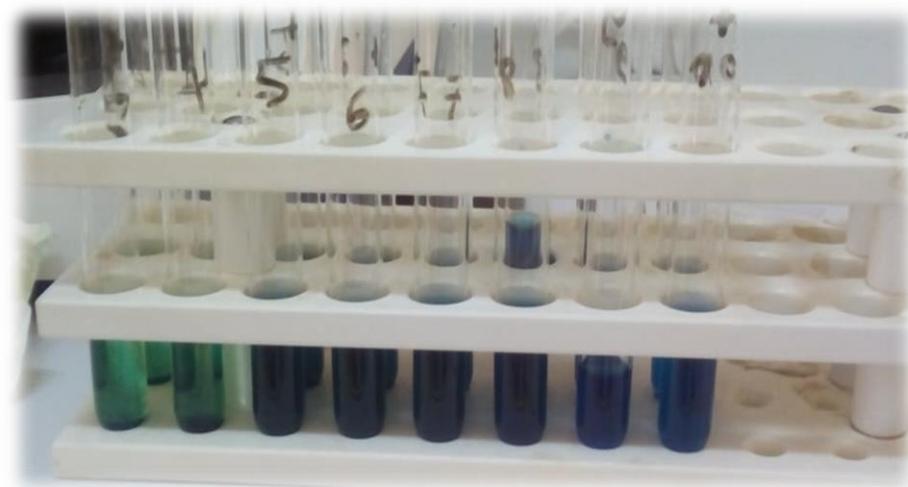
Zia-ur-Rehman. (2006). Citrus peel extract-A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*, 99(3), 450-454.

Les Annexes

Annexe 1: Test de piégeage du DPPH par l'acide ascorbique et des extraits du *Citrus aurantium*.

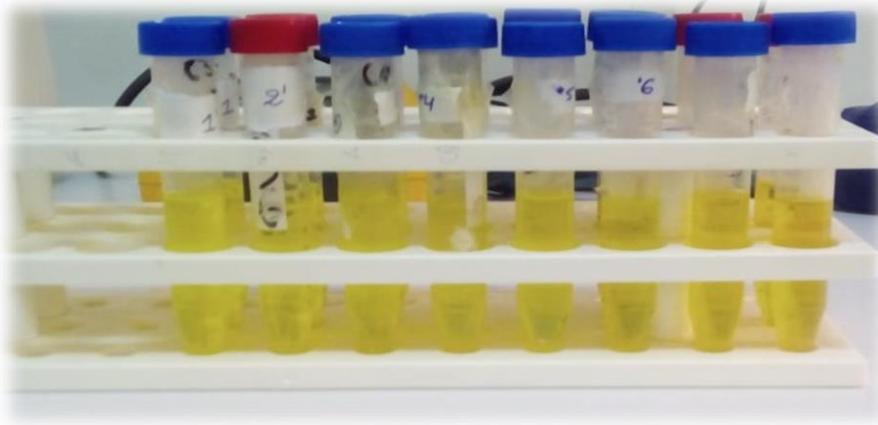


Annexe 2 :Test de FRAP des différents extraits du *Citrus aurantium*.

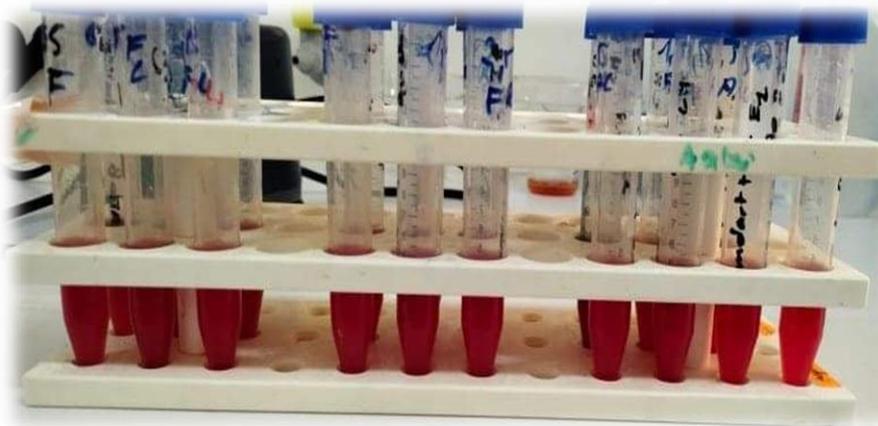


Les Annexes

Annexe 3 : Test d'Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine) des différents extraits du *Citrus aurantium*.



Annexe 4 : Test de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire).



Annexe 5 : Le pouvoir réducteur des différents extraits du *Citrus aurantium* et de l'acide ascorbique

Concentration (mg/ml)	Acide ascorbique	Ecorces	Feuilles	Pépins
0,075	0,67	0,02	0,349	0,0315
0,15	1,207	0,037	0,383	0,075
0,31	2,34	0,0425	0,407	0,106
0,62	2,42	0,152	0,4455	0,1765
1,25	2,55	0,32	0,8465	0,208
2,5	2,58	0,555	1,1225	0,341
5	2,59	0,8795	1,583	0,665
10	2,8	1,45	2,9695	1,1345

Annexe 6 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique des différents extraits et de l'acide salicylique.

Concentration (µg/ml)	Pourcentage d'inhibition de la dénaturation (%)			
	<i>Ac. Salicylique</i>	<i>Ecorces</i>	<i>Pépins</i>	<i>Feuilles</i>
100	70,03	76,95	52,02	35,73
300	76,08	74,64	73,63	71,47
500	81,12	79,97	77,09	80,26

Annexe 7: Pourcentage de la stabilisation de la membrane des globules rouges du *Citrus aurantium* et de l'acide salicylique.

Concentration (µg/ml)	Pourcentage d'inhibition (%)			
	<i>Ac. Salicylique</i>	<i>Ecorces</i>	<i>Pépins</i>	<i>Feuilles</i>
100	67,65	58,82	35,29	76,02
300	72,85	63,12	41,86	78,96
500	74,66	64,93	68,78	68,10