

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département de Science de la nature et de la vie



Projet de Fin d'Etudes
En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie
Option : Biochimie

**Étude in vitro des activités biologiques des extraits
des écorces d'oranges**

Présenté Par :
EL HABIB DAHO Sarra et DAOUDI Zahra
Encadrant :

Mme. BOUDGHENE-GUERRICHE AMINA
Maitre de conférences "A" à U.B.B.A.T.
Soutenu en juin 2022

Devant le jury composé de :

Président : Mr. BENNABI Farid (M.C.A)

U.B.B.A.T

Examineur : Mme. TAHARI Fatima Zohra (M.C.B)

U.B.B.A.T.

Encadrant : Mme. BOUDGHENE-GEURRICHE Amina (M.C.A)

U.B.B.A.T

A nos parents bien aimés

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a Donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Nous remercions notre encadrant madame **BOUDGHENE-GUERRICHE AMINA**, maitre de conférences «A» à l'UBBAT pour son rôle en supervisant ce projet, principalement pour sa patience avec nous, pour le savoir et les conseils qu'elle nous a transmis, pour son encouragement lorsqu'on voulait abandonner et surtout pour le temps qu'il nous a consacré, sans elle on n'aurait jamais pu réaliser ce modeste travail. Nous la remercions d'avoir contribué à la réalisation de celui-ci dans les conditions les plus extrêmes et pour ses bonnes explications qui nous ont éclairé le chemin de la recherche. Veuillez trouver ici cher Madame un hommage vivant à votre haute personnalité ainsi que l'expression de notre profonde estime/

On tient également a remercié Mr **BENNABI Farid**, Maitre de conférences «A» à l'UBBAT, pour l'honneur quelle nous a fait en acceptant de présider notre jury.

On remercie également Madame **TAHARI Fatima Zohra**, Maitre de conférences «B» à l'UBBAT, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous souhaiterons remercier l'ensemble de nos enseignants de l'UBBAT qui ont eu la gentillesse de répondre à nos questions pendant notre cursus universitaire.

EL HABIB DAHO SARRA

DAOUDI ZAHRA

Résumé

Les industries génèrent une large quantité de déchets tels que les écorces d'oranges. Elles sont une source importante de métabolites secondaires, L'écorce est la partie où les extraits méthanoliques, éthanoliques se retrouvent en grande quantité ils ont des effets bénéfiques sur la santé humaine car ils possèdent de nombreuses d'activités biologiques. Dans cette optique nous avons évalué les activités biologiques de l'extrait éthanolique et méthanolique. Nos résultats on démontrés une cytotoxicité important de nos extraits méthanoliques et éthanoliques a une concentrations élevés, de plus les résultats de ce présent travail démontrent que l'extraits éthanoliques et méthanoliques a des effets anti-hémolytique considérables comparativement aux molécules de référence testée, l'extraits éthanoliques et méthanoliques a aussi révélé une inhibition efficace de la dénaturation thermique de l'albumine bovine avec des pourcentages maximaux de l'extrait méthanol a 86%, éthanol a 96% et 99,18% de diclofénac. Notre travail permet donc de conclure que les extraits des écorces d'oranges possèdent des effets qui lui procurent des activités anti-inflammatoires et anti-hemolitique à des concentrations bien déterminé.

Mots clés : les extraits éthanoliques et méthanoliques, les écorces d'orange, activités biologique.

Abstract

Industries generate a large amount of waste such as orange peels. They are an important source of secondary metabolites, the peel is the part where methanolic, ethanolic extracts are found in large quantities they have beneficial effects on human health because they possess many biological activities. In this perspective we have evaluated the biological activities of the ethanolic and methanolic extracts. Our results showed a significant cytotoxicity of our methanolic and ethanolic extracts at high concentrations, moreover the results of this present work demonstrate that the ethanolic and methanolic extracts have considerable anti-hemolytic effects compared to the reference molecules tested, the ethanolic and methanolic extracts also revealed an effective inhibition of the thermal denaturation of bovine albumin with maximum percentages of methanol extract at 86%, ethanol at 96% and 99.18% of diclofenac Our work therefore allows us to conclude that the extracts of orange peels have effects that provide anti-inflammatory and anti-hemolytic activities at well determined concentrations.

Key words: ethanolic and methanolic extracts, orange peels, biological activities.

المخلص

تنتج الصناعات كمية كبيرة من النفايات مثل قشور البرتقال. إنها مصدر مهم للألياف الثانوية، والقشر هو الجزء الذي توجد فيه المستخلصات الميثانولية والإيثانولية بكميات كبيرة ولها آثار مفيدة على صحة الإنسان لأنها تمتلك العديد من الأنشطة البيولوجية. من هذا المنظور، قمنا بتقييم الأنشطة البيولوجية للمستخلصات الإيثانولية والميثانولية. أظهرت نتائجنا سمية خلوية كبيرة لمستخلصاتنا الميثانولية والإيثانولية بتركيزات عالية، علاوة على ذلك، أظهرت نتائج هذا العمل الحالي أن المستخلصات الإيثانولية والميثانولية لها تأثيرات كبيرة مضادة للانحلال مقارنة بالجزيئات المرجعية التي تم اختبارها، كما كشفت المستخلصات الإيثانولية والميثانولية. تثبيط فعال للتمسخ الحراري لألبومين الأبقار مع نسب قصوى من مستخلص الميثانول عند 86%، والإيثانول بنسبة 96% و99.18% من ديكلوفيناك، ولذلك فإن عملنا يسمح لنا باستنتاج أن مستخلصات قشور البرتقال لها تأثيرات توفر مضادًا للالتهابات والأنشطة المضادة للانحلال بتركيزات محددة جيدًا.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات الإيثانولية والميثانولية، قشور البرتقال، الأنشطة البيولوجية

Liste des abréviations

CMR : Polyméthoxylated flavones

GRH : globules rouge humaine

HMF : heptaméthoxyflavone

HFF : Human Foreskin Fibroblasts

HepG2 : carcinome hépatocytaire du foie

IL-1 : l'interleukine – 1

LPS : lipopolysaccharide

MTT : test de prolifération

MTS : test de prolifération déterminent la viabilité cellulaire in vitro

PMF : les flavones polyméthoxylées

PNT2 : l'épithélium de la prostate humaine

SBA : sérum albumine bovine

TNF- α : nécrose tumorale- α

Listes des figures :

Figure 1 :Structure de l'orange	4
Figure 2 :schéma détaillante structure d'Orange	5
Figure 3 : Les différentes causes de l'inflammation et ses conséquences	11
Figure 4 : Comparaison des pourcentages d'hémolyse des globules rouges entre l'acide gallique et les extraits méthanoliqueset éthanoliquesdes écores d'orange.....	18
Figure 5 :Comparaison de l'activité anti-hémolytique de l'acide gallique, d'Ibuprofène et des extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'oranges.....	20
Figure 6 : Comparaison de l'inhibition de la dénaturation protéique par l'Ibuprofène et l'extrait méthanolique et éthanolique des écorces d'oranges.....	22

Listes des tableaux :

Tableau 1 : Composition des différentes parties du l'orange.....	4
Tableau 2: Composition chimique globale des écorces d'orange	5

Table des matières

Introduction	1
---------------------------	---

Etat actuel du sujet

1. Généralités	2
2. Les variétés et la structure de l'orange.....	3
3. Valorisation des déchets de l'écorce d'orange.....	6
4. Activités biologiques des écorces d'Orange	9

Matériels et méthodes

1. Détermination de l'activité cytotoxique anti-hémolytique, anti-inflammatoire et antioxydante des extraits des écorces d'orange :.....	14
1.1 Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh).....	14
1.2 Test de cytotoxicité des écorces d'orange.....	14
1.3 Evaluation de l'activité anti-hémolytique, in vitro, des extraits éthanolique et méthanolique par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges.....	15
1.4. Activité Anti-inflammatoire des extraits éthanolique et méthanolique des écorces d'orange.....	15

Résultats

1. Test de cytotoxicité des extraits des écorces d'orange	17
2. Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges) des extraits des écorces d'orange	19
3. Activité anti-inflammatoire de l'extraits méthanolique et éthanolique des écorces d'orange	21

Discussion	23
-------------------------	----

Conclusion	29
-------------------------	----

Références Bibliographiques	30
--	----

Introduction

Les propriétés biologiques importantes, pour l'être humain, telles que les propriétés antioxydants, anti-inflammatoires et anti-hémolytique peuvent être trouvées chez les différents organismes vivants **(Ebrahim et al., 2011 ; Hermes, 2005 ; Stintzi et al., 1993)**. Ces propriétés sont nécessaires et sont utilisées dans différentes industries comme les industries alimentaires **(Gurung et al., 2013)**, les industries pharmaceutiques et les industries cosmétiques **(Cowan, 1999 ; Radulović et al., 2013)**.

Bien que des recherches récentes aient démontré que les déchets d'agrumes sont riches en plusieurs produits chimiques à valeur ajoutée **(Poonam et al., 2022)**, qui sont toujours l'une des inspirations les plus importantes pour la découverte et la conception de nouvelles entités chimiques **(Matos et al., 2015)**.

L'utilisation des oranges engendre de nombreux déchets ou sous-produits qui peuvent être exploités dans de nombreux domaines **(Ico, 2007)**, les écorce d'orange sont une ressource potentiellement précieuse qui peut être transformée en produits de grande valeur et ça valorisation pour développer une bio économie et réduire ses impacts environnementaux négatifs est évaluée **(Siles et al., 2016)**. les écorces qui ont longtemps été utilisés comme ingrédient actif dans la plupart des médicaments traditionnels **(Mesaik et al., 2016)**, grâce à leur richesse en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques) **(Tian et al., 2010)**.

Les extraits des écorces d'orange riches en polyphénols essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques constitueraient de nouveaux ingrédients naturels potentiels pour les secteurs cosmétiques et de santé nutrition, en tant qu'actifs pour la peau ou compléments alimentaires antioxydants **(Francezon et Nellie, 2018)**, les extraits ont des diverses activités biologiques tels que les activités anti-hémolytique, anti-inflammatoire et anti-oxydante **(Abid et al., 2010)**.

L'objectif de notre étude est de déterminer in vitro la cytotoxicité des extraits éthanoliques et méthanoliques de l'écorce d'orange, et leurs activités biologiques à savoir leur activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire. Afin de valorise des sous-produits d'orange et de l'exploiter dans plusieurs domaines comme la nutrition, la cosmétique et la pharmacologie.

Etat actuel du sujet

1. Généralités

Les agrumes ont des propriétés thérapeutiques importantes et des composés biochimiques, sont une ressource précieuse pour l'humanité (**Tanaka, 1977**). Leurs métabolites secondaires ont un impact significatif sur la vie humaine (**Pereira et López, 2017**).

Parmi ces agrumes se trouve l'orange se dit « larenja » au 17ème siècle, son appellation était Orange qui peut être aussi appelé hesperidium car elle possède une peau dure et solide qui protégé la partie comestible du fruit (**Davies et albrigo, 1994**), qui appartient au genre Citrus de la famille des Rutacées.

Il existe deux espèces d'oranges dans le genre Citrus, les oranges douces sont représentées par Citrus sinensis (L.) Os Beck, qui contient de nombreuses molécules actives telles que les citroflavonoïdes (**Ernould et audrey, 2012**). Tandis que les oranges amères sont représentées par Citrus aurantium qui sont également connues sous le nom de bigarades, elles sont peu appétissantes et servent principalement à faire des marmelades ou des huiles essentielles (**Kimballi, 1999**).

Les écorces d'orange sont une source de composé biologiquement actif, elles sont riches en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques) (**Tian et al., 2001 ; Fisher et Phillips, 2006 ; Singh et al., 2010**). Les écorces d'oranges sont aussi riche en vitamine C et en métabolites secondaires tels que les composés phénoliques en particuliers les flavonoïdes et les huiles essentielles, ces dernières sont les composés les plus importants grâce à leurs diverses activités biologiques (**Benamrouche et al., 2017**),

Classification

Règne : Plante

Classe : Magnoliopsid

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : Citrus

Espèce : Citreae (**Osbeck, 2014**).

2. Les variétés et la structure de l'orange

Les oranges douces sont les plus comestibles et sont utilisées « en fruits » et servent à l'élaboration des jus. On distingue trois principales variétés d'oranges (**Fanciullino et al., 2008**).

Les oranges blondes (**Fanciullino et al., 2008**), les oranges navales (**Kimballi, 1999**), et les oranges sanguines (**Berlint, 2016**) qui sont riches en anthocyanes (**Begoña, 2020**).

L'orange naturelle et synthétique elle est riche en eau (plus de 85%), elle se retrouve sous forme dissoute dans la plupart des éléments nutritifs (**Berlinet, 2008**). Elle contient 23 éléments nutritifs essentiels, y compris les glucides (40% de saccharose), de la vitamine C, vitamines PP, B1, B2, B3, B9, E, provitamine A, riche en calcium, fer, phosphore, et également des protéines, de l'acide citrique, et les polyphénols (**Sabri, 1980**).

L'orange ayant des pulpes qui sont des glandes sébacées remplies d'huiles essentielles, Les sections suivantes du fruit peuvent être distinguées à l'aide de la tranche transversale (Figure 1) (**Belouahri, 1999**).

Les pépins sont formés par l'union de deux cellules sexuelles, l'anthérozoïde de la particule du pollen d'une part, et l'ovule de l'ovaire d'autre part (**Goma, 1998**).

Le quartier qui est un segment d'agrume entouré d'une fine membrane contenant la pulpe et les pépins est produit par un ovaire séparé de la même fleur (voir tableau 1) (**Huet et al., 1991**).

Les écorces, sont constituées de l'épicarpe appelé flavédo qui contient les principaux pigments qui donnent la couleur aux agrumes sont appelés les chlorophylles (vert), les caroténoïdes (jaune, orange et orange foncé) (**Ladaniya, 2008**). Le mésocarpe appelé albédo (pectine et polyphénols (flavonones)) et l'endocarpe (pulpe) continent des fibres et polyphénols (Figure 2) (**Goma, 1998**).

Sa composition chimique riche en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques) (voir le tableau 2) (**Goulas et al., 2012**).

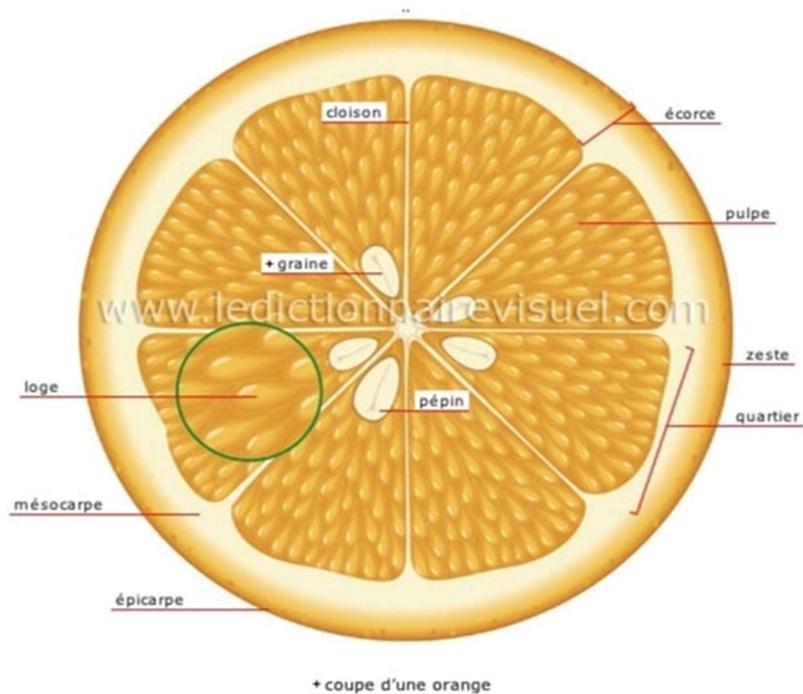


Figure 1 : Structure de l'orange (Huet, 1991).

Tableau 1 : Composition des différentes parties du l'orange (Ferhat et al., 2011).

Partie	Composition
Écorce (Épicarpe, Mésocarpe)	Eau, sucre, protéines, Huile essentielles, pigments, caroténoïdes, pectine, vitamine
La Pulpe	Eau, pigments, sucre
Les pépins	Lipides, huile essentielle
Le quartier	Cellulose, Pectine

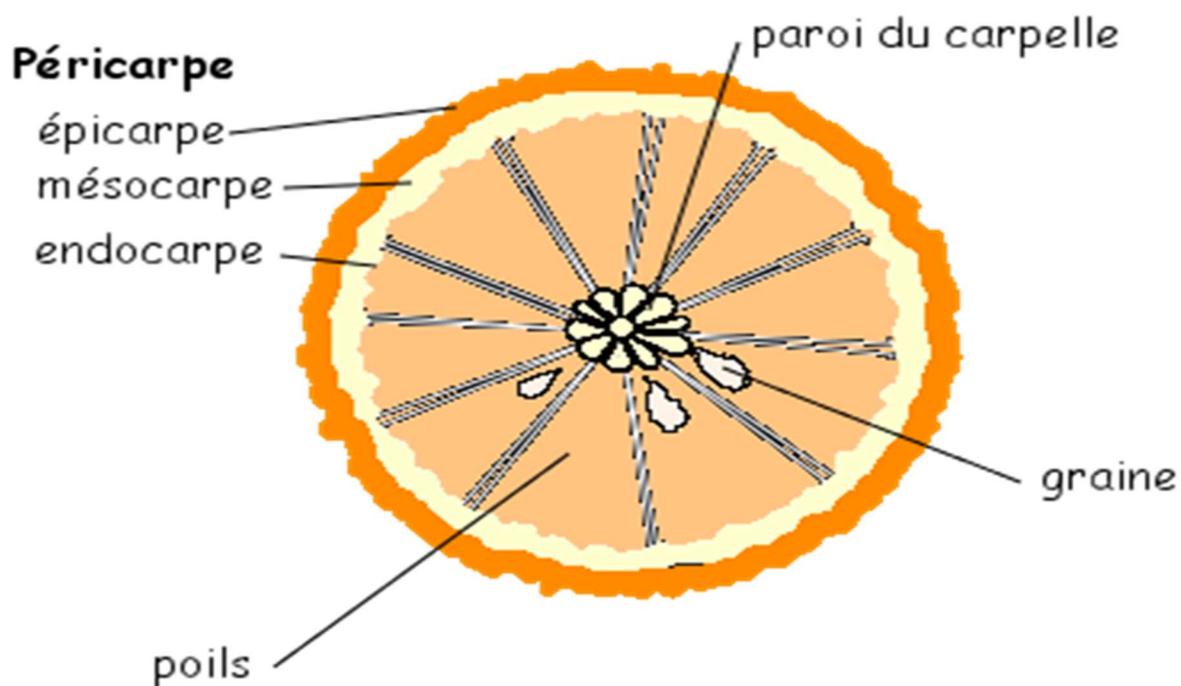


Figure 2 : Schéma détaillant la structure d'Orange (virtual, 2002).

Tableau 2: Composition chimique globale des écorces d'orange (Goulas et al., 2012 ; Barros et al., 2012).

Constituants	Unité par (g/100g bs)
eau	3,14
Lipides	1,66
Protéine	1,79
Glucides	15,01
Fibres	41,64
Caroténoïdes totaux	0,04
Phénols totaux	19,62
Huiles essentiels	0,6-1
Vitamine C	0,145-1,15

3. Valorisation des déchets de l'écorce d'orange

Ces dernières années, la valorisation du gaspillage alimentaire a pris une importance significative, qu'elle soit animale ou végétale. Dans le cas des déchets générés par l'industrie de l'orange on retrouve les graines, la pulpe, l'albêdo et la peau (**José et al., 2021**), qui représentent une ressource potentiellement précieuse (**Ernould et Audrey, 2012**).

En effet, les écorces d'orange est un déchet ayant une grande valeur biologique et des avantages potentiels pour la santé (**Singh et al., 2020**). Ceci, en raison de leur teneur en composés bioactifs tels que les polyphénols (flavonoïdes et acides phénoliques), les caroténoïdes et les huiles essentielles (**Rafiq et al., 2018 ; Putnik et al., 2017 ; Hosseini et al., 2016**). La valorisation des écorces a considérablement attiré l'intérêt scientifique pour les utiliser comme une poudre qui est un astringent efficace, en effet la poudre d'écorce d'orange est riche en minéraux et en vitamines tels que la vitamine C et E, B12, en magnésium, potassium et calcium, acide citrique et en flavonoïde, ce qui lui confère un large spectre d'activités biologiques (**Tripoli et al., 2007**). La poudre d'écorce constitue également une source potentielle de méthanol et d'éthanol (**Siles et al., 2016**), elle peut aussi être utilisés pour produire d'importants produits commerciaux tels que les enzymes, la biomasse microbienne, les composés aromatiques volatils, les acides organiques et les antioxydants (**Dhillon et al., 2004**).

Avant de proposer une voie de valorisation des déchets d'écorce d'orange les caractéristiques physico-chimiques doivent être connues on retrouve 23% de sucre, 22% de cellulose, 25% de pectines et 11% d'hémicellulose, les écorces possèdent deux fractions, une soluble et l'autre insoluble dans l'éthanol à 95%, la fraction soluble de l'écorce contient une variété de composants : des sucres, des acides organiques (acides citriques, oxaliques) et leurs sels, des acides aminés, des polyphénols (principalement des flavonoïdes) comme l'héspéridine, la narirutine, la didymine et la diosmine (**Nieto et Fernández, 2021**), la fraction insoluble est constituée principalement de pectines, de cellulose, d'hémicelluloses, des protéines et on peut aussi y trouver divers composés bioactifs tels que des stéroïdes, des triterpénoïdes et des cires de paraffine (**Mahmood et al., 1998**).

L'écorce d'orange est une excellente source de méthanol qui est une entité moléculaire pouvant servir de base à d'autres produits tels que l'acide acétique et le formaldéhyde, il est généralement utilisé comme solvant qui joue un rôle physique et chimique pour l'étude des

écorces et pour l'extraction de composés phénoliques à partir de tissus végétaux frais (**Miyake et al., 1997 ; Bocco et al., 1998**).

En effet, le méthanol est le principal composé du gaz naturel il absorbe le rayonnement infrarouge terrestre possède un potentiel de réchauffement planétaire supérieur au CO₂, et qui sert à produire le biocarburant généralement basé sur oxydation électrochimique (**Varmus, 2009**). Il est utilisé dans les plastiques, les peintures, les colles, les produits pharmaceutiques, dans la dénitrification des eaux usées et le biodiesel (**Miyake et al., 1997 ; Bocco et al., 1998**).

L'écorce était une bonne source de production d'éthanol (**Wilkins et Grohmann, 2007**), il fait partie de matières premières lignocellulosiques récalcitrantes, contiennent également des fractions polysaccharides insolubles, comme la cellulose, l'hémicellulose et la pectine, qui peuvent être hydrolysées enzymatiquement en sucres en utilisant une combinaison d'enzymes hydrolytiques (**Wilkins et al., 2007**), ils offrent également une flexibilité de substrat dans le processus de conversion de la biomasse en éthanol (**Grohmann et al., 1994 ; Oberoi et al., 2010 ; Wilkins et al., 2007**), l'extraction d'éthanol actuellement réalisée par hydratation catalytique de l'éthylène (méthode chimique) (**Mohsenzadeh et al., 2017**) qui déroule par l'hydrolyse de l'acide diluée à basse température en une seule procédure et combinée à l'hydrolyse enzymatique après extraction des huiles essentielles (par distillation) (**Patsalou et al., 2019**) et par fermentation de matières premières agricoles (méthode biochimique) (**Mohanty et Swain, 2019**), qui comprend une teneur supplémentaire importante en sucres solubles qui pourraient être appliqués pour la production d'un hydrolysate riche en sources de carbone pour les fermentations à l'éthanol (**Lin et Tanaka, 2006**).

Ce dernier extrait à l'aide de technologies avancées et ont également de nombreuses applications en tant que solvant, parfum, arôme et médicament et dans l'industrie alimentaire comme saveurs, dans l'industrie chimique comme les produits ménagers domestiques (**Smyth et Lambert, 1998**), et induisant à servir de source d'énergie verte et possède une longue histoire d'applications comme combustible pour le chauffage (**Wilkins et Grohmann, 2007**), également considéré comme un carburant renouvelable prometteur en raison de ses avantages distincts et bien documentés (**Brethauer et Wyman, 2010 ; Galbe et Zacchi, 2002**).

La pectine est un polysaccharide qui a la capacité de former un gel en présence d'ions Ca₂⁺ ou d'un soluté à faible pH (**Lavolla, 1947**), elle est soluble en milieux aqueux (eau, solutions tampons à faible force ionique) comme le formamide, le diméthyl-formamide, et le glycérol. La solubilité des substances pectiques dépend de leur masse moléculaire, de la

présence de chaîne latérale et la teneur en degrés de méthylation tandis que la distribution des groupes méthyles, ainsi la réticulation des molécules de pectine à haute teneur en méthoxyle implique une combinaison de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes entre les molécules **(Voragen et al., 1996)**.

Dans l'industrie alimentaire, la pectine est utilisée dans les confitures, les gelées, les aliments surgelés et plus récemment dans les aliments hypocaloriques comme substitut de graisse ou de sucre, son pouvoir épaississant, texturant mais aussi pour son pouvoir gélifiant et stabilisant **(Hawthorne et al., 2000)**. Aussi elle est utilisée comme des solutions injectables dans les veines, elle remplace le plasma sanguin pour le traitement des états pathologiques **(Lavolla, 1947)**.

La pectine peut aussi être utilisée dans l'industrie pharmaceutique, elle est utilisée pour réduire le taux de cholestérol sanguin et les troubles gastro-intestinaux. Aussi la pectine peut être utilisée dans d'autres applications tel que les films comestibles, les substituts de papier, les mousses et les plastifiants **(Thakur et al., 2009)**.

L'extrait aqueux des écorces d'orange sont riche en polyphénols antioxydants, en tanins et en sucres, deux nouvelles molécules ont également été découvertes dans cet extrait, deux stéréoisomères de stilbènes, appelés picéasides O et P **(Francezon et Nellie, 2018)**. En outre, l'analyse qualitative des constituants chimiques de l'extrait aqueux au total, 31 composés, dont un acide tannique, cinq flavones, 13 flavanones, un limonoïde, trois coumarines, trois peptides cycliques et cinq flavonoïdes polyméthoxylés ont été identifiés **(Ming et al., 2015)**.

Les écorces contiennent également d'autres composants, telles que les huiles essentielles (monoterpènes, alcools, aldéhydes) qui sont un complexe de plusieurs composés volatils, tels que les terpènes **(Tian et al., 2001 ; Hashemi et al., 2017)**. Celle-ci sont efficace contre les nématodes et les effets antimicrobiens et on utilise dans l'alimentation autant que agents aromatiques et dans l'industries cosmétiques (substances traitant la peau et les cheveux), dans la parfumerie (substances odorantes), et pharmaceutiques comme une alternative aux fongicides synthétiques **(Tian et al., 2001)**.

L'écorce d'orange contient aussi de la cellulose qui est un polymère naturel, elle permet d'améliorer le processus de fermentation **(Ayala et al., 2021)**, elle est aussi utilisée dans la production de la pâte à papier ou comme matière première pour les dérivés de cellulose **(Ververis et al., 2007)**, elle est également utilisée dans les réactions biochimiques telles que la production du plastique biodégradable par le dioxyde de carbone **(Byrne et al., 2004)**.

Notamment les composés phénoliques désignent un vaste ensemble de substances qui possèdent un ou de plusieurs cycles benzeniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles **(Quideau et al., 2011)**.

Les composés phénoliques comprennent principalement les acides phénoliques (les acides caféique, p-coumarique, férulique et sinapique) sous forme libre et liée, qui agissent comme des antioxydants **(Vuolo et al., 2019)**. En effet, la présence de ces composés dans les aliments permet de réduire ou traiter des maladies car ils protègent les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres et ainsi réduisent le risque de nombreuses maladies chroniques comme le cancer **(Singh et al., 2018)**.

En raison de leurs nombreuses actions biologiques telles que les propriétés anti-inflammatoires et l'activité anti-hémolytique, antioxydants ces dernières sont les molécules les plus importantes **(Hosni et Zahed, 2010)**.

4. Activités biologiques des écorces d'Orange

Les extraits des écorces d'orange et leurs dérivés ont une importance énorme en chimie médicinale en raison de leur large spectre de potentiel thérapeutique et des propriétés pharmacologiques, une activité anti-inflammatoire a été décrite pour les extraits des écorces d'orange **(Ho et al., 2008 ; Huang et al., 2010)**.

l'inflammation se définit comme étant la réponse défensive du système immunitaire aux stimuli nocifs, tels que les agents pathogènes, les cellules endommagées, les composés toxiques ou l'irradiation **(Medzhitov, 2010 ; Calixto et al., 2003)**.

La réponse inflammatoire est l'activation coordonnée des voies de signalisation qui régulent les niveaux des médiateurs inflammatoires dans les cellules tissulaires résidentes et les cellules inflammatoires recrutées dans le sang **(Lawrence, 2009)**, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme via la circulation sanguine et cause des dommages irréversibles locaux ou généralisés **(Nathan, 2002)**.

Les écorces et les graines sont employées pour renforcer les défenses immunitaires indispensables, et traiter les maladies dégénératives telles que l'hypertension **(Oboh, 2012)**, le cholestérol, le diabète, l'obésité et quelques cancers. Aussi, il prévient contre le rhumatisme et la thrombose (Figure 3) **(Manish et al., 2013 ; Ercan et al., 2011 ; Tripoli et al., 2007 ; Ramful et al., 2011 ; Del-Rio et al., 2004 ; Manthey et al., 2001)**.

Ce processus d'atténuation et de défense indispensable à la santé, habituellement qui contribue à la restauration de l'homéostasie tissulaire et à la résolution de l'inflammation aiguë. Cependant, une inflammation aiguë incontrôlée peut devenir chronique, contribuant à diverses maladies inflammatoires ainsi que les événements et interactions cellulaires et moléculaires minimisent efficacement les blessures ou les infections imminentes **(Nathan et Ding, 2010 ; Zhou et al., 2016)**.

Bien que les processus de réponse inflammatoire dépendent de la nature précise du stimulus initial et de son emplacement dans le corps, ils sont initiés d'abord par les récepteurs de la surface cellulaire reconnaissant les stimuli nuisibles puis par l'activation des voies inflammatoires, ce qui provoque la libération des marqueurs inflammatoires et le recrutement des cellules inflammatoires **(Linlin et al., 2018)**.

Les flavonoïdes d'agrumes peut-être liés à leurs interactions avec les principales enzymes régulatrices impliquées dans l'activation cellulaire et à la liaison aux récepteurs grâce à leurs propriétés participant ainsi à la prévention de certaines maladies **(Bocco et al., 1998 ; manthey et al., 2001)**.

De nombreuses enzymes régulatrices (protéine kinase C, phosphodiesterase, phospholipase, lipoxygénase et cyclooxygénase) contrôlent la formation des médiateurs biologiques responsables de l'activation des cellules endothéliales et des cellules spécialisées impliquées dans l'inflammation. Les flavonoïdes de citrus sont capables d'inhiber les kinases et les phosphodiesterases essentielles à la transduction et à l'activation du signal cellulaire, ils affectent également l'activation d'un certain nombre de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, notamment les lymphocytes T et B **(Manthey et al., 2001)**.

Les flavonoïdes d'agrumes augmentent leur activité anti-inflammatoire à partir des propriétés antioxydantes de ces composés **(Manthey et al., 2001)**. Ces derniers sont les flavanones glycosylés et les flavones polyméthoxylés **(Mouly et al., 1999)**, elles sont présentes sous forme de glycosides ou d'aglycones.



Figure 3 : Les différentes causes de l'inflammation et ses conséquences (Medzhitov, 2008).

Parmi les formes aglycones, la naringénine et l'hespérétine sont les plus importantes et parmi les formes glycosidiques, deux types sont classés : les néohespéridosides et les rutinosides (**Gionfriddo et al., 1996 ; Macheix et al., 1990**).

Il a été démontré qu'un certain nombre de dérivés aglycones comme la naringénine sont utilisés comme agents anti-inflammatoires puissants et inhibent la cytokine pro-inflammatoire induite par le lipopolysaccharide dans des macrophages et des modèles ex vivo de sang entier humain pour prévenir la parodontite (**Bodet et al., 2008**).

Parmi les glycosides flavonoïdes, la diosmine et l'hespéridine, bloquent l'inflammation à plusieurs sites d'action (**Kawaguchi, 2006 ; Yeh, 2007**), en plus de ces composés, les flavones polyméthoxylées (PMF) représentent une autre classe de flavonoïdes d'agrumes potentiellement actifs (**Manthey, 2001**).

Les PMF permettent d'inhiber la production de certaines cytokines protéiques pro-inflammatoires par des monocytes humains stimulés par le lipopolysaccharide bactérien (LPS) (**Manthey, 1999**). A l'inhibition de l'activité enzymatique de la phosphodiesterase-4 dans les monocytes humains activés, cette inhibition de la phosphodiesterase était similaire à celle rapportée précédemment pour d'autres flavones méthoxylées (**Petkov et Nikaido, 1982**), parmi les PMFs, la molécule heptaméthoxyflavone (HMF) était la plus puissante inhibitrice de la phosphodiesterase-4 des monocytes et de la production de cytokines stimulée par le LPS.

Cependant, bien que ces résultats suggèrent que les Polyméthoxylated flavones (CMR) d'agrumes pourraient être anti-inflammatoires, aucune à ce jour n'a été évaluée approfondie de leurs façons anti-inflammatoires in vivo (**Manthey et Bendelle, 2008**).

Nous rapporterons, pour notre part l'utilisation des composés phénoliques comme agent anti hémolytique. Ces composés sont reconnus pour leur forte bio activité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques, potentiellement intéressantes pour contribuer aux effets de santé des produits d'agrumes (**Ferreira et al., 2018**).

L'activité anti hémolytique est un phénomène irréversible causée par la dégradation des globules rouges, celle provoquant la libération d'hémoglobine et entraînant la décoloration du plasma (**Saunders, 2002**). Celle-là s'intègre dans la couche lipidique de la partie extérieure de la membrane érythrocytaire et modifie la disposition de la partie hydrophile sans modifier la fluidité de la partie hydrophobe (**Bonarska et al., 2014**), cette activité contient une action des

polyphénols protégeant les membranes des globules rouges de la lyse osmotique (**Chaudhuri et al., 2007**), les substances qui sont considérés comme ayant une activité anti hémolytique ont la capacité de retarder ou à inhiber la lyse des globules rouges, ces derniers sont plusieurs nous citerons : l'acide folique, le complément de fer, la vitamine B12 et les corticoïdes (**Ferreira et al., 2018**).

Il est primordial de rapporter que l'activité antioxydante des écorces d'orange est une réaction chimique qui inhibe ou prévient l'oxydation des matières oxydables en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif, ainsi les poly phénols jouent un rôle important comme système de défense contre les radicaux libres (**Kim et Lee, 2004 ; Pawar et al., 2016 ; Tripoli et al., 2007**).

Les antioxydants sont classes par leur origine (naturelle ou synthétique) ou leur nature (hydrosoluble ou liposoluble) ou bien par le mode d'action (primaires ou secondaires), parmi les plus connus sont les caroténoïdes (surtout le β -carotène), l'acide ascorbique, les tocophérols (vitamine E) et les poly phénols incluent les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques (**Gulcin et al., 2004 ; Berger, 2005 ; Herberg et al., 2004**).

Les acides phénoliques agissent comme donneurs de protons ou d'électrons, leur position et le degré d'hydroxylation et la méthylation du cycle aromatique sont des facteurs qui déterminent l'activité antioxydante des acides cinnamiques qui suit l'ordre décroissant suivant : acide chlorogénique, acide caféique, acide férulique, acide coumarique (**Blokhina et al., 2003 ; Robards et al., 1999 ; Soobrattee et al., 2005**).

Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (**Fuhrman et al., 1995**), ne s'exercent pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elles se manifestent aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques (**Cotelle, 2001**),

Elles ont également des propriétés antiallergiques et une activité antimicrobienne très importante qui sont dues à sa richesse en quercétine, hespéridine et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, l'infectiosite un neurotransmetteur est impliqué dans les réactions allergiques et l'inflammation (**Gonzalez et al., 2010**).

Matériels et Méthodes

Notre travail expérimental a été réalisé au niveau du laboratoire de l'université de BELHADJ BOUCHAIB de Ain Témouchent.

1. Détermination de l'activité cytotoxique anti-hémolytique, anti-inflammatoire et antioxydante des extraits des écorces d'orange :

1.1 Préparation de la suspension des globules rouges humains (GRh)

8 ml de sang frais sont récupérés dans des tubes héparinés, au niveau du laboratoire où la prise de sang a été effectuée, sur des individus sains.

Les différents échantillons de sang humain récupérés sont centrifugés à 3000 rpm, pendant 15 min, afin d'éliminer le plasma et les cellules polynucléaires. Ensuite, le culot de globules rouges est lavé trois fois, avec un volume équitable de solution iso-saline. Après cette étape, le volume a été mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10 % (v/v) (GRh), avec une solution iso-saline et utilisé immédiatement.

1.2 Test de cytotoxicité des écorces d'orange

Un test de toxicité est nécessaire, permet de déterminer la mortalité cellulaire induite par un composé particulier afin de cibler les concentrations à utiliser. Le principe est de mettre en contact des hématies avec les extraits écorces d'Orange à différentes concentrations (10-200µg/ml),

Dans une solution isotonique et de suivre le taux d'hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, afin d'évaluer la cytotoxicité des écores d'orange vis-à-vis, des GRh.

D'après le protocole de (**Bulmus et al., 2003**) un volume de 1,6mL de l'extrait méthanolique ou éthanolique a différents concentration est mélangé avec un volume de 0,4ml de la suspension de GRh (10%).

Le mélange réactionnel est incubé dans divers condition à 37°C, pendant 30min, ensuite centrifugé à 3000rpm pendant 10min et l'absorbance de l'hémoglobine libérée est mesuré à 560nm. Parallèlement, et dans les mêmes conditions, deux contrôles sont réalisés en remplaçant les extraits avec de l'eau physiologique (contrôle négatif) ou avec de l'eau distillée (contrôle positif correspondant à 100% d'hémolyse).

Le pourcentage d'hémolyse est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (At / Ac) \times 100$$

(Ac = Absorbance du contrôle positif ; At = Absorbance du test).

1.3 Evaluation de l'activité anti-hémolytique, in vitro, des extraits éthanolique et méthanolique par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des extraits des écorces d'Orange à empêcher l'hémolyse des GRh, induite par l'hypotonie et la chaleur et donc prévenir la libération de l'hémoglobine. Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par d'autres auteurs (**Sadique et al., 1989; Oyedapo et al., 2010**).

Le milieu réactionnel contenant 0,5 mL de l'extrait des écores d'orange, et l'acide gallique à différentes concentrations (10-200 µg/mL), mélangé avec 1,5mL du tampon phosphate (0,9% NaCl, pH=7,4) et 2ml d'une solution hypo-saline (0,36 % NaCl), est incubé à 37°C pendant 20 min. Ensuite 0,5 mL de la suspension de GRh (10%) sont ajoutés à chaque concentration et une deuxième incubation est réalisée à 56°C pendant 1h.

Finalement, les tubes sont refroidis sous l'eau courante et suivis par une centrifugation à 2500 rpm pendant 5min. Les absorbances du surnageant sont mesurées à 560 nm. En parallèle, un contrôle est réalisé en remplaçant l'extrait avec 0,5 mL du tampon phosphate. Le pourcentage de stabilité membranaire est estimé à partir de l'expression suivante :

$$\% \text{ de stabilité membranaire} = (Ac - At / Ac) \times 100$$

(Ac : absorbance du contrôle ; At : absorbance du test).

1.4. Activité Anti-inflammatoire des extraits éthanolique et méthanolique des écorces d'orange

La dénaturation des protéines est l'une des causes de l'inflammation (**Williams et al., 2008**). De études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plantes sur l'activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode de la dénaturation des protéines (**Bouhlali et al., 2016**). L'activité anti-inflammatoire in vitro des extraits des écores d'orange effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (**Chandra et al., 2012**).

Quatre solutions sont préparées.

1. La solution d'essai (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (SBA, 5 %) et 0,05 ml d'extrait avec une concentration de 200 pg/ml ou de 200 ng/ml ou de 200 µg/ml (test solution).

2. La solution test contrôle (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé (test control).

3. La solution contrôle produit (0,5 ml) composée de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml d'extraits avec une concentration de 250 pg/ml ou de 250 ng/ml ou de 250 µg/ml (control).

4. La solution standard test (0,5 ml) composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodique avec une concentration de 250 pg/ml ou de 250 ng/ml ou de 250 µg/ml (étalon).

Toutes les solutions sont été ajustées à pH 6,3 par une solution d'HCL (1N). Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 20 min, ensuite la température est augmentée pour garder les échantillons à 57° pendant 3 min. Après refroidissement des tubes, 2,5ml de la solution tampon phosphate saline (pH=6,3) est ajoutée aux solutions ci-dessus. L'absorbance est lue par le spectrophotomètre UV –visible à 416 nm. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé comme suit:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - [(\text{DO test solution} - \text{DO control}) / \text{DO test control}] \times 100.$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées; et les résultats sont comparés avec l'anti-inflammatoire de référence, le diclofenac sodique.

Résultas

1. Test de cytotoxicité des extraits des écorces d'orange (figure 4)

Le test *in vitro* de cytotoxicité représentée par le pourcentage d'hémolyse des globules rouges humain (GRh) est effectué en utilisant des GRh d'un donneur sain en bonne santé. Différentes concentrations de l'acide gallique (Ac. gallique) (polyphénol de référence) et des extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'orange sont testées. Le pourcentage de l'hémolyse est évalué, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des globules rouges par hémolyse, en comparaison aux concentrations en Ac. gallique équivalentes. Les résultats obtenus sont représentés dans la (figure 4).

Nos résultats montrent que l'extraits méthanoliques des écorces d'orange a la concentration de 10 µg/ml et 20 µg/ml présente un pourcentage d'hémolyse de 13,2% et 23,8% respectivement ce qui est pratiquement similaire à celui de l'acide gallique qui est de 19,3% et 28,1% respectivement en comparaison avec le contrôle négatif (C-, 18,2 %), cependant a la concentration de 50 µg/ml, on constate que l'effet hémolytique de l'extrait méthanolique des écorces d'orange est passé à 26,8% versus 33,8 pour l'Acide gallique et qui est hautement significatif. Par ailleurs, on note qu'à la concentration de 100 µg/ml, l'effet hémolytique de l'extrait méthanolique des écorces d'orange est passé à 37,3% versus 37,2% pour l'Acide gallique, aussi pour la concentration de 200 µg/ml l'extrait méthanolique des écorces d'orange montre un pourcentage d'hémolyse de 62,1% contre 41,3% pour l'Acide gallique.

Nos résultats montrent que l'extrait éthanolique des écorces d'orange a la concentration de 10 µg/ml et 20 µg/ml présente un pourcentage d'hémolyse de 21,1% et 25,4% respectivement ce qui est pratiquement similaire à celui de l'acide gallique qui est de 19,3% et 28,1% respectivement en comparaison avec le contrôle négatif (C-, 18,2 %), cependant a la concentration de 50 µg/ml, on constate que l'effet hémolytique de l'extraits éthanoliques des écorces d'orange est passé à 32,3% versus 33,8 pour l'Acide gallique et qui est hautement significatif. Par ailleurs, on note qu'à la concentration de 100 µg/ml, l'effet hémolytique de l'extrait éthanolique des écorces d'orange est passé à 42,6% versus 37,2% pour l'Acide gallique, aussi pour la concentration de 200 µg/ml l'extrait éthanolique des écorces d'orange montre un pourcentage d'hémolyse de 56,2% contre 41,3% pour l'Acide Gallique.

On remarque que quel que soit la concentration utilisée, les extraits méthanoliques des écorces d'orange provoquent un taux d'hémolyse plus important que celui provoqué par l'acide gallique. De la même façon, les extraits éthanoliques des écorces d'orange provoquent un taux d'hémolyse plus prononcé que celui de l'acide gallique, quel que soit la concentration utilisée.

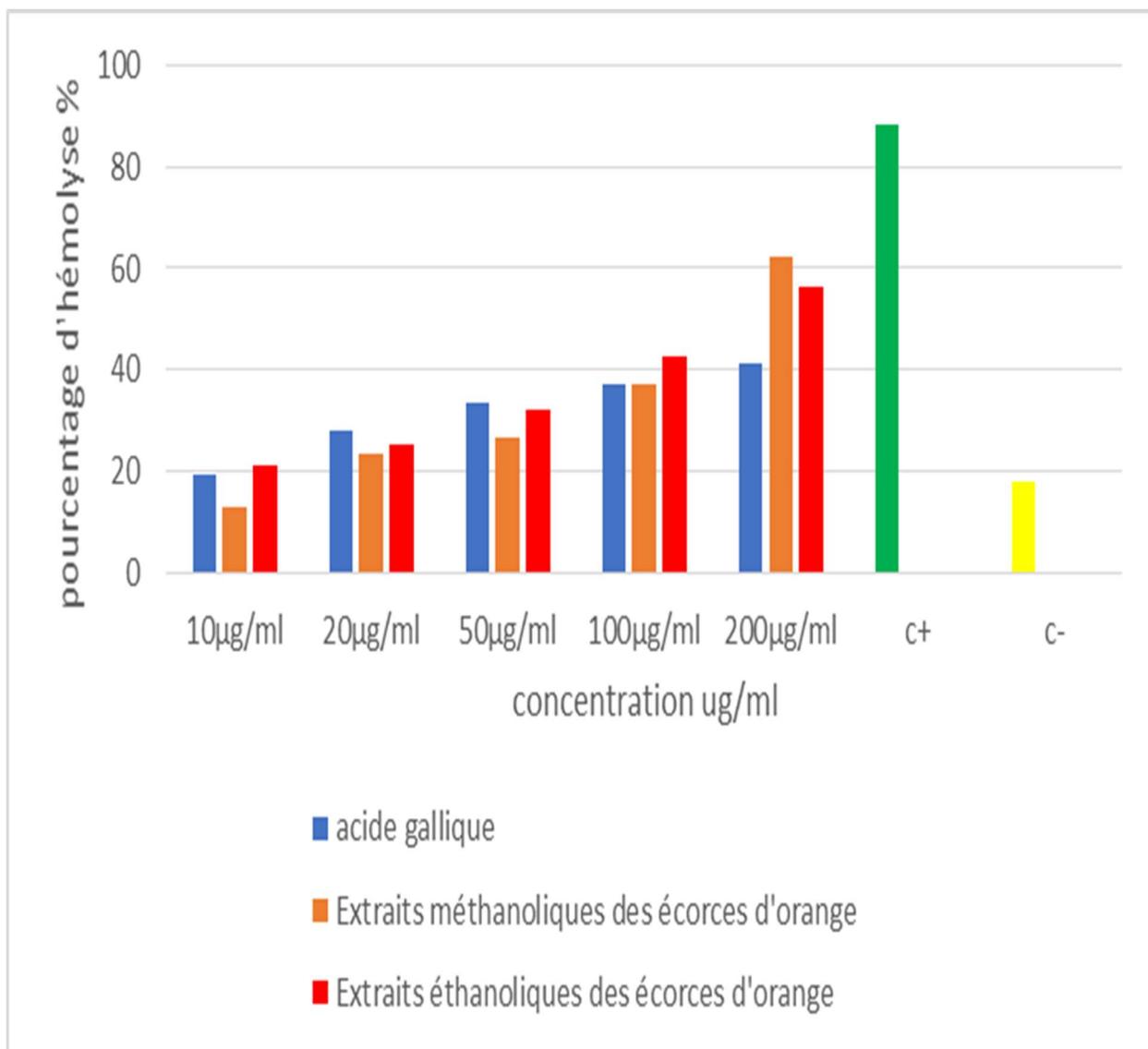


Figure 4 : Comparaison des pourcentages d’hémolyse des globules rouges entre l’acide gallique et les extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d’orange.

C- : 18,2% ; C+ : 88,4%.

2. Test anti-hémolytique (stabilisation membranaire des globules rouges) des extraits des écorces d'orange (figure 5)

L'étude *in vitro* de l'activité anti-hémolytique des extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'oranges est réalisée en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges (GR). L'évaluation de la stabilisation membranaire est mesurée par le taux de libération de l'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration des extraits utilisés et en le comparant à une molécule de référence, qui est l'acide gallique étant un polyphénol à activité anti- hémolytique. Les résultats obtenus sont représentés dans la (figure 5).

Nos résultats montrent que l'acide gallique à faible concentrations de 10 et 20 µg/ml présente un effet anti-hémolytique, protecteur et stabilisateur des membranes des GR, important allant de 42,57% à 59,74%.

Les données obtenues avec l'extrait méthanolique des écorces d'orange indiquent qu'ils Présent une activité importante (48,32 et 68,17%) à faible concentration de 10 et 20 µg/ml. Cette activité stabilisatrice de la membrane des GR continue d'augmenter avec la concentration des extraits méthanoliques pour atteindre 86,48 et 271,42% lorsque la concentration est 50 de 200 µg/ml.

L'activité protectrice des membranes en présence des extraits éthanoliques augmente aussi avec la concentration des extraits éthanoliques des écorces d'orange de 10 et 20µg/ml avec une activité importante de 65,16 et 73,27%.

L'effet anti-hémolytique des extraits méthanoliques et éthanoliques est par la suite comparé à celui de l'acide gallique. Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques des écorces d'orange, à faibles concentrations (10 et 20µg/ml) présentent un effet anti hémolytique plus élevé que l'acide gallique au même concentration, l'effet protecteur des extraits méthanoliques est plus fort que celui de l'acide gallique.

L'extrait éthanolique d'écorce d'orange induit un effet anti-hémolytique plus important que celui de l'acide gallique à concentration (10 et 20 µg/ml).

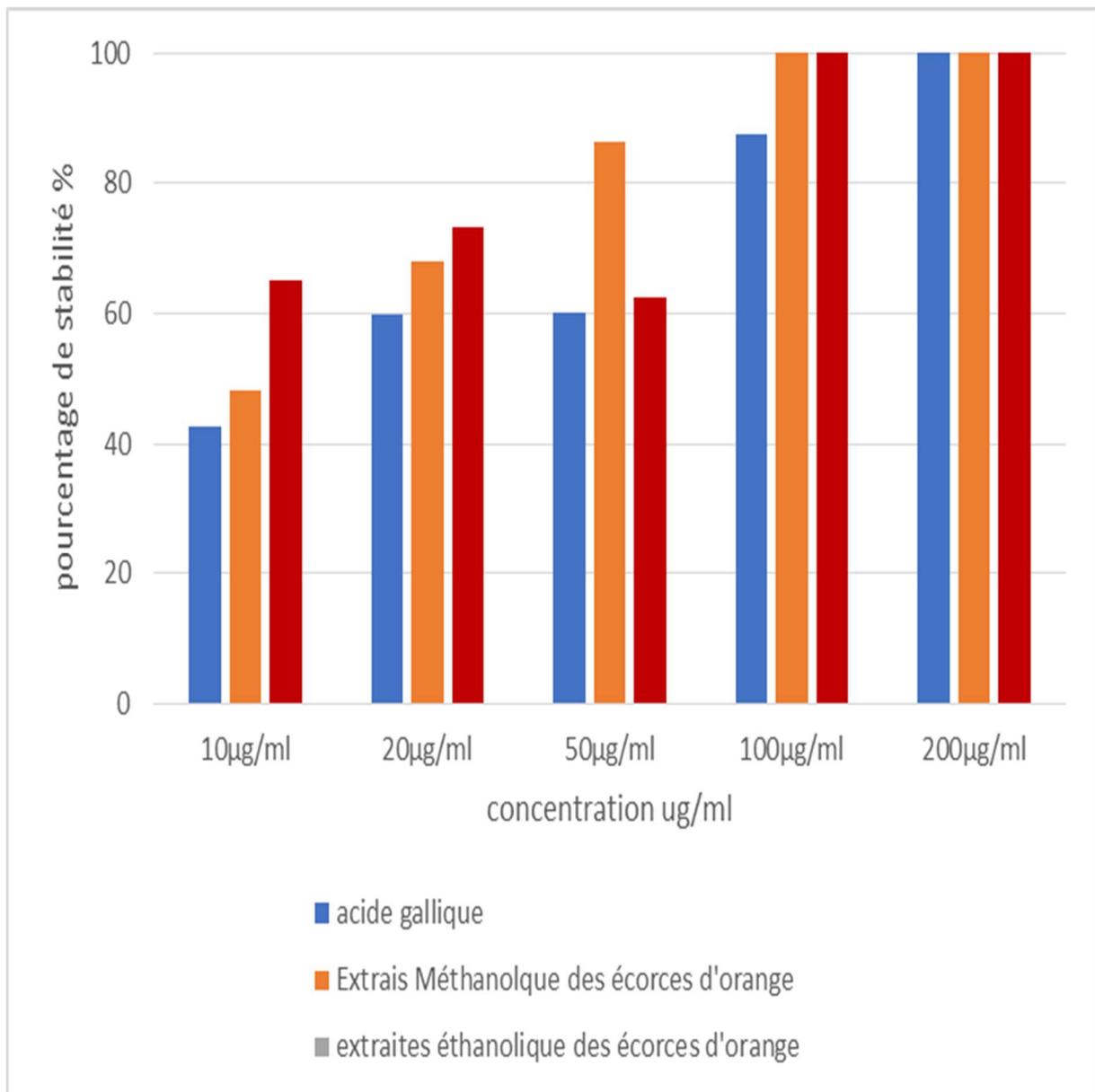


Figure 5 : Comparaison de l'activité anti-hémolytique de l'acide gallique et des extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'oranges.

3. Activité anti-inflammatoire de l'extraits méthanolique et éthanolique des écorces d'orange (figure 6)

La méthode de l'inhibition de la dénaturation protéique est la plus convenable pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de notre molécule. La protéine utilisée pour ces tests est le sérum albumine bovine (SBA). Les résultats de l'inhibition de la dénaturation de la SBA sont donnés dans la (figure 6).

Nos résultats montrent que le pourcentage d'inhibition protéique de l'extraits méthanoliques augmente à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ et 20 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$ et 100 $\mu\text{g/ml}$ et commence a diminué à 200 $\mu\text{g/ml}$, On constate que l'activité anti-inflammatoire et plus importante a 100 $\mu\text{g/ml}$, elle est de 86% mais elle reste aussi importante avec un pourcentage de 78% à la concentration 50 $\mu\text{g/ml}$ versus 99,18% pour diclofénac. Cependant pour la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ le pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique est de 55% comparé à diclofénac qui est de 98,83%.

Le pourcentage d'inhibition protéique de l'extraits éthanoliques augmente à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ et 20 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$ et 100 $\mu\text{g/ml}$ et commence a diminué à 200 $\mu\text{g/ml}$, On constate que l'activité anti-inflammatoire et plus importante a 100 $\mu\text{g/ml}$, elle est de 96% mais elle reste aussi importante avec un pourcentage de 82% à la concentration 50 μM versus 99,18% pour diclofénac. Cependant pour la concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ le pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique est de 62% comparé à diclofénac qui est de 98,83%.

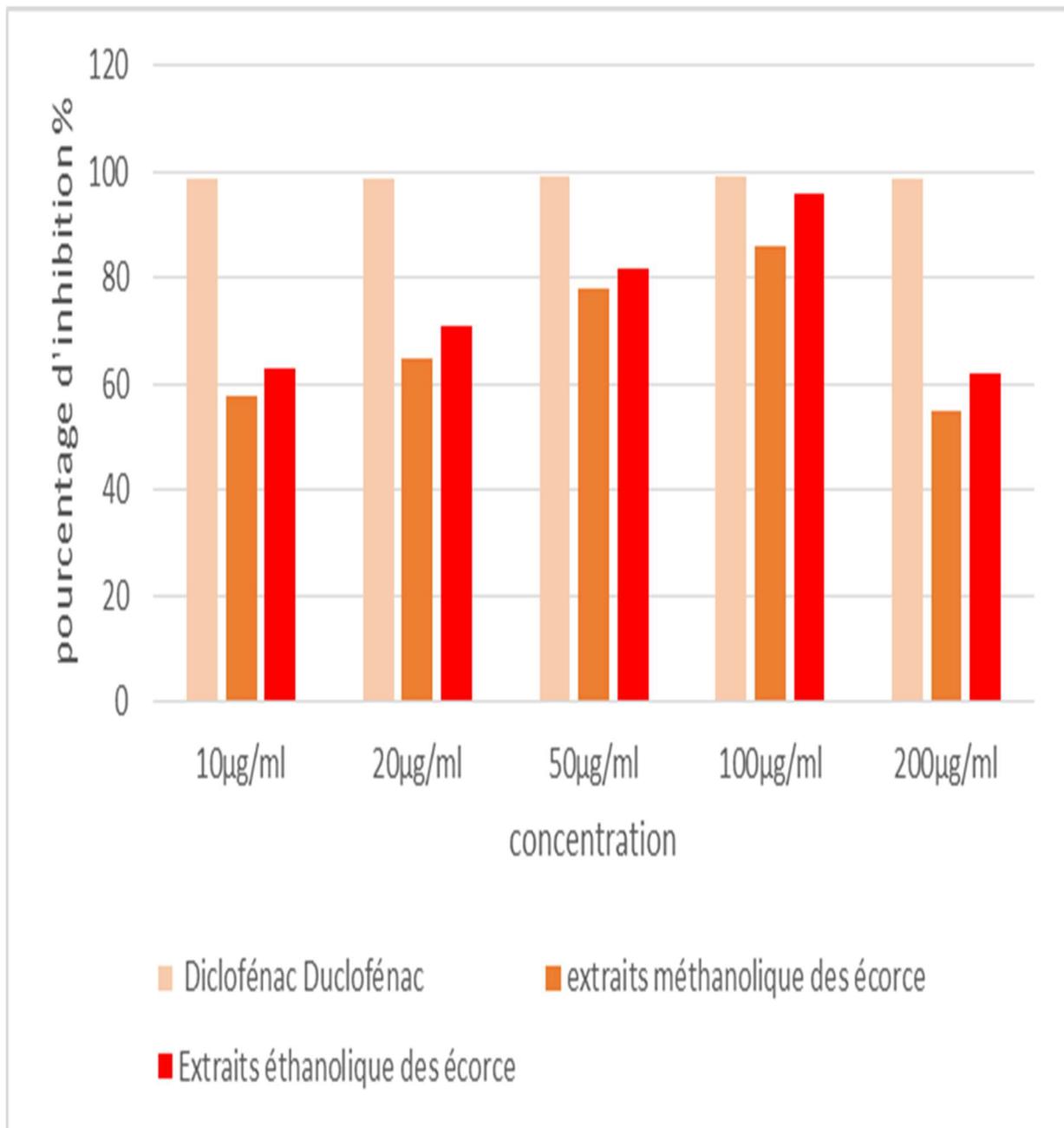


Figure 6 : Comparaison de l'inhibition de la dénaturation protéique par Diclofénac des extraits méthanolique et éthanolique des écorces d'oranges.

Discussion

Les écorces d'oranges est un déchet ayant une grande valeur biologique et des avantages potentiels pour la santé **(Singh et al., 2020)**. Elles sont une source précieuse de composés bioactifs, notamment les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins, les stilbènes, les limonoïdes, les coumarines, les terpénoïdes, les caroténoïdes, les vitamines, les minéraux et les fibres alimentaires. elles sont les principales sources de pectine **(Tchèque et al., 2021)**.

Ces composés bioactifs sont étroitement lié à diverses activités biologiques et à des avantages bénéfiques pour la santé, notamment des effets hypolipidémiques, hypoglycémiant, anti cancérogènes, antibactériens, antifongiques, anti-inflammatoires et neuroprotecteurs en raison de leur capacité antioxydante à réduire le stress oxydatif **(Lucia et al., 2013)**.

Bien que les plantes soient une riche source de molécules chimiques bénéfiques de diverses structures avec différentes propriétés pharmacologiques sur les systèmes biologiques **(Nisar et al., 2018 ; Valli et al., 2018)**, certaines plantes peuvent être toxiques pour l'homme. Par exemple, certaines des toxicités liées à l'utilisation de substances présente dans les plantes médicinales mène à la destruction des globules rouges **(Nondo et al., 2015)**.

L'étude de la cytotoxicité des extraits de plantes, in vitro, en utilisant les globules rouges comme modèle a été largement utilisée **(Novaes et al., 2007)**. En effet, les érythrocytes représentent un bon modèle pour évaluer la cytotoxicité des molécules, organiques et inorganiques, naturelles ou synthétiques, par la mesure des dommages cellulaires, avant toute investigation sur le mécanisme d'action de différentes molécules, il est important de réaliser un test de cytotoxicité. Parmi les différents tests de cytotoxicité permettant d'évaluer une éventuelle toxicité au niveau des globules rouges, on trouve le taux d'hémolyse **(Pagano et Faggio, 2015)**.

Cet essai est basé sur l'évaluation des altérations des membranes des globules rouges en présence d'une éventuelle substance et donc permet d'évaluer l'effet de différentes concentrations de biomolécules sur les érythrocytes humains **(Kumar et al., 2011)**.

Toute altération au niveau de la structure de la membrane plasmique des globules rouges entraîne des signes évidents de souffrance cellulaire. Une méthode d'évaluation de la toxicité est basée sur la mesure de l'efflux d'hémoglobine des globules rouges en suspension. L'hémolyse, et donc la perte d'hémoglobine **(Pagano et Faggio, 2015)**.

Notre travail de Master sur les activités biologiques des extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'orange contribue à la valorisation de ses déchets d'orange.

Selon nos résultats obtenus avec les extraits des écorces d'orange, on constate que l'effet cytotoxique est concentration dépendant. Les extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'orange sont cytotoxiques à la concentration de 200 µg/ml puisqu'ils provoquent 62,1 % et 56,2 % respectivement d'hémolyse et ne doivent donc pas être utilisés à cette concentration.

L'extrait méthanolique des écorces d'orange provoque par contre un pourcentage d'hémolyse de 13,2 % et 23,8% et 26,8% à la concentration de 10-20-50 µg/ml semble être la concentration faiblement toxique. Aussi la concentration de 100 µg/ml et 200µg/ml le pourcentage d'hémolyse est de 37,3% et 62,1 % respectivement. Ainsi, la concentration de 10 µg/ml semble être la moins toxique.

L'extrait éthanolique des écorces d'orange provoquent par contre un pourcentage d'hémolyse de 21,1 % et 25,4% et 36,3% à la concentration de 10-20-50 µg/ml semble être la concentration faiblement toxique. Aussi à la concentration de 100 µg/ml et 200µg/ml le pourcentage d'hémolyse est de 42,6% et 56,2 % respectivement. Ainsi, la concentration de 10 µg/ml semble être la moins toxique.

En effet, selon une étude précédente de (**Mossman, 1983**) pour mesurer la toxicité de l'extrait éthanolique sur les cellules humaines HFF (Human Foreskin Fibroblasts) ont montré aucun effet toxique sur les cellules humaines, au contraire elle améliore le fonctionnement des cellules, mais il est toxique pour les cellules humaines HFF en mitose de concentrations 125 µg/ml à 1000 µg/ml, cette étude est en accord avec l'étude de (**karatoprak et al., 2020**). L'extrait éthanol d'agrumes a montré une activité plus toxique dans les cellules cancéreuses et n'a pas affecté la viabilité des cellules saines.

D'autre étude de (**Bagavan et al., 2010**) les extraits méthanolique des écorce d'Orange (*C. sinensis* L. Osbeck (Rutaceae)) ont été évalués par utilisation du test MTT (test de prolifération) sur la lignée cellulaire du cancer du larynx humain (HEp-2) et la lignée cellulaire normale (Véro), ces extraits se sont révélés non toxiques jusqu'à une concentration de 100µg/mL,

En effet les études montrent que certains métabolites secondaires possèderaient des propriétés anti-hémolytique (**Fiot et al., 2006**), selon une étude précédente de (**Segun et al., 2018**) sur le méthanol de l'écorce de *Citrus aurantium* qui ont été évalués par utilisation du test MTS (test de prolifération déterminent la viabilité cellulaire in vitro) qui résulte que les composés qui ont été préparées montrés aucun effet considérable sur le métabolisme cellulaire

et la viabilité des cellules cancéreuses humaines HepG2 (carcinome hépatocytaire du foie) et A349 (poumon), MCF7 (sein) et PC3 (prostate), se révèle posséder une activité au-dessous de 100 µg/mL contre les cellules cancéreuses. La sélectivité des composés isolés a été évaluée à l'aide des cellules normales de l'épithélium de la prostate humaine (PNT2).

Nos résultats sont en accord avec cette étude car les extraits éthanolique et méthanolique des écorces d'orange que nous avons testé montre un effet cytotoxique qui augmente proportionnellement avec la concentration.

Ainsi la toxicité des extraits dépend de la concentration et aussi des constituants des extraits. A forte concentration, parmi les constituants de plantes, les flavonoïdes sont impliqués dans l'oxydation de l'hémoglobine, la perturbation de la structure membranaire et l'augmentation de la conductimétrie et donc l'hémolyse des érythrocytes, en raison d'effets pro-oxydants qu'ils peuvent exercer (**Galati et al., 2002**).

Aussi, les érythrocytes sont considérés comme une cible majeure pour les radicaux libres en raison de la présence à la fois d'une forte concentration membranaire d'acides gras polyinsaturés et du transport d'oxygène associé aux molécules d'hémoglobines actives, qui sont des promoteurs puissants d'espèces réactives de l'oxygène (**Ebrahinzadeh et al., 2009**). Par exemple, l'acide gallique est utilisé dans notre travail comme un polyphénol de référence. A faible concentration, l'acide gallique n'est pas toxique. A forte concentration, il est capable de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} , ou Cu^{2+} en Cu^{+} , et ainsi d'enclencher la réaction de Fenton avec formation du radical hydroxyle (**Kessler et al., 2002**).

Dans notre travail, l'acide gallique à 200 µg/ml montre une toxicité de 41,3 % d'hémolyse. Nos résultats montrent que les extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'orange provoquent un taux d'hémolyse plus important que celui provoqué par l'acide gallique. Ceci peut être dû à la présence de nombreux constituants dans les extraits des écorces d'orange.

La méthode anti-hémolytique de GRh est la meilleure méthode pour la détermination, in vitro, du pourcentage de stabilisation membranaire (**Oyedapo et al., 2010**). La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale, dont la stabilisation est importante pour limiter la réponse inflammatoire, en empêchant la libération de constituants lysosomaux de neutrophiles activés, tels que les enzymes bactéricides et les protéases, ce qui entraîne une inflammation tissulaire et des dégâts, suite à une libération cellulaire supplémentaire (**Murugasan et al., 1981**).

La stabilisation de la membrane des globules rouges a été étudiée pour établir le mécanisme d'action anti-hémolytique des extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'orange, Nous avons utilisé une molécule de référence qui est l'acide gallique induise des effets anti-hémolytiques différents. En effet, nos résultats montrent que l'extrait méthanolique de 200 µg/ml montre un effet anti-hémolytique important, protecteur et stabilisateur des membranes des GRh d'environ 271,42%. Ainsi que l'extrait éthanolique à 200 µg/ml montre un effet anti-hémolytique d'environ 354,28%

L'acide gallique à faible concentrations (10 et 20 µg/ml) induit un effet anti-hémolytique, protecteur et stabilisateur des membranes des GR, important et généralement faible.

Dans notre travail, les deux extraits ont été efficaces pour inhiber l'hémolyse, et on a constaté que la stabilité membranaire continue d'évoluer avec l'augmentation de la concentration. De plus, ces extraits montrent une activité anti-hémolytique identique ou supérieure à celle de l'acide gallique à la concentration de 250 µg/ml (**Chippada et al., 2011 ; Rani et al., 2014 ; Garbi et al., 2017**). Plusieurs études ont rapporté l'efficacité des extraits de plantes médicinales sur la stabilisation de la membrane du globule rouge (**Sadique et al., 1989 ; Oyedapo et al., 2010 ; Gadamsetty et al., 2013**).

Selon l'étude de (**Rios et al., 1988**), il a été démontré que l'extrait méthanolique de *Citrus aurantium* avec des concentrations variables de (10mg/ml, 20mg/ml, 30mg/ml et 40mg/ml) obtenu une augmentation des pourcentages de stabilisation membranaire en inhibant la lyse de la membrane érythrocytaire induite par l'hypotonie, dans 50mg d'extrait de méthanol, on obtient 29.88% d'inhibition de l'hémolyse.

Aussi, les résultats d'une étude de **Louerrad** ont montré que les extraits éthanoliques de *Hyloxylon scoparium* avec concentrations de (10mg/ml, 20mg/ml, 30mg/ml et 40mg/ml) marque une stabilisation de la membrane avec un pourcentage d'inhibition de hémolyse de 63% à une concentration de 20mg/ml, alors que l'effet anti-hémolytique des extraits peut être attribué au fait que l'extrait équilibre la pression osmotique entre les deux milieux, ou se fixe sur l'aquaporine qui empêche l'eau d'entrer aux hématies, et le pourcentage de stabilisation augmente lorsque la concentration augmente (**Louerrad et al., 2016**).

Cependant, l'effet anti-hémolytique peut être attribué aux métabolites secondaires présents dans ces extraits tel que les flavonoïdes et les polyphénols (**Hatia et al., 2014**).

Ces études nous démontrent que les extraits méthanoliques et éthanoliques protègent les GRh contre l'hémolyse proportionnellement à la concentration ce qui est en accord avec nos résultats.

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire par application d'un stress ou d'un composé externe, tel qu'un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou de la chaleur la plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées. La dénaturation des protéines est une cause bien documentée d'inflammation (**Leelaprakash et Mohandass, 2011**), les agents qui peuvent empêcher la dénaturation des protéines seraient donc utiles pour le développement de médicaments anti-inflammatoire (**Chandra et al., 2012**). La majorité des médicaments anti-inflammatoire cliniquement importants appartiennent à la classe des stéroïdes (glucocorticoïdes) ou des thérapies chimiques anti-inflammatoires non stéroïdiennes tels que diclofénac, Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables, qui peuvent gêner leur utilisation à long terme (**Bushra et Aslam, 2010**). Le Diclofénac sodique (acide phényl acétique), est l'un des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens le plus utilisé (AINS), en raison de ses propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques puissantes. C'est un inhibiteur de la COX-2 et agit en diminuant le niveau d'acide arachidonique libre (**Goodman et Gilman, 2001**).

Des études sur l'interaction du Diclofénac avec les constituants membranaires, notamment les bicouches de phospholipides ont montré que le Diclofénac se localise préférentiellement dans les groupes polaires des phospholipides à proximité de la région phosphate. Il a la capacité de former une liaison hydrogène avec les molécules d'eau ou le groupe polaire des phospholipides modifiant l'affinité de la membrane pour l'eau. De plus, le Diclofénac est chargé négativement et sa présence dans la région polaire modifie les propriétés électrostatiques des phospholipides qui influencent la structure de la bicouche lipidique (**Moreno et al., 2009**).

L'activation incontrôlée ou prolongée de l'inflammation in vivo peut provoquer des altérations dangereuses, telles que la dénaturation de protéines. Ces dernières subissent une perte de leur structure qui aboutit à l'exposition d'autoantigènes (**Clos, 2012**), donnant naissance à de nombreuses maladies (arthritiques, rhumatoïdes,...) (**Lanneau, 2010**).

L'activité anti-dénaturante des extraits pourrait être due à l'interaction de certains composants avec deux sites (présents au niveau de certaines protéines exemple : albumine) de

liaisons riches en Tyrosine, Thréonine et Lysine (**Williams et al., 2002 ; Duganath et al., 2010**).

Des études ont démontré que de nombreux flavonoïdes et polyphénols contribuent de manière significative à l'activité anti-inflammatoire de nombreuses plantes (**Luo et al., 2002 ; Okoli et Akah, 2004**).

Selon une étude de (**Lakache et al., 2019**) démontrée que l'extrait méthanolique d'*Olea europaea* traité par l'œdème de la patte de souris induit une inhibition de la dénaturation protéique à 100 mg/ml de 71,42 %, il a bien été constaté que cette dérive d'inhibition de la synthèse de l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), principaux inducteurs de l'expression des molécules adhésives sur la paroi vasculaire.

Une autre étude menée par (**Arezki et Atoui, 2017**), pour les extraits éthanoliques des pépins de Pamplemousse, le pourcentage d'inhibition le plus élevé 86.74% est obtenu avec la concentration de 50 mg/ml Ces résultats coïncident avec d'autres résultats selon lesquels l'activité anti-dénaturante, des composés naturels isolés à partir des plantes, est plus importante lorsque la concentration est faible (**Williams et al., 2008**).

Dans notre étude la diminution de l'effet de l'inhibition de la dénaturation protéique des extraits éthanoliques et méthanoliques des écorces d'oranges avec l'augmentation de la concentration pourrait impliquer un effet antagoniste des composés phénoliques minoritaires qu'il contient, parmi ses composants certains exerceraient un effet opposé à d'autres se manifestant lorsque leur concentration est élevée. D'un autre côté, elle pourrait être liée à la formation d'agrégats suite à la forte interaction entre l'albumine et certains composés (provoquent la précipitation de l'albumine), et on constate que l'effet anti-dénaturant des polyphénols est inversement proportionnel à la concentration.

Conclusion

Des propriétés biologiques, anti-hémolytique, anti-inflammatoires des extraits des écorces d'orange ont été démontré grâce à ces dérivés naturels et synthétiques intéressantes avec un potentiel clinique et bénéfique pour la santé humaine contre diverses maladies.

Au cours de ces dernières années les extraits des écorces d'orange constituent un champ de recherche très vaste, on s'attend à ce que de nouveaux médicaments à base de ces extraits soient découverts en utilisant des stratégies modernes.

Dans ce travail de master, nous avons utilisé les extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'orange pour tester ces activités biologiques in vitro.

Nos résultats ont montré que ces extraits ont démontré une activité cytotoxique à la concentration de 3 mg/ml, cependant elle est faiblement toxique à la concentration de 1mg/ml puisqu'elle induit une faible hémolyse.

Les résultats de ce présent travail démontrent que les extraits méthanoliques et éthanoliques des écorces d'orange ont des effets anti-hémolytique considérables comparativement à la molécule de composés phénoliques testée, à savoir l'acide gallique. Ainsi, elles procurent une stabilité membranaire des GRh qui a des similitudes avec d'autres membranes cellulaires, notamment la membrane du lysosome.

Les extraits des écorces d'orange présentent une activité anti-hémolytique importante. Les différents extraits des écorces ont aussi révélé une inhibition efficace de la dénaturation thermique de l'albumine sérique avec des pourcentages maximaux de l'extrait méthanolique a 86%, l'extrait éthanolique a 96% et 99,18 % celui de Diclofénac. Ils sont donc dotés d'une activité anti-inflammatoire surtout à faible concentration.

Notre travail permet donc de conclure que les écorces d'orange n'est pas un déchet et ne doit pas être jetée. En effet, elle contient des molécules ayant des activités anti-inflammatoires et anti-hémolytiques à faible concentration. Ces écorces peuvent être extraits et utilisées dans différents domaines.

A cet effet, nos résultats ouvrent de larges perspectives pour d'autres études afin de :

- Déterminer et purifier les extraits bioactives responsables de l'activité.
- Évaluer leur activité anti-inflammatoire in vivo en étudiant la toxicité.
- Déterminer leur mécanisme et leur mode d'action.

Références bibliographiques

- Abid, M., ben Amar, M., Abdenadher, M., Haj Kacem, A., Mzali, R., & Beyrouti Mohamed, I. (2010).** Abcès de la paroi thoracique et abdominale isolé : une forme exceptionnelle de tuberculose. *Revue des Maladies Respiratoires*, 27(1), 72-75.
- Ale Ebrahim, N., Ahmed, S., & Taha, Z. (2011).** Virtual Teams and Management Challenges. *Academic Leadership Journal* 9(3), 1-7.
- Andrade, R. G., Dalvi, L. T., Silva, J. M. C., Lopes, G. K., Alonso, A., & Hermes-Lima, M. (2005).** The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 437(1), 1-9.
- Ayala Tresiera, R. Ruiz, M. Bendayan and H. Fernandez (2021).** Survival Times of *Campylobacter coli* in Sterilized Buffalo Milk. 141–144.
- Arezki Samra, Dounia Atoui, F. Bedjou (2017).** Inhibition of bovine serum albumine dénaturation by essential oils of grape citrus seed polyphénols
- Bulmus V., Woodward M., Lin L., Murthy N., Stayton P., Hoffman A. (2003).** A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of Controlled Release*. 93(2) : 105-120.
- Bouhlali E.D.T., Sellam K., Bammou M., Alem C., Filali-zehzouti Y. (2016).** In vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 6, 156-162.
- Bagavan, A., Rahuman, A. A., Kamaraj, C., Kaushik, N. K., Mohanakrishnan, D., & Sahal, D. (2010).** Antiplasmodial activity of botanical extracts against *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Research*, 108(5), 1099-1109.
- Benamrouche S, Addar L, Boudershem H, Tani S, Madani K (2017).** Chemical characterization of orange peel identification by GC-MS evaluation of the antioxidant power of their essential oils. 18 (2018) 28-35.
- Berlint C, (2016).** Study of the influence of packaging and the matrix on the quantity of orange. 1762(16)30106-7.
- Begoña (2020).** Interview of the Begoña Martinez for Tejada Weber. *Revue Médicale Suisse*. 16(684), 465.

Belouahri, B. T. Aydat et R. Aït Ammar(1999). The migration of fine particles as an approach to explain the mechanism of soil collapse. 10 : 99-66.

Barros H., Ferreira T. A. P. D. C., and Genovese M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. Food Chemistry .134(4): 1892-1898.

Byrne Peter M, Sung-Sik P, Michael B, Michael Sh, Lenart G, and T, Abdoun (2004). Numerical modeling of liquefaction and comparison with centrifuge tests .41: 193–211.

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.

Bodet C, La VD, Epifano F, Grenier D, J Periodont Res (2008). Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. 43: 400–407.

Boranaska D, Cyboran S, Kujwa I , J, Oszmianksi, Halina K (2014). Antioxidant potentials of polyphenolic extracts from leaves of fruts bushes. 4, 15-21.

Berger, M.M. (2005). Can oxydatif damage be treated nutritionally Clinical nutrition, 24.

Blokhina L.D. Mello, L.T. Kubota (1999). Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation .335–343.

Bushra, R., & Aslam, N (2010). An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. Oman medical journal. 25(3), 155–1661.

Chaudhuri S, Anwasha B, Kaushik B , Bidisa S , Pradeep K. S (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects .41 : 42–48.

Cotelle N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. Curr. Top. Med. Chem. 1(6): 569-590.

Chippada SC, Volluri SS, Bammidi SR, Vangalapati M (2011). In vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of Centella asiatica by HRBC membrane stabilisation. Rasayan J Chem. (42): 457-460.

Chandra S., Chatterjee P., Dey P., Bhattacharya S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(1), 178-180.

Clos J (2012). L'immunité chez les animaux et les végétaux. Paris : Ed Elodie Lecoquerre. 296p.

chandra S., Chatterjee P., Dey P., Bhattacharya S. (2012). Evaluation of in vitro antiinflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(1), 178-180.

Davies, F. S. and L. G. Albrigo(1994). Effects of foliar applications of urea or nutritive on flowering and yields of Valencia orange trees. 112:1-4. 1999.

Dhillon (2004). Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*. *International Journal of Environmental Studies* . 61, 199-210.

Del rio, J.A ; Fuster, M. d.; Gomez, P.; Porras, I.; Garcia-lidon, A., et Ortuno, A. (2004). Citrus limon: a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Foodchem*. 84:457-461.

Ebrahimzadeh MA, Ehsanifar S, Eslami B (2009). Sambucus bulusensis fruits : A good source for antioxidants. *Pharmacognosy Magazine*. 5(19) : 213

Erukainure, O. L., Ebuehi, O. A., Choudhary, M. I., Mesaik, M. A., Shukralla, A., Muhammad, A., Zaruwa, M. Z., & Elemo, G. N. (2016). Orange Peel Extracts : Chemical Characterization, Antioxidant, Antioxidative Burst, and Phytotoxic Activities. *Journal of Dietary Supplements*, 13(5), 585-594.

Ernould and Audrey (2012) .The virtues of bitter orange and sweet orange tree. 24(10), 851-874.

Ercan, B. et Ilhami, G.U. (2011). Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilized aqueous extract of kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Food Research International*. 44: 1482-1489.

Fanciullino A, L, Claudie D, M, Yann F, Manuel, T, Patrick O, R, Morillon (2008). Changes in carotenoid content and biosynthetic gene expression in juice sacs of four orange varieties (*Citrus sinensis*) differing in flesh fruit color. 56, 3628–3638.

Ferhat M.A., Meklati B. Y., Chemat F (2011). Citrus of essential oils and their extraction processes in Algéria .65, 1182-1188 .

Fiot, J., Jansen, O., Akhmedjanova, V., Angenot, L., Balansard, G., & Ollivier, E. (2006). HPLC quantification of alkaloids from *Haplophyllum* extracts and comparison with their cytotoxic properties. *Phytochemical Analysis*, 17(5), 365-369.

Francezon, N., Tremblay, A., Mouget, J. L., Pasetto, P., & Beaulieu, L. (2018). Algae as a Source of Natural Flavors in Innovative Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(40), 11753-11772.

Francezon N(2018). valuation of orange peel de picea mariana with extraction.

Ferreiran R, G, Nicholas M.I. Taylo , D, Mona , Philippe R , Matthias E. L, Roland R, M,Britschgi , and Henning S (2018). Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils.

Fuhrman B, Alexandra L, and M, Aviram (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidatio . 995 ; 61 :549-54.

Goma Diallo F.B., Diallo B., Diallo Y(1998). Maternal Mortalyty AndLifestyle Risk Factors. 45 (12)

Gurung, A., Hung, T., Morin, J., & Gilks, C. B. (2012). Molecular abnormalities in ovarian carcinoma : clinical, morphological and therapeutic correlates. *Histopathology*, 62(1).

Gao, C., Tronson, N. C., & Radulovic, J. (2013). Modulation of behavior by scaffolding proteins of the post-synaptic density. *Neurobiology of Learning and Memory*, 105, 3-12.

Gueudet, T., Richter, S., Szulc, M., & Jehl, F. (2010). Les nouvelles formes de résistance des bactéries aux antibiotiques : deux cas de *Klebsiella pneumoniae* produisant une céphalosporinase plasmidique. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 40(3), 177-179.

Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxy radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177 (1): 91-104.

Genç, Y., Bardakci, H., Yücel, I., Karatoprak, G. E., Küpeli Akkol, E., Hakan Barak, T., & Sobarzo-Sánchez, E. (2020). Oxidative Stress and Marine Carotenoids : Application by Using Nanoformulations. *Marine Drugs*, 18(8), 423.

Goulas V., and Manganaris G. A., (2012). Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*. 131(1): 39-47.

Gionfriddo, F., Postorino, E., & Bovalo, F. (1996). I flavanoni glucosidici nel succo di bergamotto. *Essenze-Derivati agrumari*. 66, 404–416

Gulcin E, K, Ercan B , Emrah D 1 , F , Tozoglu and Ilhami (2004). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. 217-222.

González, F. ; Estrada-Flores, J. G.; Avilés-Nova, F.G.; Yong-Ángel, G.; Hernández-Morales, P.; Martínez- Loperena, R.; Pedraza-Beltrán, P. E.; Castelán-Ortega, O. A.,(2010). Agronomic evaluation and chemical composition of African stargrass (*Cynodon plectostachyus*) in the southern region of Mexico. *Trop. Subtrop. Agroecosyst*. 12 (1): 1-9 .

Garbi MI, Mohammed SF, Magzoub AA, Hassabelrasoul RM, Saleh MS, Badri AM, Ibrahim IT, Elshikh AA, Kabbashi AS (2017). In vitro anti-inflammatory properties of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Phyto J*. P:1-9.

Galbe, M, Zacchi G (2002). A review of the production of ethanol from softwood . 59:618–628.

Gadamsetty G, Maru S, Tyagi A, Chakravarthula SN (2013). Anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant effects of methanolic extracts of *Drypetessepiaria* (Euphorbiaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 10(5): 274-282.

Goodman G (2001). The pharmacological basis of therapeutics. 10th edition. McGraw Hill Company, Newyork. P: 690-695.

Hawthorne Steven B , Carol B. Grabanski, Esther Martin, David J. Miller (2000). Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. 892 :421–433 .

Huet R. (1991). Les huiles essentielles d'agrumes. 4 : 551-576.

Hosni k, N Zahed b, R Chrif b, I Abid b , W Medfei b , Mo Kallel c , N Ben Brahim d , H Sebei (2010). Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. 1098–1104.

- Ho Yung-Sheng Huang a, Su-Chen (2010).** Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit Peel. 868–873.
- Hatia .s, A. Septembre-Malaterre, F. Le Sage, A. Badiou-B é n é teau , P. Baret , B. Payet , C. Lefebvre d ' hellencourt . P. Gonthier (2014).** Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective eff ect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress. 48(4): 387–401.
- J, Baselga M. and M Elkabets , Giovanni B (2021).** leading cancer researcher and oncologist. 40:156 .
- Jansen E, Brienza S, Gierasimowicz-Fontana A, Matos C, ReyndersFrederix-Dobre C, Hatem SM (2015).** properties of flavonoid and citrus flavonoid hesperidin suppresses infection. 36:313-204.
- Kawaguchi K J , Oceanogr Soc Japan (2006).** Biology of Gonostoma gracile and vertical distribution. 29:113–120 .
- kimball S .John W (1999).** Kimball's Biology Pages. 415–13911–2.
- Kim, D. k., Lee, C.Y. (2004).** Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 44: 253–273.
- Kumar G, Karthik L, Rao KVB (2011).** Hemolytic activity of Indian medicinal plants towards human erythrocytes: an in vitro study. Elixir Appl Botany. 40: 5534–5537.
- Kessler RC, Andrews G, Colpe LJ, Hiripi E, Mroczek DK, Normand SL, Zaslavsky AM (2002).** Short screening scales to monitor population prevalence and trends in non-specific psychological distress. Psychological Medicine. 32(06) : 959-976.
- Lucia, N. (2013).** Two years impact of single praziquantel treatment on infection of urinary schistosomiasis in the Barombi Kotto focus, Cameroon. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 3(3), 98-107.
- Ladaniya, Milind S. (2008).** Postharvest Mangement Of Citrus IN South Asian Countries. 1065, 1669 1676.
- Lin Yan, Tanaka Shuzo (2006).** Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects . 69: 627–642.

- Lavolla j (1947).** Peel of citrus .51: 327-345 .
- Lawrence Kenneth J. Zucker & Anne A (2009).** Epidemiology of Gender Identity Disorder: Recommendations for the Standards of Care of the World Professional Association for Transgender Health. 11:8–18 .
- Louerrad Y, M ;Kaid-Harche (2016) .** Evaluation of phenolic compound of Two Lygem spartum L. cytotypes. 22 (3) : 277- 281.
- Lanneau D (2010).** Rôle of protéines for choc thermique HSP90 et HSP70 in macrphage differentiation.
- Larsson SC, Wolk A (2008).** Coffee consumption and risk of liver cancer : a meta-analysis. Gastroenterology. 132: 1740-1745.
- Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ (2002).** Polyphenolic antioxidants from the fruits of Chrysophyllumcainito L. (star apple). Journal of Agriculture and Food Chemistry. (50): 1379-1382.
- Lakache.Z, C. Tigrine, H. Aliboudhar et A. Kameli (2019).** Chemical composition and anti – inflammatory activity is to toxic ans live from the methanolic extract of the leaves d’Olea.
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007).** Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 763-777
- Mossman, B., Light, W., & Wei, E. (1983).** Asbestos : Mechanisms of Toxicity and Carcinogenicity in the Respiratory Tract. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23(1), 595-615
- Mahmoud, S. A. ; Magouze, F. I. ; El-Kelawy, H. M. ; Homouda, I. A. ; Alla, S. A. Z. G., (1998).** Productive and reproductive performance of rabbits fed diets containing different agricultural by-products. 2. Reproductive performance of male and female rabbits. Egyptian J. Rabbit Sci. 8 (1): 61-68.
- Miyake, Y.-C., Chuang, Y. C., & Hsu, H. and Bocco (2008).** The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. 106(1), 277 284.
- Mohsenzadeh A, A Zamani, M J. Taherzadeh (2017).** Bioethylene Production from Ethanol: A Review and Techno-economical Evaluation. 2, 1–18.

Mohanty Sujit k, Manas S (2019). Bioethanol Production From Corn and Wheat: Food, Fuel, and Future.

Medzhitov R, (2010).The Inflammation new adventures of an old flame. *Cell*. 140, 771-776.

Manish K., Mahesh A.r., M som ash e kh Ar (2013). evaluation of antitubercular activity of methanolic extract of citrus sinensis. 18-22.

Mouly, P.P., Gaydou, E.M. and Coretti, J (1999). Determination of the geographical origin of Valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles. *J. Chromatogr.* 844, 149-159.

Manthey J.A., Grohmann K (2001). Phenols in Citrus Peel Byproducts. Concentrations of Hydroxycinnamates and Polymethoxylated Flavones in Citrus Peel Molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 3268-3273.

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). The main phenolics of fruits. In *Fruit phenolics*. Boca Raton, FL : CRC Press, (pp. 1-103).

Murugasan N, Vember S, Damodharan C (1981). Studies on erythrocyte membrane- IV. In vitro haemolytic activity of Oleander extract. *Toxicol Lett.* (33-38).

Moreno MM, Garidel P, Suwalsky M, Howe J, Brandenburg K (2009). The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: a physicochemical study with lecithin phospholipids *Biochimica Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*. 1788(6): 1296-1303.

Nieto, d corrigan, R Martinez and j depler (2021). Actions of orange peel and citrus. 6749(20)31329-4.

Nathan C (2002). Points of control in inflammation. *420* :19-26.

Nisar, M. F., He, J., Ahmed, A., Yang, Y., Li, M., & Wan, C. (2018). Chemical Components and Biological Activities of the Genus *Phyllanthus*: A Review of the Recent Literature. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 23(10), 2567.

Nondo, Ramadhani & Moshi, Mainen & Kazyoba, Paul & Zofou, Denis & Njouendou, Jelil & Wanji, Samuel & Ngemenya, Moses & Kidukuli, Abdul & Masimba, John & Titanji, Vincent (2015). Evaluation of the cytotoxic activity of extracts from medicinal plants 44 used for the treatment of malaria in Kagera and Lindi regions, Tanzania. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 5. 007-012.

Novaes M.R., Novaes L.C.G., Melo A.L., Recôva V.L. (2007). Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus*. *Comun Ciênc Saúde*. 18(3), 1227-1236.

Nisar, B., Sultan, A., & Rubab, S. L. (2018). Comparison of Medicinally Important Natural Products versus Synthetic Drugs-A Short Commentary. *Natural Products Chemistry & Research*, 06(02).

N Kachappilly, J Srivastava , Bani Prasad S, PThakur (2022). Interaction of Alpha-Synuclein and Its Mutants with Rigid Lipid Vesicle Mimics of Varying Surface Curvature. 14, 8, 10153–10167.

Osbeck , Lisa M (2014). Scientific Reasoning as Sense-Making: Implications for Qualitative Inquiry. 01(2014) 34 – 46.

Oboh Stephen A. Adefegha and Ganiyu (2012). Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity, antioxidant properties and phenolic composition of two *Aframomum* species . 6, 96-25.

Oyedapo OO, Akinpelu BA, Akinwunmi KF, Adeyinka MO, Sipeolu FO (2010). Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2(4): 46-51.

Pagano M and Faggio C (2015). The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell BiochemFunct*. 33: 351–355

Pereira, ET López, JD Brito, JB Reis, LER Dantas, LH Bortolai (2017). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety*. 11(6), 530-545.

Petkov et Nikaido (1982). Comparative effects of the flavonoids luteolin, apigenin and rhoifolin on experimental pulmonary hypertension in the dog.

Patsalou M, Kristia K, a, Eftychia M a, Marlen I. Vasquez a, Ch Drouza b, M Koutinas (2019). Development of a citrus peel-based biorefinery strategy for the production of succinic acid. 166 : 706-716.

Qingsen M, Mingli Li, Lang W (2015). How Does Physical Activity Intervention Improve Self-Esteem and Self-Concept in Children and Adolescents ? Evidence from a Meta-Analysis.

Quideau S, D Deffieux, C Douat-Casassus, and L Pouysgu(2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis .50, 586 – 621.

Ramful, D.; Tarnus, E.; Aruoma, O.; Bourdon, E etBahorun, T. (2011). polyohénol composition, vitamin c content and antioxydant capacity of mauritian citrus fruit pulp. *foodresearch international*. 44: 2088-2099.

Rani AA, Punitha SMJ, Rema M (2014). Anti-inflammatory activity of flower extract of *Cassia auriculata*-an in vitro study. *Int Res J Pharm Appl Sci*. 4: 57-60.

Rios JL, Recio MC, Vilar A, J Ethnopharmacol (1988).Activities of *Citrus aurantium* . 23:127–149.

Ramadhani, S. N., Denis, Z., Mainen, J. M., Paul, E., Samuel, W., Moses, N. N., Vincent, P. T., Abdul, W. K., & Pax, J. M. (2015). Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of medicinal plants used to treat malaria in Kagera and Lindi regions, Tanzania. *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(6), 179-192.

Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., & Fritig, B. (1993). Plant ‘pathogenesis-related’ proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75(8), 687-706.

Siles, J., Vargas, F., Gutiérrez, M., Chica, A., & Martín, M. (2016). Integral valorisation of waste orange peel using combustion, biomethanisation and co-composting technologies. *Bioresource Technology*, 211, 173-182.

Sadique J., Al-Rqobah W.A., Bughait M.F., El-Gindy A.R. (1989). The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*. 60: 525-532.

Singh, Balwinder ; Pal Singh, Jatinder; Kaur, Amritpal; Singh, Narpinder (2020). Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, (), 109114.

Saeed, M. E., Meyer, M., Hussein, A., & Efferth, T. (2016). Cytotoxicity of South-African medicinal plants towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 186, 209-223

Segun, P. A., Ismail, F. M., Ogbale, O. O., Nahar, L., Evans, A. R., Ajaiyeoba, E. O., & Sarker, S. D. (2018). Acridone alkaloids from the stem bark of *Citrus aurantium* display

selective cytotoxicity against breast, liver, lung and prostate human carcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 131-138.

Singh N, Y Tang , Z Zhang, Ch Zheng (2020). Valorisation of citrus peel. 0921-3449.

S , S, Hosseini, F Khodaiyan, M,S ; Yarmand (2016). Aqueous extraction of pectin from sour orange peel and its preliminary physicochemical properties . 31587-77871.

Siles José A, Margesin R (2016). Abundance and Diversity of Bacterial, Archaeal.

Smayth M .M, J.A. Siles, A.F. Chica, A. Martín (1998). Biomethanization of orange peel . 101 :8993–8999 .

Sunders C (2002). Red Blood Cell Hemolysis During Processing. 0887-7963.

Sadique J, Al-Rqobah WA, Bughait MF, El-Gindy AR (1989). The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*. 60: 525-532.

Tchèque, GBEKLEY E, H, Agbodeka K, Karou Simplicie D, A K, Adjrah Yao, T Gérard, A Blaise, Simporé J, and Gbeassor M 2021 Composés bioactifs isolés des plantes à propriété anti-diabétique: Revue de littérature 4(19) 839-849.

Terzuoli, L., Pizzichini, M., Pagani, R., Guerranti, R., Ponticelli, F., Leoncini, R., & Marinello, E. (1997). Biological role of carbamoyl pyridoxal 5'-phosphate. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 320(6), 435-440.

Tanaka K, Bihan DL, Doya K, Tanaka KF (1977). citrus nurseries and plantation edition.

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

Tripoli, E., Guardia, M., Gimmanco, S., DiMajo, D. ET Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*. 104: 466-479.

Thakur A K, Murali J, R Mishra, Mo Thakur, V M Chellgren, L Byeon, D H Anjum, R Kodali, T P Creamer, J F Conway, A M Gronenborn & R Wetzel (2009). Polyglutamine disruption of the huntingtin exon terminus triggers a complex aggregation mechanism.

- T Jinhuan, W Wen, M Liu, Changren Zh (2001).** Antibacterial activity and cytocompatibility of chitooligosaccharidemodified polyurethane membrane via polydopamine adhesive layé. 7,510-632.
- Virtual M a, amy E, L Ch Costello (2002).** Estimating Virtual Nitrogen Inputs to Integrated U.S. Corn Ethanol and Animal Food Systems. (12):8393-8400.
- Valle, A. L., Mello, F. C. C., Alves-Balvedi, R. P., Rodrigues, L. P., & Goulart, L. R. (2018).** Glyphosate detection : methods, needs and challenges. *Environmental Chemistry Letters*, 17(1), 291-317.
- Vincent, L. A. (1962).** A la recherche des « lois » de la consommation. *Etudes et conjoncture* - Institut national de la statistique et des études économiques, 17(6), 543-576.
- Varmus H (2009).** The Art and Politics of Science. 10: 039-306.
- Voragen H.A. Schols and A.G.J (1996).** Complex Pectins: Structure elucidation using enzymes. 279 : 265- 279.
- Ververis S, K. Georghiou a, D. Danielidis b, D.G. Hatzinikolaou a, P. Santas c, R. Santas c, V. Corletid (2007).** Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. (98) 296–301.
- Vuolo Milena Morandi, Verena Silva Lima^{1, 2}, Mário Roberto Maróstica Junior (2019).** Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power.
- Williams L.A.D., ConnarA. O., Latore L., Dennis O., Ringer S., Whittaker J.A., Conrad,J., Vogler B., Rosner H , Kraus W. (2008).** The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (Immunogenic) bovine for the detection of anti-inflammatory compoundsJ. (4): 327- 331.
- Wilkins M, Wilbur W. Widmer b , K Grohmann (2007).** Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. 42 : 1614–1619.
- Wilkins, B., Lee, N., Gajawelli, N., Law, M., & Leporé, N. (2015).** Fiber estimation and tractography in diffusion MRI : Development of simulated brain images and comparison of multi-fiber analysis methods at clinical b-values. *NeuroImage*, 109, 341-356.

Williams L.A.D., Connar A.O., Latore L., Dennis O., Ringer S., Whittaker J.A. (2008).

The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (Immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. *West Indian Med J.* 57 (4), 327- 331.

Yeh H-M, Ohta S and J Oceanogr (2007). Influence of velocity and types of beam trawl towing on deep-sea demersal fish and decapod crustacean samples. 58:505–517.

Zhou Q., Wan Q., Jiang Y., Liu J., Qiang L., and Sun L. (2016). A landscape of murine long non-coding RNAs reveals the leading transcriptome alterations in adipose tissue during aging. *Cell Rep.* 31, 107-694.