

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 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

**Valorisation des extraits bruts du *Citrus reticulata* de la
région d'Ain-Temouchent par l'étude de son activité
antioxydante et anti-inflammatoire**

Présenté par :

- 1) M^{elle} MOSTEFAOUI Roumaïssa
- 2) M^{elle} MAZZOUZ Fatima Zahra
- 3) M^{elle} MOUSSI Houria Bouchera

Devant le jury composé de :

Dr. BENHABIB Ouassila	MCA	U.A.T.B.B (Ain Temouchent)	Présidente
Dr. GHEMBAZA Nacera	MCB	U.A.T.B.B (Ain Temouchent)	Examinatrice
Dr. BRIXI-GORMAT Nassima	MCB	U.A.T.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

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

Nous voudrions tout d'abord remercier notre promotrice, **Dr BRIXI GORMAT-BENMANSOUR Nassima**, Maître de conférences classe B à l'université d'Ain Témouchent, pour avoir accepté de nous encadrer et diriger ce travail par excellence.

Aussi bien pour ces conseils judicieux, pour le temps qu'elle nous a consacré et pour sa supervision éclairée tout au long de la rédaction du mémoire.

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

Dr. BENHABIB Ouassila, Maître de conférences classe A à l'Université d'Ain Témouchent Belhadj Bouchaib, qui nous a honorées en acceptant d'être présidente de jury.

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

Aussi, nous remercions **Dr MOHAMEDI Walid**, Maître assistant classe A à l'Université d'Ain Témouchent Belhadj Bouchaib de nous avoir aidé et pour ses conseils et ses qualités humaines.

Nous tenons à remercier tous nos enseignants pour leurs efforts, leurs savoirs, leurs acquis scientifiques durant toute la durée de nos études universitaires.

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

Nous tenons à exprimer notre gratitude envers nos parents et nos familles pour leur encouragement et leur instruction.

A tous nos proches et tout ce qui de près ou de loin, nous ont apporté leur soutien pour accomplir ce travail.

Dédicaces

Nous dédions ce modeste travail en signe de respect, de reconnaissance et de gratitude :

À dieu tout puissant de nous avoir donné le courage, la santé, et nous accordé son soutien
durant les périodes les plus difficiles.

À nos très chers parents, qu'on admire beaucoup, qui nous ont toujours aidé dans notre vie et
qui n'ont cessés de nous encourager et de nous soutenir tout au long de nos études, que Dieu
les garde en bonne santé.

À nos frères et sœurs pour leur tendresse et leur permanente présence à nos côtés, pour leur
soutient et encouragement.

À nos amis qui nous ont toujours encouragés, et avec qui on a passé des années inoubliables.

À toute nos familles et nos proches.

À notre chère Encadrant Dr BRIXI GORMAT.N.

À Mr SIDI ALI CHERIF Menaouar.

À nos amis et notre promotion Biochimie « 2021/2022 ».

Roumaissa, Bouchera, Fatima

Résumé

Les extraits d'agrumes, comme d'autres plantes, ont reçu beaucoup d'attention en tant que source potentielle de molécules naturellement bioactives. Dans cette optique, notre travail s'est fondé sur la valorisation des extraits bruts (écorces, feuilles, pépins) du *Citrus reticulata* de la région d'Ain Temouchent par l'étude de son activité antioxydante et anti-inflammatoire *in vitro* qui ont été évalué par différentes méthodes (DPPH, pouvoir réducteur, stabilisation des globules rouges humaines et celle de la dénaturation de l'albumine humaine). L'extraction des extraits bruts des écorces, feuilles et pépins ont noté une rentabilité de 38%, 13% et 9% respectivement. En plus, à différentes concentrations (100, 300, 500µg/ml), l'extrait des écorces a enregistré le plus important pouvoir anti-inflammatoire par rapport aux autres extraits. En revanche, c'est l'extrait des feuilles qui possédait la meilleure activité antioxydante dans les deux tests utilisés. On peut dire, que les différentes parties du *Citrus reticulata* présentent un potentiel antioxydatif et anti-inflammatoire, proportionnel avec leur composition.

Mots clés : *Citrus reticulata*, sous-produits, extraits bruts, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.

Abstract

Extracts of citrus fruits, like other plants, are beginning to be of great attention as a potential source of natural bioactive molecules. In this perspective, our work was based on the valorization of crude extracts (peels, leaves, seeds) of *Citrus reticulata* from the region of Ain Temouchent by the study of its antioxidant and anti-inflammatory activity *in vitro* which were evaluated by different methods (DPPH, reducing power, stabilization of human red blood cells and that of the denaturation of the human albumin). The extraction of the crude extracts of peels, leaves and seeds showed a profitability of 38%, 13% and 9% respectively. In addition, at different concentrations (100, 300, 500 μ g/ml), the peel extract recorded the highest anti-inflammatory power compared to the other extracts. On the other hand, the leaf extract had the best antioxidant activity in both tests used. It can be said that the different parts of *Citrus reticulata* have an antioxidant and anti-inflammatory potential, proportional to their composition.

Keywords: *Citrus reticulata*, by-products, crude extracts, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

ملخص

بدأت مستخلصات الحمضيات ، مثل النباتات الأخرى ، في اكتساب الكثير من الاهتمام كمصدر محتمل للجزيئات الطبيعية النشطة بيولوجيًا. مع وضع هذا في الاعتبار ، اعتمد عملنا على تثمين المستخلصات الخام (اللحاء والأوراق والبذور) من الحمضيات الشبكية من منطقة عين تموشنت من خلال دراسة نشاطها المضاد للأكسدة والمضاد للالتهابات في المختبر والتي تم تقييمها بطرق مختلفة (نشاط الكسح الجذري، الحد من قوة مضادات الأكسدة الحديدية، تثبيت خلايا الدم الحمراء البشرية وطريقة إزالة بروتينات الألبومين البشرية). سجل استخراج المستخلصات الخام من اللحاء و الأوراق و البذور ربحية بلغت 38% و 13% و 9% على التوالي. بالإضافة إلى ذلك ، بتركيزات مختلفة (100 ، 300 ، 500 ميكروغرام / مل) ، سجل مستخلص اللحاء أكبر قوة مضادة للالتهابات مقارنة بالمستخلصات الأخرى. من ناحية أخرى ، فإن مستخلص الأوراق كان له أفضل نشاط مضاد للأكسدة في الاختبارين المستخدمين. يمكننا القول أن الأجزاء المختلفة من الحمضيات الشبكية لها إمكانات مضادة للأكسدة ومضادة للالتهابات ، تتناسب مع تكوينها.

الكلمات المفتاحية : الحمضيات الشبكية ، منتجات جانبية ، المستخلصات الخام ، النشاط المضاد للاكسدة ، نشاط مضاد للالتهابات.

Table des matières

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
I. Généralités sur <i>Citrus reticulata</i>	5
I.1. Description morphologique et physiologique.....	5
I.2. Identification botanique	7
I.3. Composition chimique.....	8
I.4. Propriétés thérapeutiques.....	9
II. Activité antioxydante	9
II.1. Généralités sur le stress oxydatif.....	9
II.2. Définition et classification des antioxydants.....	10
II.2.1. Les antioxydants naturels.....	10
II.2.2. Les antioxydants synthétiques	12
II.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant <i>in vitro</i>	13
II.4. Activité antioxydante des Citrus.....	14
III. Activité anti-inflammatoire	14
III.1. Généralités sur l'inflammation.....	14
III.2. Les facteurs déclenchant l'inflammation	15
III.3. Mécanisme de l'inflammation	15
III.4. Exemples des cellules et médiateurs inflammatoire	16
III.5. Types d'anti inflammatoires	17
III.5.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens.....	17
III.5.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	17

III.5.3. Les anti-inflammatoires d'origine végétal.....	18
III.6. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	19
III.7. Activité anti-inflammatoire des Citrus.....	19

Partie II. Matériel et méthodes

I. Matériel végétal.....	21
I.1. Collecte et préparation de l'échantillon.....	21
II. Méthodes.....	21
II.1. Préparation des extraits bruts.....	21
II.2. Rendement d'extraction.....	23
II.3. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	24
II.3.1. Test d'inhibition de la dénaturation des protéines (albumine).....	24
II.3.2. Test d'hémolyse ou de stabilité membranaire.....	25
II.4. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	26
II.4.1. Réduction du fer : FRAP (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>).....	26
II.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante par l'effet scavenger du radical DPPH.....	28

Partie III : Résultats et discussions

I. Rendement des extraits de <i>Citrus reticulata</i>.....	31
II. Activité anti inflammatoire.....	32
II.1. Inhibition de la dénaturation protéique (albumine humaine)	32
II.2. Evaluation de la protection contre l'hémolyse (stabilisation membranaire)	35
III. Activité antioxydante.....	36
III.1. Méthode de FRAP (<i>ferric reducing antioxidant power</i>)	36
III.2. Evaluation de pouvoir anti radicalaire par le DPPH.....	38
Conclusion et perspectives.....	44
Références bibliographiques.....	47
Annexes.....	58

Liste des tableaux

Tableaux 1 : Identification botanique du <i>citrus reticulata</i>	7
Tableaux 2 : La composition chimique du mandarinier.....	8
Tableaux 3 : Sources de stress oxydant endogènes et exogènes.....	10
Tableaux 4 : les différents antioxydants naturels.....	11
Tableaux 5 : Exemples de plantes douées de l'activité anti-inflammatoire.....	18
Tableaux 6 : Les caractères organoleptiques des extraits du <i>citrus reticulata</i>	32

Liste des figures

Figure 1 : Arbre du mandarinier.....	5
Figure 2 : Fruit et fleur du mandarinier.....	6
Figure 3 : Coupes transversale (A) et longitudinale (B) schématiques d'une mandarine.....	7
Figure 4 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et anti oxydant.....	10
Figure 5 : Structure de quelque antioxydant synthétique.....	13
Figure 6 : Facteurs déclenchant l'inflammation.....	15
Figure 7 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire.....	16
Figure 8 : Les différentes cellules impliquées dans la réaction de l'inflammation.....	16
Figure 9 : Les échantillons pépins, feuilles et écorce du <i>citrus reticulata</i> après séchage.....	22
Figure 10 : Macération sur agitateur magnétique.....	23
Figure 11 : Solutions après 1 ^{ère} filtration (feuilles, pépins, écorce)	23
Figure 12 : évaporateur rotatif sous vide.....	24
Figure 13 : (feuilles, pépins, écorces) après séchage dans l'étuve.....	24
Figure 14 : Echantillons préparés avant centrifugation.....	27
Figure 15 : Echantillons centrifugés.....	27
Figure 16 : Echantillon à lire sur spectrophotomètre.....	28
Figure 17 : Spectrophotomètre en lecture.....	28
Figure 18 : Réduction du radical DPPH.....	29
Figure 19 : Rendement des extraits sec d'écorces, feuilles, pépins du <i>citrus reticulata</i>	32
Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction des différentes concentrations d'extraits (d'écorces, feuilles, pépins) <i>Citrus reticulata</i> et de l'acide salicylique.....	34
Figure 21 : Pourcentage de stabilisation de membrane des globules rouges en fonction des différentes concentrations d'extraits (d'écorces, feuilles, pépins) <i>Citrus reticulata</i> et de l'acide salicylique.....	36
Figure 22 : L'absorbance de membrane de globule rouge en fonction des différentes concentrations d'extraits du <i>Citrus reticulata</i> (feuilles, écorces, pépins) et de l'acide salicylique.....	38

Figure 23 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait brut de l'écorce.....	39
Figure 24 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait brut des feuilles.....	40
Figure 25 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait brut des pépins.....	40
Figure 26 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.....	40
Figure 27 : Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50 % du fer des différents extraits en mg / ml.....	41

Liste des annexes

ANNEXE 1

Tableau 1 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction des différentes concentrations d'extraits de *Citrus reticulata* et de l'acide salicylique.....47

Tableau 2 : Pourcentage de stabilisation de membrane des globules rouges en fonctions des différentes concentrations d'extraits et de l'acide salicylique.....47

Tableau 3 : Le pouvoir réducteur des différents extraits de *Citrus reticulata* et de l'acide ascorbique.....58

Tableau 4 : Les résultats des IC50 pour le test de DPPH.....59

Liste des abréviations

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

Abs : Absorbance.

Ac : Acide ascorbique.

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AIS : Anti-inflammatoires stéroïdiens.

BHA : Butylated hydroxy anisole.

BHT : Butylated hydroxy toluene.

CE50 : Concentration efficace 50.

COX1 : Cyclooxygénase 1.

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

DPPHH: 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine.

FAO: Food and Agriculture Organisation.

Fe²⁺ : Oxyde ferreux.

Fe³⁺ : Oxyde ferrique.

FeCl₃: Chlorure ferrique.

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power Assay.

HRBC: High Red Blood Cell.

HSA : Sérum albumine humaine.

IC50 : Concentration correspondante à 50% d'inhibition.

K₃Fe : Ferricyanure de potassium.

LOX : Lipoxygénases.

NaCl : Chlorure de sodium.

NO : Oxyde Nitrique.

PBS : Phosphate buffered saline.

PGE2 : Prostaglandine E2.

PGI₂ : Prostacycline.

PLA2 : Phospholipase A2.

ROS : Espèce réactive d'oxygène.

R-PE: R-phycoérythrine.

TBHQ: Tertiary butyl-hydroxy-quinone.

TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter.

UV-Visible : Ultraviolet-visible.

XO : Xanthine Oxidase.

INTRODUCTION

Introduction

Les agrumes, une composante de l'alimentation Méditerranéenne (**Rock et Fardet, 2014**), sont très consommés dans le monde entier comme produits frais, jus, ou confiture... (**Pallavi et al., 2018**). En outre, les agrumes jouent un rôle important dans l'industrie agroalimentaire et la santé humaine (**Doukani et al., 2017**), et présentent des propriétés pharmacologiques comme anti cancéreux, antioxydant et anti-diabétique, etc... (**kim et al., 2010**).

En Algérie, environ 6,8 % de la superficie totale est occupé par l'arboriculture fruitière, avec une production de 571000 tonnes d'agrumes au cours des années 2010- 2011 (**FAO, 2012**). Plus de 89 millions de tonnes ont été produits dans le monde durant l'année 2014 et le tiers de cette production est transformé industriellement en jus (**M'hiri, 2015 ; USDA, 2014**).

Au cours de ce processus de transformation des agrumes, de grandes quantités de déchets (sous-produits) sont produites. Ces derniers, rejetés par l'industrie posent un sérieux problème pour leur élimination. Ainsi, de nouveaux aspects concernant leur utilisation comme additifs alimentaires ou comme suppléments à haute valeur nutritionnelle ont suscité un grand intérêt (**Brixigormat, 2017**).

En effet, il a été établi que les sous-produits d'agrumes sont une source de composés biologiquement actifs, tels que les vitamines, les fibres alimentaires, la pectine, les polyphénols et les huiles essentielles ; qui sont doués d'effets antioxydants, antimicrobiens, anticancéreux, anti-inflammatoires et antidiabétiques, pouvant être utilisés comme compléments de santé ou comme aliments fonctionnels/nutraceutiques (**Papoutsis et al., 2018**).

Le stress oxydatif, qui est considéré comme un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et leur élimination par mécanismes de protection, peut aussi entraîner une inflammation chronique en activant une variété de facteurs de transcription, qui conduisent à l'expression différentielle de certains gènes impliqués dans les voies inflammatoires. L'inflammation déclenchée par le stress est la cause de nombreuses maladies chroniques (**Hussain et al., 2016**).

De plus, l'inflammation accélère la production des radicaux libres, qui peuvent submerger les défenses antioxydantes et provoquer des réactions en chaîne modifiant ainsi les tissus sains (**Desmier, 2016**).

Par ailleurs, des études ont montré que les agrumes peuvent être considérés comme alternative potentielle pour gérer les dommages oxydatifs et inflammatoires (**Haidari et al., 2019**), De par leur richesse en polyphénols qui inhibent les voies de signalisation moléculaire activées par le stress oxydatif, ainsi que leurs rôles dans les troubles chroniques médiés par l'inflammation (**Hussain et al., 2016**).

Introduction

Le potentiel de valorisation des sous-produits d'agrumes a permis non seulement d'alléger l'impact écologique en minimisant la pollution mais aussi a conduit à la transition vers une économie circulaire durable en développant un nouveau paradigme connu sous le nom de concept de « bioraffinerie », qui repose sur « l'utilisation ou le recyclage » des sous-produits d'agrumes (**Nayak et Bhushan, 2019**).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à l'étude des extraits bruts des écorces, feuilles et pépins de l'espèce *Citrus reticulata* (mandarine), dans le but de déterminer leur intérêt biologique.

De ce fait, notre travail comportera trois parties :

- Préparation des trois extraits bruts des écorces, feuilles et pépins du fruit de mandarine.
- Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante par les deux tests du DPPH et FRAP.
- Evaluation *in vitro* de l'activité anti inflammatoire en utilisant les deux méthodes, celle de l'inhibition de la dénaturation des protéines (albumine) et un test d'hémolyse.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse bibliographique

I. Généralités sur *Citrus reticulata*

La mandarine (*Citrus reticulata*) originaire de Chine, fut rapidement diffusée dans l'ensemble du bassin méditerranéen. Elle est très parfumée, de couleur jaune or, facile à éplucher, avec de nombreux pépins (**voir figure 1**). Récoltée en janvier et février, et peut être étalée de Novembre à Mars (**Jacqemond et al., 2009**). Cultivée premièrement en Chine pendant des années avant d'être introduite en Europe. En 1805 les mandarines s'implantèrent en provence ensuite en Algérie en 1850 (**Brebion et al., 1999**).



Figure 1 : Arbre du mandarinier (**Le bellec et al., 2004**).

I.1. Description morphologique et physiologique

D'après **Khan et al., (2010)**, la classification botanique des agrumes est comme suite :

- **Règne** : Végétal.
- **Embranchement** : Spermaphyte.
- **Division** : Angiosperme.
- **Classe** : Monocotylédoneae
- **Sous classe** : Archichalmydeae
- **Ordre** : Rosidae
- **Sous-ordre** : Germiniineae
- **Famille** : Rutaceae.
- **Tribu** : *Citreae*.
- **Genre** : *Poncirus, Fortunella, et Citrus*

Synthèse bibliographique

C'est un arbre de taille variable, mais caractéristique par son port érigé. Les fleurs sont petites et blanches, en bouquet. Le fruit est une baie globuleuse et aplatie sur ses deux pôles (**figure 2**) (Soheyb et Houcem, 2017). Sa peau fine d'abord verte qui devient orangée. La peau s'épluche aisément à la main et n'adhère pas à la pulpe orangée. Juteuse, sucrée et très parfumée. (Le bellec et al, 2004). La clémentine est parfois confondue avec la mandarine, c'est un hybride entre cette dernière et d'orange. Origine de l'Asie du Sud-Est (Soheyb et Houcem, 2017).



Figure 2 : Fruit et fleur du mandarinier (Le bellec et al., 2004).

Tous les fruits des agrumes ont la même structure. Seuls la dimension et la forme changent d'une espèce à une autre. Il s'agit d'un point de vue biologique d'une baie charnue (**Figure3**). Le fruit est composé de deux parties : la peau également appelée péricarpe et la pulpe appelée endocarpe (**figure 3**) (Ladaniya, 2008).

Le péricarpe : composé d'un épicarpe qui correspond au flavédo et d'un mésocarpe qui correspond à l'albédo (Ladaniya, 2008). Le flavédo représente la partie externe colorée (vert, jaune, orange...) contenant les glandes à huiles essentielles. Le mésocarpe est la couche intérieure blanchâtre, de structure spongieuse (M'hiri, 2015), plus ou moins épaisse par rapport à la taille du fruit, elle peut constituer 12 à 30% du fruit. (Huet, 1991 ; Albagnac, 2002 ; Bennici et al., 2004 ; Ramful et al., 2010 ; Bensalem et Horchi, 2021).

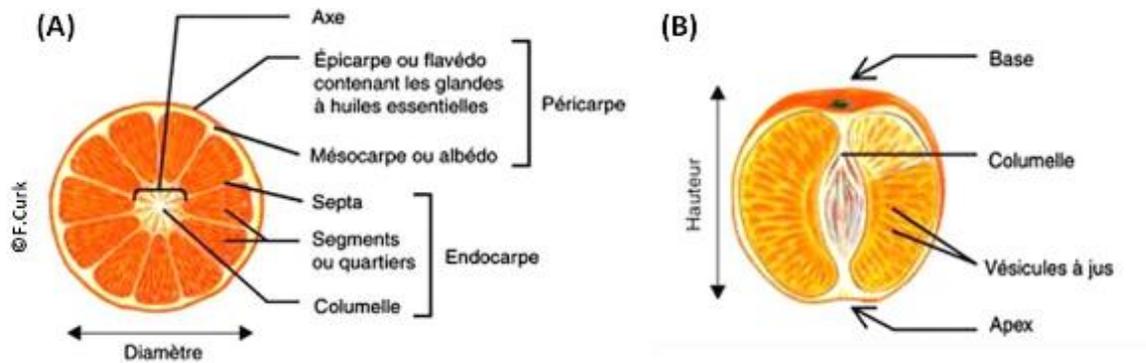


Figure 3 : Coupes transversale (A) et longitudinale (B) schématisques d'une mandarine (Khefifi, 2015).

I.2. Identification botanique

Le mandarinier est un petit arbuste au port arrondi d'un parfum exotique à cause de ses fleurs, d'une taille variable qui peut atteindre 3-5 m de hauteur et largeur avec de nombreux rameaux épineux (Lime, 2012), produisant le fruit qui peut se distinguer des autres agrumes par sa couleur rougeâtre attrayante et sa peau lisse facile à pelée (Ladaniya, 2008). Le tableau 1 qui suit montre l'identification botanique du mandarinier.

Tableau 1 : Identification botanique du *Citrus reticulata* (Lime, 2012 ; Ladaniya, 2008).

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

Synthèse bibliographique

I.3. Composition chimique

Le tableau 2 résume la composition chimique en métabolites primaires et secondaires de la mandarine (**Oumbiche et Hachamoui, 2013**).

Tableau 2 : La composition chimique de la mandarine.

Composants	Localisation	Références
Les sucres : Fructose, Glucose, Saccharose	Fruits, feuilles, écorces	Tripoli et al., 2007 Diankov et al., 2001
Protéines et les fibres	Fruits, écorces, feuilles	Ma et al., 2008
Sels minéraux : Calcium, Fer, Mg, Phosphore, sodium, Zinc, Cuivre, Mn, Se.	Fruits, feuilles, écorces	Rashidet al., 2013 Rapisarda et al., 2009
Les vitamines : Thiamine (B1), Riboflavine (B2), B3, Pyridoxine (B6), Acide ascorbique (C), Vitamine A, Vitamine E.	Fruits, feuilles	Boudries et al., 2012 Vinson et al., 2002 Rincon et al., 2005
Acides aminés : Tryptophane, Isoleucine, Leucine, Lysine, Méthionine, Cystine, Phénylalanine, Tyrosine, Valine, Arginine, Histamine, Alanine, Acide Aspartique, Acide Glutamique, Glycine, Proline et Serine.	Fruits	Tumbas et al., 2010 Mukhtar et al., 2005 Lim, 2012 Menichini et al., 2011
Les métabolites Secondaires : Acide Phénoliques, Flavonoïdes (Flavanone, Flavone, Flavonol, Hespéridine), Huiles essentielles, limonoïdes incluant : obacumone 17 beta D- glucopyranoside, acide momilinique 17 beta-D glucopyranoside, limonemi, monilline.	Fruits, feuilles, écorces	Bilbao et al., 2007

I.4. Propriétés thérapeutiques des fruits du genre *Citrus reticulata*

De nombreuses études ont montré que les espèces du genre *Citrus* sont riches en principes actifs tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, utilisés à des fins thérapeutiques ou dans les domaines cosmétiques ou alimentaires (**Shohaib et al., 2011 ; Kähkönen et al., 1999**).

Parmi les propriétés thérapeutiques de ces principes actifs, citons :

- ✓ Effet veinotonique, facilitant la circulation sanguine (flavonoïdes).
- ✓ Effet antispasmodique (extrait d'écorce).
- ✓ Effet antibactérien (surtout l'huile essentielle).
- ✓ Effet antiviral (flavonoïdes).
- ✓ Traitement des insomnies et de la nervosité (feuilles et fleurs).
- ✓ Stimulation de l'appétit (zestes) (**Santos et al., 2011 ; Karimi et al., 2012**).
- ✓ Effet antioxydant et antiradicalaire (flavonoïdes).
- ✓ Effet antiallergique (flavonoïdes).
- ✓ Effet antidépresseur (polyphénols) (**Li et al., 2006 ; Khizar et al., 2010 ; Boudries et al., 2012 ; Oumbiche et Hachamoui, 2013**).

II. Activité antioxydante

II.1. Généralités sur le stress oxydatif

Dans l'organisme, mais aussi sous l'action d'éléments environnementaux (**tableau3**), plusieurs mécanismes biochimiques peuvent s'activer en produisant de manière excessive des ROS (espèce réactive d'oxygène), qui vont, dès lors, submerger très rapidement toutes nos défenses antioxydantes. Il y a donc apparition d'un stress oxydant qui se définit comme un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants (ROS) et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires souvent irréversibles (**figure 4**).

Le stress oxydant est impliqué dans le développement de plus de 200 pathologies (maladies cardiovasculaires, dégénératives et inflammatoires, cancer, diabète, sida, etc.) (**Pincemail et al., 2001**).

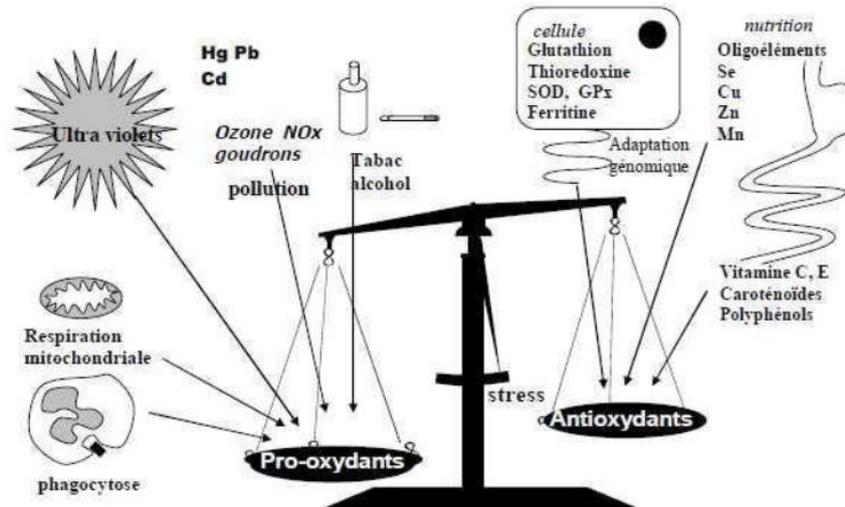


Figure 4 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et anti oxydant (Favier, 2006).

Tableau 3 : Sources de stress oxydant endogène et exogène (Haleng et al., 2007).

Mode de vie	Environnement
<ul style="list-style-type: none"> - Tabagisme - Faible consommation en fruits et légumes - Alcool - Médicaments - Exposition en soleil - Exercice intense/mal géré 	<ul style="list-style-type: none"> - Pollution - Ozone - Amiante - Radiations - Contact avec des substances cancérogènes

II.2. Définition et classification des antioxydants

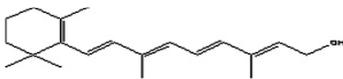
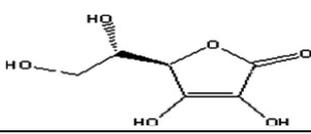
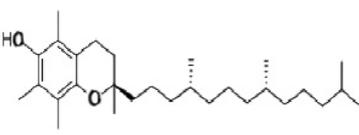
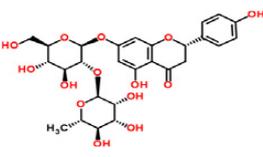
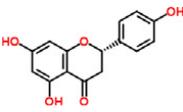
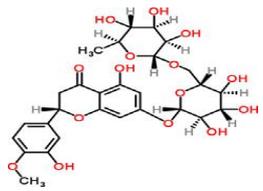
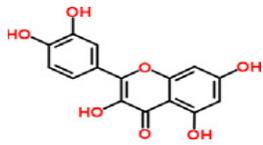
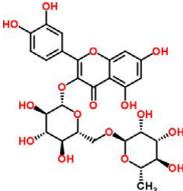
Les antioxydants peuvent être définis comme des composés qui agissent dans les cellules en tant que couples redox pour piéger les ROS et maintenir les cellules dans un état redox plus réduit (Henriksen, 2019). On distingue :

II.2.1. Les antioxydants naturels

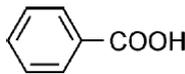
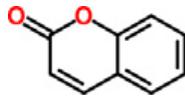
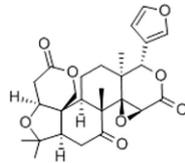
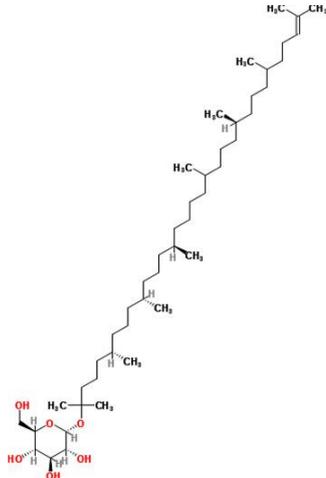
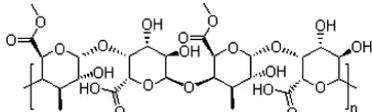
Ils incluent des espèces chimiques différentes (composés phénoliques, vitamines...etc) qui sont d'origine végétale pour la plupart (Berger, 2005) (voir tableau 4).

Synthèse bibliographique

Tableau 4 : Les différents antioxydants naturels (Zou et al., 2016).

Nom du composé		Structure	Activité antioxydante	
Vitamines	A		-Réagir avec les radicaux libres notamment 1O_2 .	
	C		-Piégeage d'une variété d'espèces de ROS. -Élimine 1O_2 .	
	E		-Retenir les radicaux libres. -Effet synergique avec le sélénium pour protéger les mitochondries contre les dommages causés par les radicaux libres et leurs membranes contre les dommages dus à la peroxydation.	
Composé phénolique	Flavonoïdes	naringine		-Diminuer la quantité de la formation de peroxyde <i>in vivo</i> .
		naringénine		-Anti-oxydation lipidique <i>in vitro</i> . -Élimine directement les ROS.
		hesperidine		
		quarcétine		
		Rutine		

Synthèse bibliographique

	Acide phénolique			-L'effet de la substitution en ortho sur le cycle benzène.
	Coumarine			-Elles diminuent directement la production cellulaire de radicaux libre par l'inhibition du XO.
terpenoïde	limonoïde			-Induisent l'apoptose et les radicaux libres. -Les différents limonoïdes ont une capacité antioxydante variable.
	Caroténoïde			-Neutralisation du O ₂ .
Elément minéral	Sélénium		Se=Se	-Effet synergique avec le Ve pour protéger les mitochondries contre les dommages causée par peroxydation.
	Zinc		Zn	
	Cuivre		Cu	
	Fer		Fe	
Pectine				-Elimination des radicaux libres.

II.2.2. Les antioxydants synthétiques

Ce sont des composés synthétisés chimiquement car ils n'existent pas dans la nature. Ajoutés aux aliments en tant que conservateurs afin de prévenir l'oxydation des lipides, et stabilisent les graisses et les huiles. Parmi les antioxydants synthétiques les plus connus et les plus couramment utilisés sont : BHT, BHA, TBHQ (**figure 5**).

Le BHT peut être promoteur de tumeurs lorsqu'il est consommé à des niveaux élevés, alors que le BHA peut être un inhibiteur important de la carcinogenèse (Atta et al., 2017).

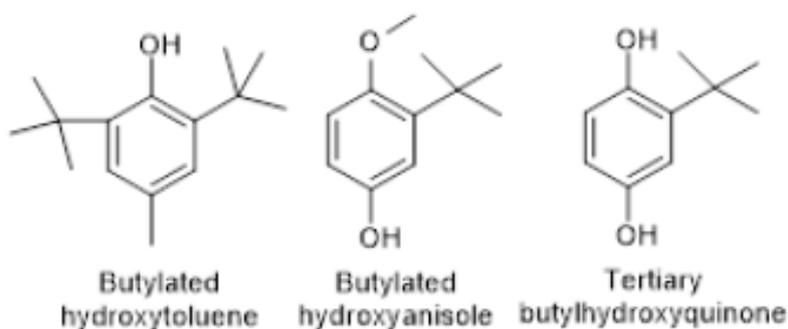


Figure 5 : Structure de quelque antioxydants synthétiques (BHT) (BHA) (TBHQ) (Atta et al., 2017).

II.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

De nos jours, la capacité antioxydante des végétaux a été comme indicateur de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (Wu et al., 2013). Il existe une grande variété de méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante pour les plantes qui ont été rapportés dans la littérature (Zou et al., 2016).

○ Méthode du paramètre antioxydant de piégeage des radicaux totaux (TRAP)

Cette méthode est basée sur la protection apportée par les antioxydants sur la dégradation de la fluorescence de la R-phycoérythrine R-PE lors d'une réaction de peroxydation contrôlée. La fluorescence de la R-phycoérythrine (R-PE) lors d'une réaction de la peroxydation contrôlée. La fluorescence de la R-phycoérythrine est désactivée par l'ABAP (chlorhydrate de 2,2-azobis(2-amidino-propane) en tant que générateur de radicaux (Alam et al., 2013).

○ Dosage du pouvoir réducteur-antioxydant ferrique (FRAP)

Cette méthode est basée sur le principe de l'augmentation de l'absorbance des mélanges réactionnels. Une augmentation de l'absorbance indique une augmentation de l'activité antioxydante. Dans cette méthode, la présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe³⁺/ complexe ferricyanide à la forme ferreuse qui est mesurée à 700nm (Alam et al., 2013 ; Bougandoura et al., 2013).

○ **Activité de récupération DPPH**

La réduction du radical libre DPPH (2,2`-diphényl-1-picrylhydrazyl) par les antioxydants est réalisée par spectrométrie UV-Vis en mesurant la diminution d'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (**Madjdoudja, 2012**). En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2.2 Diphényle 1 picryl-hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2.2 Diphényle 1 picryl-hydrazine de couleur jaune (**Barbarie, 2006**).

II.4. Activité antioxydante des citrus

Les régimes alimentaires riches en fruits et légumes protègent contre diverses maladies, en particulier les maladies cardiovasculaires et certains cancers.

Les agrumes (citrus) sont de riches sources de vitamine C (acide ascorbique), un nutriment essentiel aux propriétés antioxydantes bien connues. Cependant, d'autres études ont démontré que les agrumes contiennent d'autres composés bioactifs, notamment des flavonoïdes, des coumarines, des caroténoïdes et des limonoïdes (**Yu et al., 2005**).

III. Activité anti-inflammatoire

III.1. Généralités sur l'inflammation

L'inflammation fait partie de la réponse immunitaire et peut prévenir l'infection par la production et la synthèse de médiateurs chimiques pro-inflammatoires en réponse à la présence de facteurs endogènes ou exogènes (**Benrouibah et kadja, 2021**). Ce processus de production et de synthèse est bénéfique dans la mesure où il permet de maintenir l'intégrité de l'organisme (**Okombe et Mavungu, 2019**).

Trois séquences d'événements complexes et intriquées composent la réponse inflammatoire : La phase d'initiation qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jour des effecteurs primaires, La phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation des effecteurs secondaires. La phase de résolution et de réparation : restaurer l'intégrité du tissu agressé (**Zerbato, 2010**).

III.2. Facteurs déclenchant l'inflammation

L'inflammation peut être causée par des agressions exogènes ou endogènes comme le montre le schéma ci-dessous (**figure 6**) (**Lacavé-Lapalun et Rakoninindrina, 2013**).

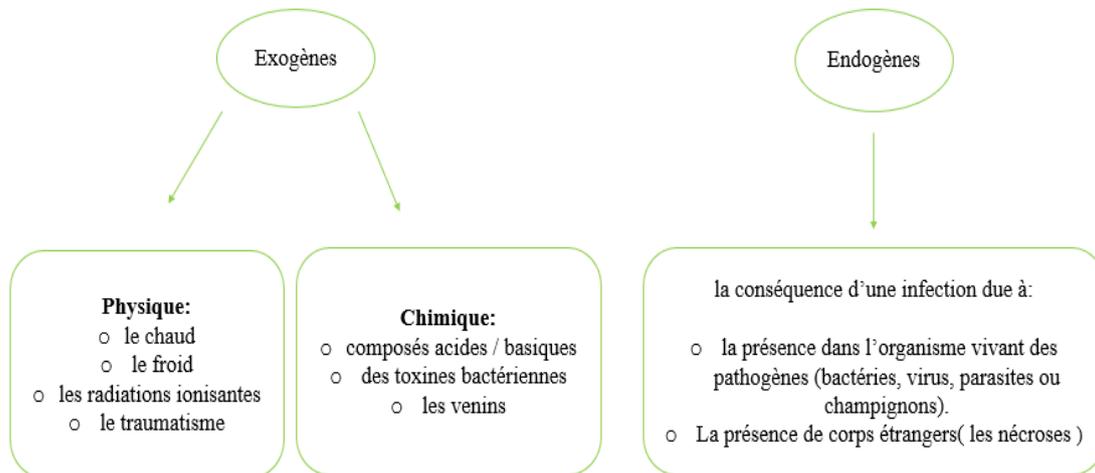


Figure 6 : Facteurs déclenchant l'inflammation (**Lacavé-Lapalun et Rakoninindrina, 2013**).

III.3. Mécanisme de l'inflammation

Le processus inflammatoire s'évolue en trois phases successives (**kernouf, 2019**) (**figure 7**).

- Phase vasculaire : Elle commence par une vasoconstriction de courte durée causée par l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse. L'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux (**Bony, 2010 ; Haioun et Hamoudi, 2015**). La vasoconstriction est suivie d'une vasodilatation des vaisseaux, facilitant ainsi l'afflux des cellules dans le foyer inflammatoire. La diapédèse s'ensuit, après l'adhérence des cellules à la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins (**Hajjaj, 2017**).
- La phase cellulaire : Correspond à l'arrivée au foyer inflammatoire des leucocytes. La libération d'enzymes hydrolytiques des polynucléaires et le pouvoir phagocytaire des macrophages permettent la destruction de l'agent pathogène (**Hajjaj, 2017**).
- La phase de résolution : C'est la phase de l'élimination du pathogène, des neutrophiles morts et des produits de la dégradation tissulaire, donc du retour à l'homéostasie. La phase de cicatrisation et de régénération tissulaire douloureuses est médiée par les médiateurs de fibroblastes et macrophages (**Carip, 2010 ; Mebirouk, 2017**).

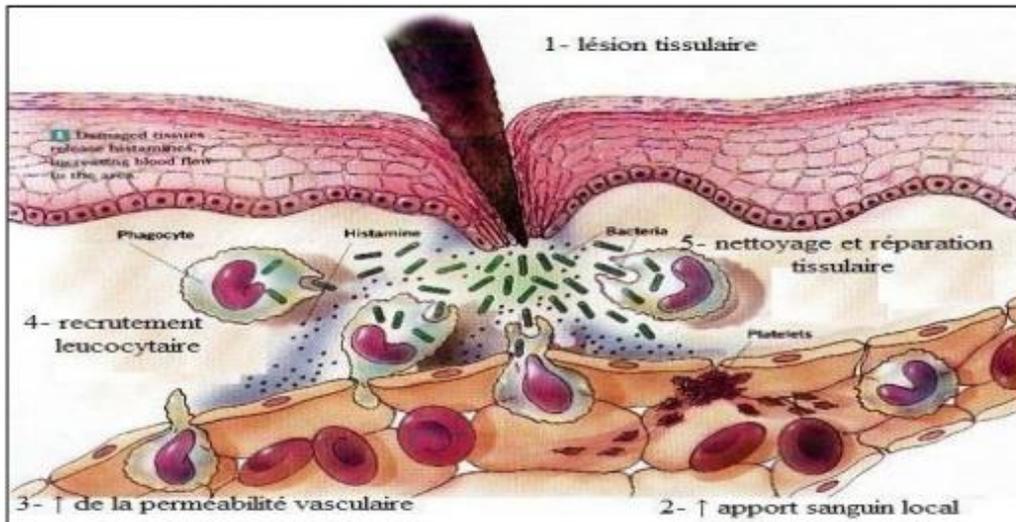


Figure 7 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire (Benrouibah et Kadja, 2021).

III.4. Exemples des cellules et médiateurs inflammatoire

La réaction inflammatoire fait intervenir plusieurs types cellulaires représenté dans la figure suivante (figure 8).

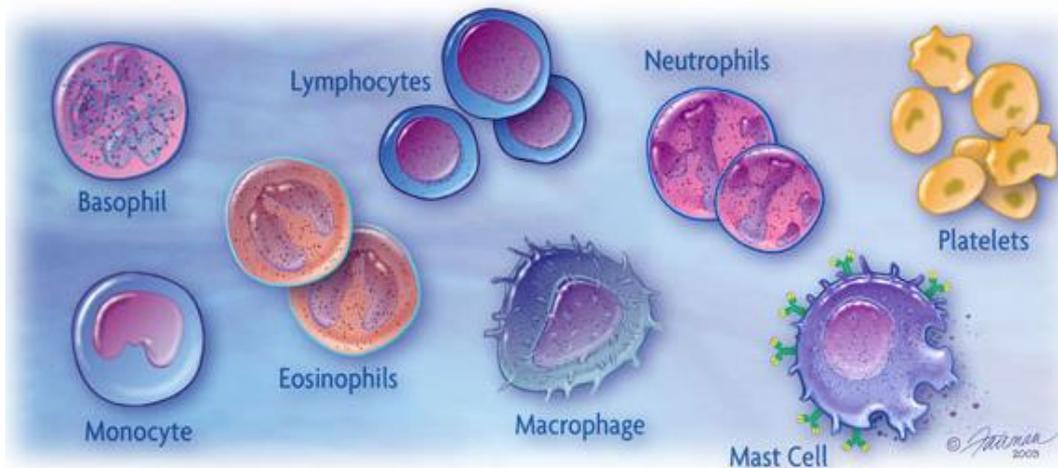


Figure 8 : Les différentes cellules impliquées dans la réaction de l'inflammation (Immune cells, s.d.).

Le processus inflammatoire implique une diversité de molécules appelée médiateurs inflammatoires (Diallo, 2019). Les changements locaux qui surviennent au niveau du site inflammatoire sont le résultat de la formation et/ou la libération séquentielle de médiateurs pro et anti-inflammatoires de nature divers (Meziti, 2018). Parmi elles, on peut citer : amine (histamine et sérotonine), médiateurs lipidiques (prostaglandines et leucotriènes), et des

cytokines de nature peptidique, protéique ou glycoprotéique, l'oxyde nitrique, et même des radicaux libres oxygénés (**Botting et Botting, 2000 ; Diallo, 2019**).

III.5. Types d'anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont définis comme étant des substances qui agissent sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogène, en bloquant la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (comme les prostaglandines) et donc diminuent la sensation de douleur mais aussi l'inflammation (**Hajjaj, 2017 ; Orliaguet et al., 2013**). Les anti-inflammatoires sont utilisées aussi lorsque la réaction inflammatoire se prolonge de façon anormale (inflammation chronique) et entraîne des dommages aux tissus. Ces molécules sont classées en anti-inflammatoires stéroïdiens (cortisone et dérivés), anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et anti-inflammatoires naturels (**Diallo, 2019**).

III.5.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien (**Dahmani, 2019**). En bref, les glucocorticoïdes se fixent sur le promoteur des gènes des médiateurs pro-inflammatoires et bloquent leur action (**Roquilly et Asehnoune, 2019 ; Diallo, 2019**). Il est à noter que l'utilisation de ces corticostéroïdes a des inconvénients. Ils sont bien connus pour provoquer l'hyperglycémie, une sensibilité accrue aux infections et des troubles psychiatriques (**Capet et al., 2001 ; Mebirouk, 2017 ; Diallo, 2019**).

III.5.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens constituent une classe thérapeutique de médicaments couramment utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et antalgiques et anti-agrégants plaquettaires pour certains (**Dahmani, 2019 ; Annick, 2018**). C'est une catégorie de médicaments renfermant des nombreuses molécules telles que le diclofénac, l'ibuprofène, l'aspirine et l'indométacine (**Acer et al., 2019 ; Hassan et al., 2019 ; Katsinelos et al., 2019**). Leur mode d'action repose en grande partie sur l'inhibition compétitive, réversible ou non, de la cyclooxygénase 1 et/ou 2, enzyme qui permet la production de prostaglandine à partir de l'acide arachidonique. Cette propriété commune à tous les AINS conduit à une diminution de la production des prostaglandines (notamment la PGE2 et la PGI2), des prostacylines et des thromboxanes,

Synthèse bibliographique

importants médiateurs de l'inflammation (Grandin, 2013 ; Katsinelos et al., 2019). Malheureusement, ils sont également associés à de nombreux effets délétères car leur utilisation prolongée provoque des troubles gastro-intestinaux (comme les saignements intestinaux) et le dysfonctionnement plaquettaire (Mebirouk, 2017 ; Capet et al., 2001 ; Orliaguet et al., 2013). D'autres effets secondaires comme l'hypertension associée au dysfonctionnement rénal ont été également mentionnés (Diallo, 2019).

III.5.3. Les anti-inflammatoires d'origine végétal

Les composés phytochimiques issus du règne végétal et fongique sont diversifiés et possèdent un large éventail d'activités biologiques grâce à la teneur en métabolites secondaires (Dhingra et al., 2018). Certains parmi eux, possèdent une activité anti-inflammatoire et ont pour cibles particulières la COX-1 et -2, les lipoxygénases (LOX), le NO, la phospholipase A2 (PLA2), etc. Ces molécules présentent un intérêt grandissant car elles offrent des avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques, avec moins d'effets secondaires (Maroon et al., 2010 ; Mebirouk, 2017 ; Dhingra et al., 2018). Quelques exemples de plantes douées d'activités anti-inflammatoires sont présentés dans le tableau ci-dessous (tableau 5).

Tableau 5 : Exemples de plantes douées de l'activité anti-inflammatoire (Mansour, 2015 ; Erdemoglu et al., 2003 ; Setty et Sigal, 2005 ; Heymonet, 2013).

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Nom commun	Utilisation
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Gingembre	Arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
<i>Helleborus orientalis</i>	Ranunculaceae	Racines	Lenten-rose	Oedemes, douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis R.</i>	Rosaceae	Feuilles	Laurier	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Curcuma	Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pédaliacées	Tubercule	Griffe du diable	Arthrose, lombalgie, névralgie, maux de tête, fièvre

Synthèse bibliographique

<i>Juglansregia L.</i>	Juglandaceae	Feuilles, fruits	Noyer commun	Douleurs rhumatismales, fièvre, Eczéma, Malaria
<i>Maytenus senegalensis</i>	Celastraceae	Feuilles, l'écorce et les racines	Maytenus	Analgésique et anti-inflammatoire
<i>Zygophyllum gaetulum</i>	Zygophyllaceae	La partie aérienne	La zygophylle	Anti-inflammatoire, antidiabétique, antispasmodique et anti- diarrhéique

III.6. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* peut être évaluée en utilisant plusieurs méthodes : l'inhibition de la dénaturation des protéines et la stabilisation de la membrane des érythrocytes sont les tests les plus couramment utilisés, ils restent des tests de bon choix (**Benbalia et al., 2020**).

III.7. Activité anti-inflammatoire des Citrus

Sur le marché, la plupart des médicaments anti inflammatoires sont chimiquement fabriqués, bien que ces médicaments soient assez puissants, l'administration à long terme entraîne des effets secondaires comme l'intolérance gastrique (**Ndoye Foe et al., 2016**). C'est dans cette lumière que les remèdes naturels à partir des végétaux, tel que le genre citrus qui ont un effet anti inflammatoire similaire à celui des médicaments de synthèses avec très peu d'effets secondaires (**Ouali et Saadouni, 2016**), c'est leurs teneurs en flavonoïdes qui a un impact sur les cellules endothéliales sanguines et microvasculaires (**Mendes Feitosa et al., 2017**). L'efficacité et la sécurité prouvées sont recherchées comme substituts pour les traitements chimiques (**Ouali et Saadouni, 2016**). Par exemple en médecine traditionnelle chinoise et en Corée, l'écorce séchée des Citrus a été largement utilisé pendant des siècles comme remède pour traiter l'indigestion et lutter contre les syndromes inflammatoires des voies respiratoires tels que l'asthme et la bronchite (**Su-Chen et Chih-Cheng, 2008**).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel végétal

I.1. Collecte et préparation des échantillons

La mandarine a été récoltée d'une manière aléatoire à partir d'une exploitation agrumicole au niveau de la wilaya d'Ain Temouchent durant le mois de décembre 2021. Les fruits récoltés sont murs et sains, les parties végétales utilisées pour cette étude sont : les écorces, les feuilles et les pépins.

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

Les fruits sont bien lavés à l'eau du robinet afin d'éliminer les traces de poussières puis séchées à l'air libre et coupées ensuite pour séparer les parties des fruits. Les feuilles, les pépins et les écorces ont été mis au séchage à l'ombre dans un endroit sec ensuite dans l'étuve à 40°C pendant 3 jours. Les parties séchées ont été broyées finement à l'aide d'un mixeur électrique afin d'obtenir des poudres fines, puis stockées à l'abri de la lumière et de la chaleur jusqu'à leur utilisation (**Figure 9**).



Figure9 : Les échantillons pépins, feuilles et écorces du *Citrus reticulata* après séchage (Photo originale, 2022).

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits bruts

L'extrait méthanolique de notre échantillon a été obtenu par macération. Ce type d'extraction est un simple contact entre le support solide et le solvant.

Matériels et méthodes

10 g de poudre de chaque partie végétale sont ajoutés séparément dans un erlenmeyer contenant 100 ml de méthanol/eau 70% (70 ml méthanol, 30ml eau distillée), le mélange a été maintenu sous agitation pendant 24 h à température ambiante (**figure 10**). Le mélange a été filtré à travers du papier Wattman (opération répétée 2 fois afin d'obtenir plus de 95% de la teneur en composés phénoliques) (**voir figure 11 et 12**). Le méthanol ensuite est éliminé du filtrat par évaporation à 45-50°C en utilisant un évaporateur sous vide à 40-50°C (**voir figure 13**) puis séché à 40°C dans l'étuve. Enfin l'extrait sec a été récupéré (**figure 14**), pesé et conservé à 4°C jusqu'à son utilisation.



Figure 10 : Macération sur agitateur magnétique (**Photo original, 2022**).



Figure 11 : Solutions après 1ère filtration (feuilles, pépins, écorces) (**Photo original, 2022**).



Figure 12 : Evaporateur rotatif sous vide (Photo original, 2022).



Figure 13 : (feuilles, pépins, écorces) après séchage dans l'étuve (Photo original, 2022).

II.2. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre le poids d'extraction obtenue après l'extraction et le poids de la poudre utilisé.

Il est calculé par la formule suivante :

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

- **Rdt** : Rendement (en %).
- **m** : Quantité d'extrait obtenue après l'évaporation (g).
- **m₀** : Masse de la poudre végétale utilisée (g).

II.3. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* peut être évaluée en utilisant plusieurs méthodes : l'inhibition de la dénaturation des protéines et la stabilisation de la membrane des érythrocytes sont les tests les plus couramment utilisés, ils restent des tests de bon choix (**Benbalia et al., 2020**).

II.3.1. Test d'inhibition de la dénaturation des protéines (albumine)

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits aqueux hydro-méthanolique de la plante étudiée a été évaluée aussi selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines décrite par **Kar et al., (2012)**, avec quelques modifications.

La méthode consiste à préparer quatre solutions :

- **La solution d'essai** est composée de 450µl de la solution aqueuse d'albumine humaine à 5% et 500µl des extraits de la plante avec différentes concentrations (100,300, 500µg/ml).
- **La solution contrôle test** est composée de 450µl de la solution aqueuse de l'albumine humaine 5% et 500µl ml d'eau distillé.
- **La solution contrôle produit** composé de 450µl d'eau distillé et 500 µl ml des différents extraits de la plante avec des concentrations variées (100, 300, 500 µg/ml).
- **La solution standard** est composée de 450µl de la solution aqueuse de l'albumine humaine 5%et 500µl ml de la solution standard avec des concentrations variés (100, 300,500µg/ml).

Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 20 min, ensuite la température a été augmentée jusqu'à 57 °C pendant 3 min. Après refroidissement des tubes ; 2,5 ml de la solution buffer phosphate saline (pH 6,3) a été ajouté aux solutions (**kar et al., 2012**).

L'absorbance a mesurée par spectrophotomètre UV-visible à 255 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines été calculée comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - ((\text{Abs Solution test} - \text{Abs contrôle produit}) / (\text{Abs contrôle test})) \times 100$$

II.3.2. Test d'hémolyse ou de stabilité membranaire

La capacité des extraits du *Citrus reticulata* à protéger la membrane des érythrocytes humains contre l'hémolyse induite par le milieu hypotonique est évaluée selon **Habibur Rahman et ses collaborateurs (2015)** avec quelque modification.

➤ Préparation de la suspension érythrocytaire

- Le sang a été recueillie auprès d'un volontaire qui n'avait pas pris des anti-inflammatoires pendant deux semaines avant le prélèvement.
- Les échantillons de sang frais (environ 6 ml) ont été récupérés dans des tubes héparinés et centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min. Le surnageant a été éliminé par la suite, et le culot de globules rouges a été lavé trois fois avec de l'eau physiologique, jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair, en centrifugeant à chaque fois à la vitesse de 3000 rpm, pendant 5 min. Le volume des globules rouges a été mesuré afin de préparer une suspension de 10% (v/v) de globules rouges humains, avec de la solution tampon (PBS).

➤ Préparation des extraits végétaux

Différentes concentrations d'extraits végétaux (100µg/ml, 300µg/ml, 500 µg/ml,) ont été solubilisées dans de l'eau physiologique.

➤ Evaluation de l'effet des extraits de *Citrus reticulata* sur la stabilisation de la membrane des globules rouges

Dans des tubes à hémolyse, 1 ml de chaque extrait des différentes parties du *Citrus reticulata*, 1 ml du tampon phosphate (pH 7,4) et 2 ml de la solution hyposaline (NaCl à 0,36%) ont été mélangés et incubés à 37°C pendant 20 min. Par la suite, un volume de 0,5 ml de la suspension des érythrocytes (10 %) a été rajouté dans chaque tube (**figure 13**), enchainé d'une incubation, à 37°C pendant 30 min, ensuite centrifugés à 3000 rpm pendant 20 min (**voir figure 14**). La lecture d'absorbance du surnageant est faite à 560 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre. Le contrôle consiste en un mélange de 2 ml de la solution hyposaline, 2 ml du tampon PBS, 0,5 ml de la suspension de globules rouges et 1 ml d'eau distillé.

L'acide salicylique est utilisé comme molécule de référence (anti-inflammatoire), utilisé dans les mêmes concentrations que l'extrait.

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = [(Ac - At) / Ac] * 100$$

Ac: absorbance de contrôle

At : absorbance de l'échantillon (test)

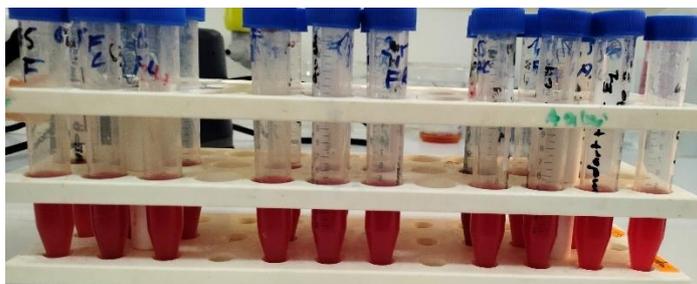


Figure 14 : Echantillons préparés avant centrifugation (photo original, 2022).

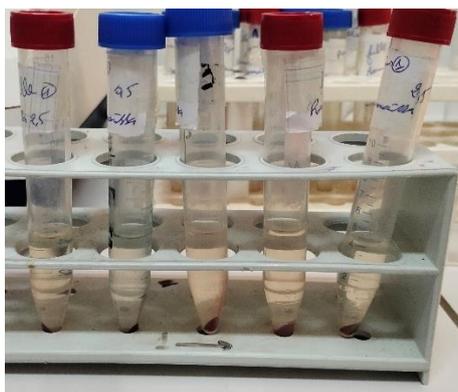


Figure 15 : Echantillons centrifugés (photo original, 2022).

II.4. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

II.4.1. Réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

➤ Principe

Ce test est basé sur la transformation du Fe^{3+} en Fe^{2+} , en présence d'un antioxydant (l'extrait de la plante) qui a le pouvoir de céder des électrons. Cette réaction se manifeste par l'apparition d'une couleur bleu mesurable à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur du composé testé (Benbrinis, 2012).

Matériels et méthodes

Mode opératoire

- Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,075 à 10mg/ml) 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 $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction.
- Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Un aliquote (2,5ml) de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 500 μ l d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ (Chlorure ferrique) à 0,1%.
- 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 qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS) (**Voir figure 15 et 16**).
- Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. L'augmentation de l'absorbance correspond à l'augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé (**Singleton et Rossi, 1965**).

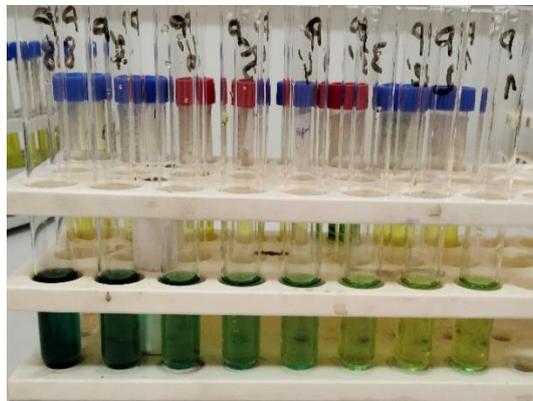


Figure 16 : Echantillons à lire sur spectrophotomètre (**photo original, 2022**).



Figure 17 : Spectrophotomètre en lecture (**photo original, 2022**).

II.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante par l'effet scavenger du radical DPPH

➤ Principe

Le DPPH (diphényl-picryl-hydrayl) est un radical libre stable de couleur violette qui se réduit en 2,2 diphényle-1-picryl hydrazine (DPPH₂), faiblement coloré en jaune par captation d'un hydrogène de l'antioxydant (**voir figure 18**). Les changements de couleurs sont proportionnels à l'activité antioxydante et à la diminution de l'absorbance (**Moon et Shibamoto, 2009**).

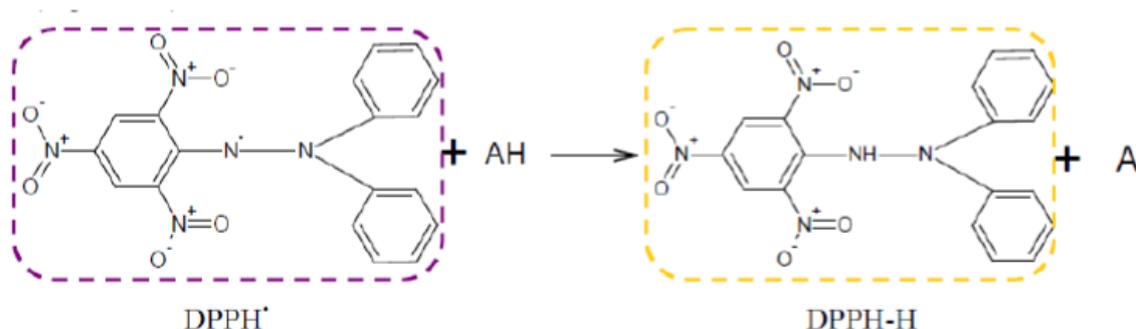


Figure 18 : Réduction du radical DPPH (**Moon et Shibamoto, 2009**).

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants piéger le radical DPPH (**Amarowicz et al., 2004**), par la procédure suivante :

- Un volume de 50µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajoutée à 1950 µl de la solution méthanolique du DPPH (0.02g/l) fraîchement préparée.
- En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50µl du méthanol avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.
- Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- Des standards de référence (acide ascorbique) ont également été analysés en respectant la même procédure.

Expression des résultats

Le pourcentage d'inhibition (% I) du radical DPPH par les extraits a été calculé comme suit :
Le pourcentage d'inhibition est donné selon la formule suivante : (**Harris et al., 2009**).

$$\text{Activité anti radicalaire \%} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

Matériels et méthodes

AC : absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif).

AE : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire sont exprimés en fonction de la concentration inhibitrice 50 (CI50) qui permet la réduction de 50% du radical DPPH (**Amezouar et al., 2013**).

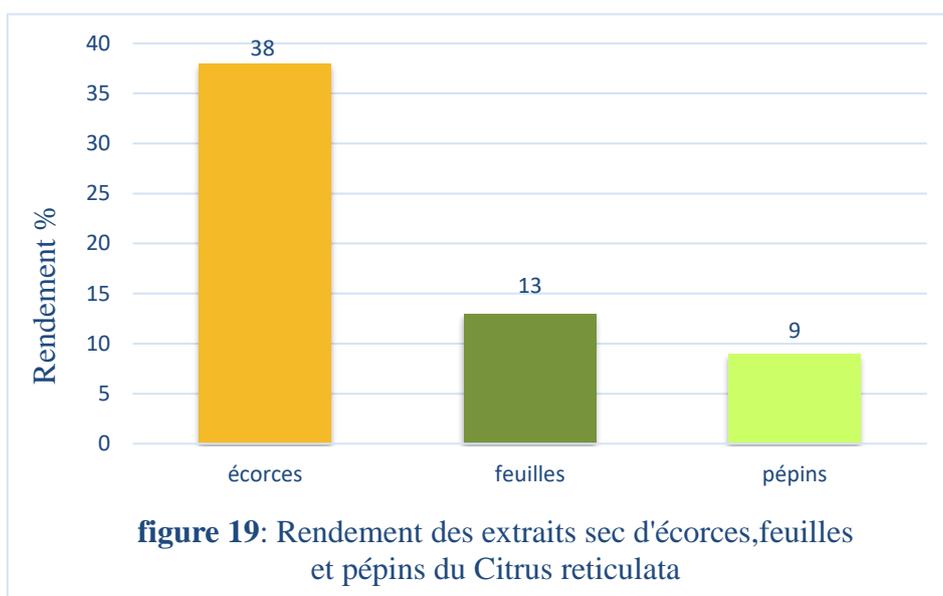
RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

I. Rendement des extraits de *Citrus reticulata*

Les extraits bruts d'écorces, pépins et feuilles ont été extraits par une macération conventionnelle en utilisant comme solvant le méthanol à 70%.

Les résultats de cette extraction ont permis d'obtenir respectivement des taux d'extraction de 38%, 13% et 9% pour les écorces, feuilles et pépins (**figure 19**).



L'examen organoleptique des extraits bruts des différentes parties du *Citrus reticulata*, a donné les résultats suivants, (**tableau 6**). La couleur et l'aspect change d'un extrait à un autre.

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

Les caractères organoleptiques des extraits	Couleur	Aspect
Écorces	Orange clair	Pâteux
Feuilles	Vert foncé	Cristallin
Pépins	Vert clair jaunâtre	Pâteux

D'après les résultats obtenus (**figure 6**), l'extrait brut des écorces représente le rendement le plus élevé estimé à 38%, suivi par l'extrait des feuilles et des pépins 13% et 9% respectivement.

Le taux de rendement de l'extrait des écorces obtenu dans notre travail est largement supérieur à celui obtenu par **Madhuri et ses collaborateurs (2014)** qui ont enregistré des valeurs de

Résultats et discussion

12,35% pour le *Citrus aurantium* et 8% pour *Citrus sinensis*. Ces auteurs ont aussi utilisé le méthanol comme solvant d'extraction.

De même, nos résultats concernant l'écorce du *C. reticulata* reste supérieurs par rapport à ceux rapportés par **Hegazy et Ibrahim, (2012)** sur les écorces du *Citrus sinensis* utilisant aussi le méthanol dans leur extraction estimé à 28,32%.

Le taux de rendement des feuilles de notre plante (13%) est supérieur à celui du *Citrus reticulata blanco* situé en Indonésie (6,3%) rapporté dans l'étude de **Fadlillah et al., (2019)** qui ont utilisé l'éthanol pour extraire les polyphénols.

D'après **Oikeh et al., (2020)** le rendement des pépins du *Citrus sinensis* obtenu par extraction éthanolique correspond à 2,64%. Ce taux reste relativement inférieur à celui de notre étude.

En fait, il existe plusieurs paramètres influençant le rendement d'extraction, à savoir la méthode d'extraction choisie (**Boulilla et al., 2015 ; Marzouki et al., 2009**), des facteurs géographiques, physicochimiques ou biologiques, les types de sols, les facteurs génétiques (**El-Haoud et al., 2018**), ainsi que le type de solvant utilisé, sa nature, et son volume (**Telli et al., 2010**).

D'autres études ont montré que non seulement chaque plante diffère de l'autre par sa composition chimique, mais aussi que la composition des organes de la même plante sont différents, et que chaque composé chimique est extractible par un solvant approprié (**Yousfi et al., 2008**).

II. Activité anti-inflammatoire

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

La dénaturation protéique est un phénomène durant lequel les protéines perdent leur structure tridimensionnelle ou secondaire, suite à leur exposition à la chaleur, à un agent infectieux ou chimique (**Adarsh Verma et al., 2011**). Selon **Rathisre et al., (2013)**, la méthode de la dénaturation protéique est très efficace pour l'évaluation *in vitro* de l'activité anti-inflammatoire des extraits.

La figure 20 et le tableau 1 en annexe représentent les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des écorces, des feuilles et des pépins du *Citrus reticulata* qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de la protéine l'albumine humaine.

Résultats et discussion

Nos résultats ont montré qu'à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$, l'extrait des écorces a enregistré le meilleur pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la protéine estimé à 69,88 % presque similaire à celui de l'anti inflammatoire de référence (l'acide salicylique) (70,03%). Celui de l'extrait des feuilles enregistre le pourcentage le plus bas (18,16%) à cette même concentration.

De même, à la concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$, l'extrait des écorces a enregistré le pourcentage d'inhibition le plus important (76,22%) dépassant légèrement celui de l'acide salicylique (76,08%) ; suivi par l'extrait des pépins (68,01%) et enfin l'extrait des feuilles (29,68%). Le même résultat a été observé à la concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$.

On constate donc, qu'à différentes concentrations (100, 300, 500 $\mu\text{g/ml}$), le plus puissant effet inhibiteur de la dénaturation de l'albumine a été obtenu avec l'extrait d'écorce ensuite les pépins et en dernier l'extrait des feuilles, On peut dire alors que les sous-produits de cette plante sont doués d'activité anti-inflammatoire

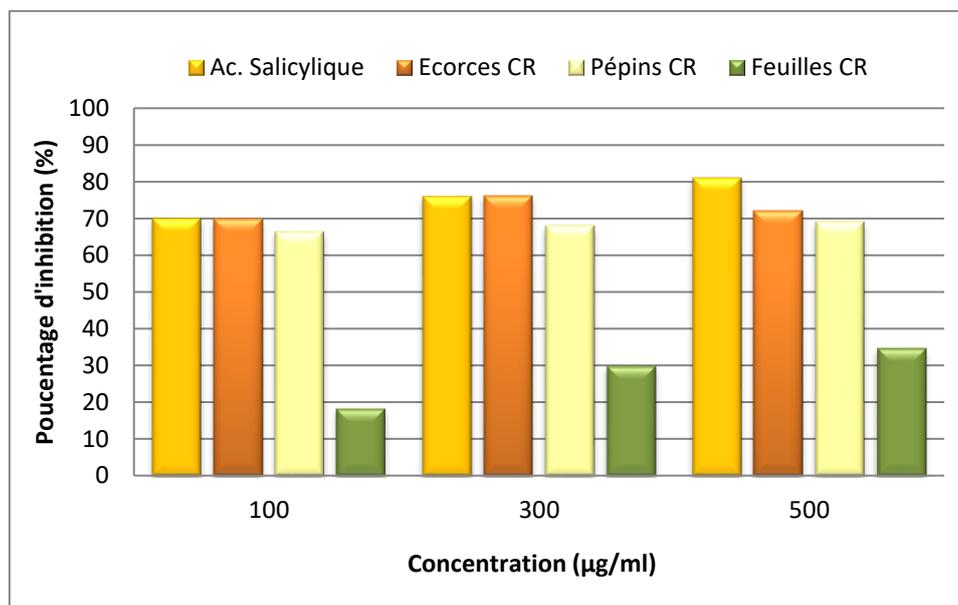


Figure 20 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction des différentes concentrations d'extraits (écorces, pépins, feuilles) de *Citrus reticulata* et de l'acide salicylique.

La dénaturation des protéines tissulaires est bien connue comme étant l'une des conséquences des maladies inflammatoires et arthritiques, aboutissant à la production d'auto-antigènes (Williams et al., 2008). Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à

Résultats et discussion

l'altération des liaisons électrostatiques, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines (**Manvaret Desai, 2014**).

L'activité anti-dénaturante de l'extrait pourrait être due à l'interaction de certains composants avec deux sites (présents au niveau de certaines protéines ex : albumine) de liaisons riches en Tyrosine, Thréonine et Lysine (**Williams et al., 2002**).

Lu et ses collaborateurs ont rapportés que les composants des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle, exercent leurs effets pharmaceutiques grâce à leur capacité de s'associer aux protéines plasmatiques (**Lu et al., 2008**). En effet selon l'étude effectuée par **Dufour et Dangles (2005)** sur l'interaction des flavonoïdes avec l'albumine, cette ci possède une forte affinité pour la quercétine, ce qui pourrait expliquer l'activité protectrice des polyphénols contre la dénaturation thermique de l'albumine. D'autant plus, que plusieurs études ont montré la teneur des Citrus en flavonoïdes (**Bouterfase et al., 2016 ; Rafiq et al., 2016**).

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme la phénylbutazone et l'indométacine n'inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (**Sangeetha et al., 2011**). Plusieurs anti-inflammatoires empêchent la dénaturation d'albumine induite thermiquement traitée par la chaleur à pH physiologique (pH : 6.2 à 6.5) (**Deattu et al., 2012**).

D'après nos résultats, on peut dire que l'extrait des écorces de *Citrus reticulata* pourrait contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. L'activité inhibitrice de la dénaturation de l'albumine est peut-être attribuée à la présence de différents composés bioactifs (métabolites secondaires) possédants plusieurs propriétés biologiques notables qui sont peut-être à l'origine de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait, tels que les polyphénols, flavonoïdes et les tannins dans l'extrait trouvés lors des criblages phytochimiques réalisés auparavant.

Selon **Williams et al., (2008)**, les composés inhibant la dénaturation des protéines avec un pourcentage supérieure à 20% sont considérés comme ayant des propriétés anti-inflammatoires. Dans la présente étude, les trois extraits du *Citrus reticulata* empêchent la dénaturation thermique des protéines, ce qui confirme leur activité anti-inflammatoire.

On peut conclure que *Citrus reticulata* possède un effet anti-inflammatoire marqué et très puissant *in vitro* contre la dénaturation des protéines, et que d'autres recherches approfondies

Résultats et discussion

sont nécessaires pour déterminer les mécanismes et les valeurs médicinales de cette plante en plus de ses actions anti-inflammatoires.

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

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* a été réalisé aussi en utilisant une deuxième méthode de stabilité de la membrane HRBC par hypotonicité induite la lyse membranaire (Desai et al., 2017). Nous avons utilisé l'acide salicylique comme un anti-inflammatoire de référence. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau et la figure ci-dessous (figure 21) (tableau2 en annexe).

Pour des concentrations allant de 100 à 500 $\mu\text{g/ml}$ les extraits (feuilles, pépins, écorces) possèdent une activité anti-inflammatoire, puisque nous avons noté que le pourcentage de stabilisation érythrocytaire se situe entre 30 % et plus de 60%. Celui de l'acide salicylique atteint les 75%

Plus précisément, à la concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$, nous remarquons que l'acide salicylique présente un pourcentage de stabilisation de la membrane des globules rouges plus élevé (74,66%) suivi par l'extrait des écorces (60,86%) ensuite l'extrait de pépins (55,88%) tandis que le pourcentage le plus faible estimé à 36,88 %est observée dans l'extrait des feuilles.

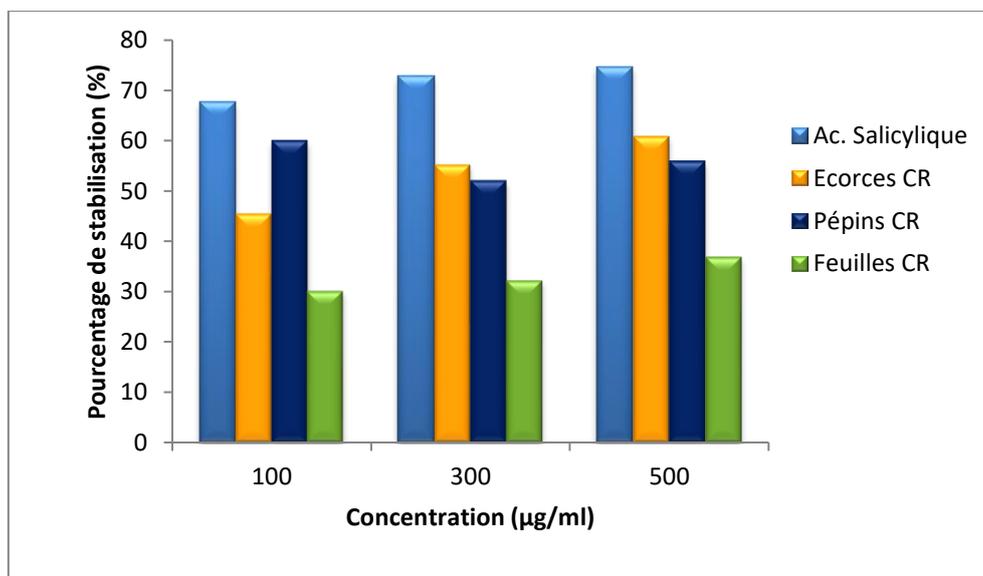


Figure 21 : Pourcentage de stabilisation de membrane des globules rouges en fonctions des différentes concentrations d'extraits (écorces, pépins, feuilles) de *Citrus reticulata* et de l'acide salicylique.

Résultats et discussion

L'étude réalisée par **Malik et al., (2021)** sur l'extrait méthanolique d'écorces des citruses, où ils ont utilisé l'indométacine comme solution standard à une concentration de 200mg/ml, le pourcentage de stabilisation de l'HRBC estimé à 89,67 reste supérieur à nos résultats.

Cependant, une autre étude (**Pallavi et al., 2018**) réalisée en Inde, sur des extraits éthanoliques d'écorces du citrus à la concentration de 25mg/ml, le pourcentage de protection pour l'orange amère (54,43%), lime (53,08%) et pamplemoussier (45,77%) sont inférieurs à nos résultats.

Les différences de résultats peuvent être dus à des variations géographiques ou en raison de la méthodologie suivie au cours de l'expérience *in vitro* (**Bhutia, 2020**).

Selon **Roy et al., (2010)**, les composés phénoliques présents dans les plantes possèdent de puissante activité anti-inflammatoire, ces composés phénoliques tels que les flavonoïdes présents dans les extraits des agrumes agissent par inhibition des médiateurs et jouent probablement un rôle clé dans la prévention de l'inflammation parce que les cytokines inflammatoires induisent la synthèse de la cyclooxygénase -2 et de la prostaglandine E2 qui ont rôle critique dans la pathogénèse des maladies inflammatoires (**Pallavi et al., 2018**).

III. Activité antioxydante

III.1. Méthode de FRAP (*ferric reducing antioxidant power*)

L'activité antioxydante de l'extrait du *Citrus reticulata* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP ; c'est une méthode simple, rapide et reproductible. Elle est universelle et peut être appliquée aussi bien chez les plantes que chez les extraits organiques et aqueux (**Li et al., 2006**). Cette méthode est assistée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} (**Karagozler et al., 2008**).

Nous avons testé les différents extraits d'orange (*Citrus reticulata*) par cette méthode et les valeurs obtenues (**figure 22 et tableau 3 en annexe**) ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait (pépins, feuilles, écorces) ainsi que celui de l'acide ascorbique, pris comme antioxydant de référence.

De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son activité antioxydante (**Rahman et al., 2013**). Selon plusieurs auteurs (**Balasundrum et al., 2006 ; Huda-Faujan et al., 2007**), une augmentation de l'absorbance indique un pouvoir réducteur élevé.

Résultats et discussion

Compte tenu de la courbe ci-dessus, nous classons le pouvoir réducteur du standard et de l'extrait des feuilles, écorces, pépins selon l'ordre suivant : l'acide ascorbique >l'extrait des feuilles >l'extrait des écorces>l'extrait des pépins.

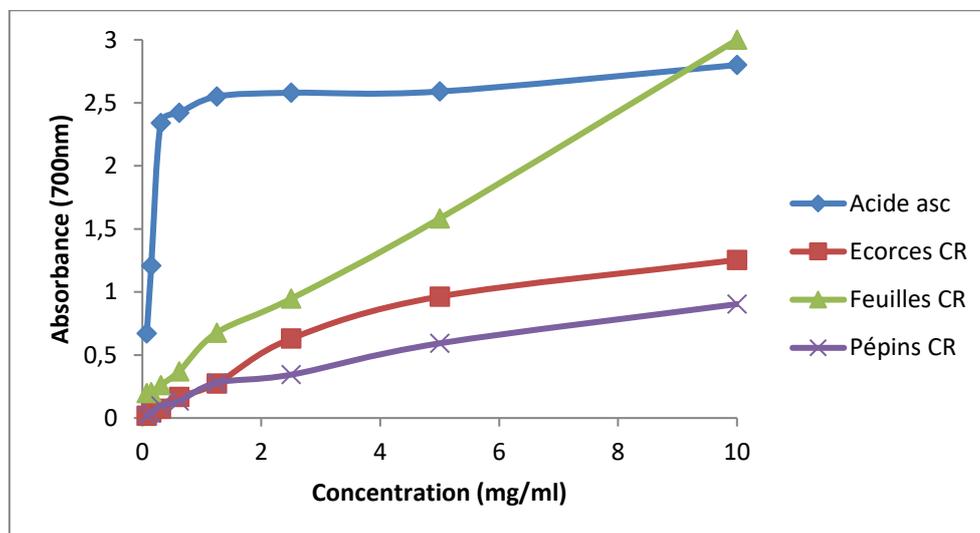


Figure 22 : L'absorbance de membrane du globule rouge en fonction des différentes concentrations d'extraits du *Citrus reticulata* (feuilles, écorces, pépins) et de l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation de la réduction du fer à 700 nm, est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration de l'acide ascorbique et des trois extraits des oranges. En comparant nos extraits à la concentration de 0,62mg/ml (concentration médiane), l'extrait des feuilles a enregistré le meilleur pouvoir réducteur (absorbance estimée à 0,37). Tandis que l'extrait d'écorce (0,17) et celui des pépins (0,13) ont enregistré un degré moindre à réduire le fer. A cette même concentration, le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique reste plus important (2,42).

Les travaux d'**Oikeh et ses collaborateurs (2014)** ont aussi montré un meilleur potentiel réducteur pour l'extrait hydro-éthanolique des écorces par rapport aux pépins du citrus.

D'autres études (**Lagha-Benamrouche et al., 2013**), ont indiqué la présence d'une forte corrélation entre le pouvoir réducteur et les phénols totaux, ils ont aussi noté que le pouvoir réducteur de l'extrait des feuilles de bigarade était plus élevé que celui de l'écorce. Ces mêmes auteurs, ont suggéré que ces composés phénoliques semblent contribuer de manière très importante à réduire la puissance des extraits de la bigarade. En effet, il existe une relation étroite entre les composés phénoliques et les activités antioxydantes (**Bourkhiss et al., 2010**).

III.2. Evaluation de pouvoir anti radicalaire par le DPPH

Le test du DPPH (diphényl-picryl-hydrayl) a été largement utilisé, c'est une technique populaire d'évaluation de l'activité de piégeage des radicaux libres des différents extraits de plantes. Le DPPH est un radical libre stable qui se dissout dans les deux solvants l'éthanol et le méthanol.

La réduction du radical libre est déterminée par la diminution de son absorption à 515 nm lorsque la couleur de la solution d'essai de DPPH change du violet au jaune clair. Le potentiel antioxydant de piégeage des extraits de plantes correspond au degré du changement de couleur (Safdar *et al.*, 2017).

Nous avons évalué l'activité antioxydante des différentes parties du *Citrus reticulata* à savoir les écorces, les feuilles et les pépins par cette méthode de DPPH afin de déterminer l'extrait ou la partie de l'orange la plus active en la comparant avec l'acide ascorbique, utilisé comme molécule de référence.

Les valeurs obtenues (figure 23,24,25,26) ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH dans sa forme non radicalaire. D'après ces courbes, nous pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur d'IC50 de chaque extrait.

Nous remarquons que l'extrait des feuilles présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé estimé à 73%%, suivi par l'extrait des pépins, avec un pourcentage d'inhibition de 65%, ensuite l'écorce 45%, alors que l'acide ascorbique a montré une grande capacité à inhiber le radical DPPH égale à 94%.

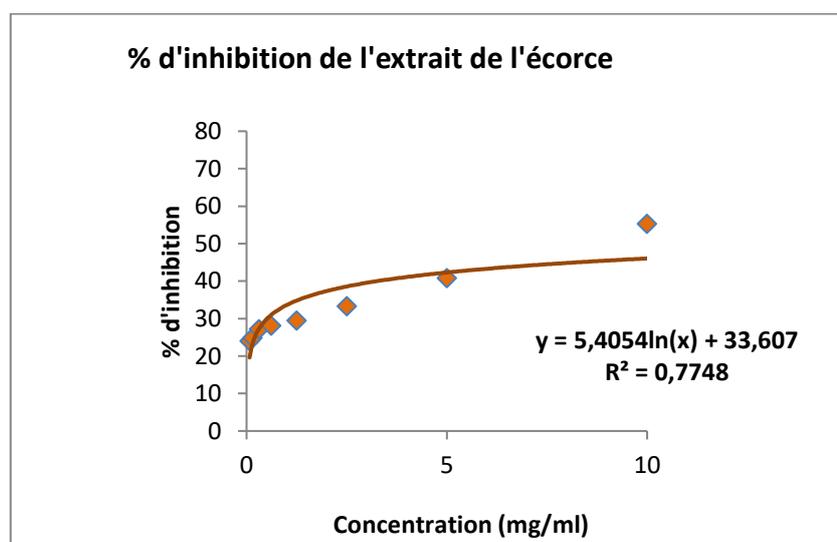


Figure 23 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait brute de l'écorce.

Résultats et discussion

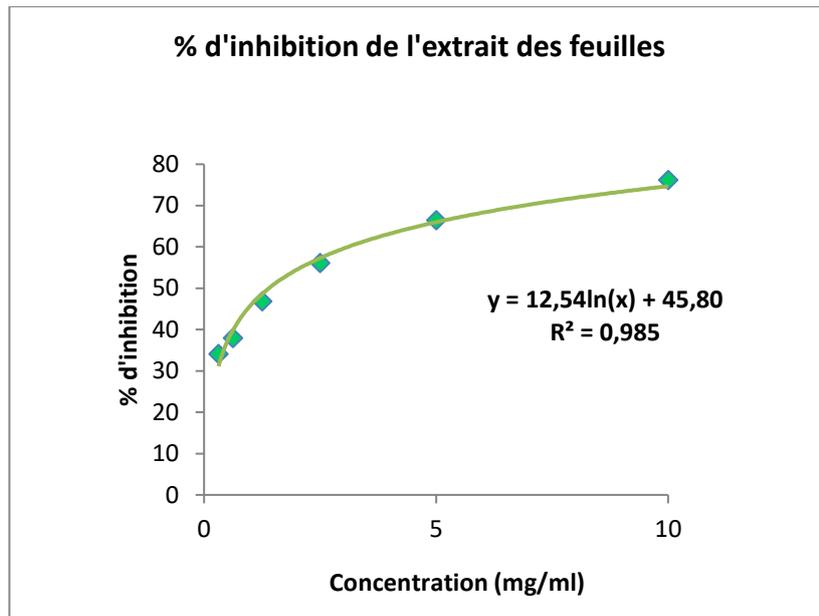


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait brute des feuilles.

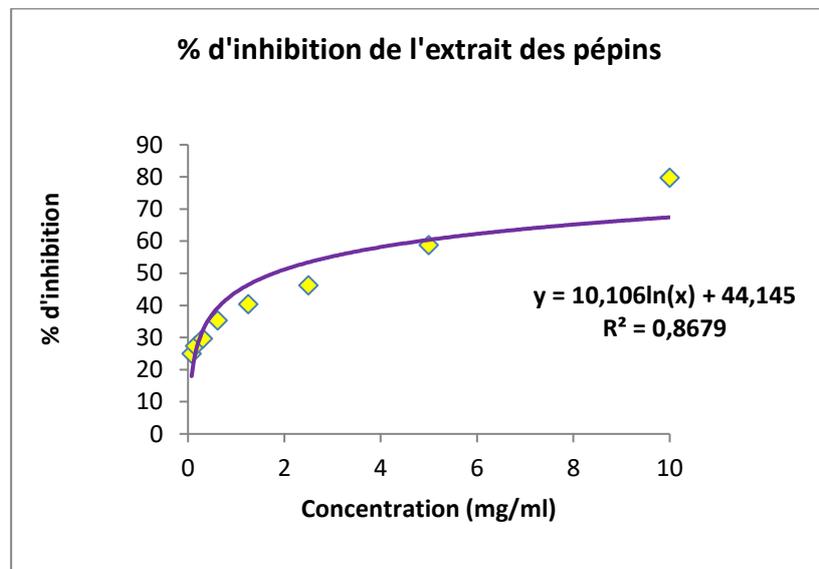


Figure 25 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait brute des pépins.

Résultats et discussion

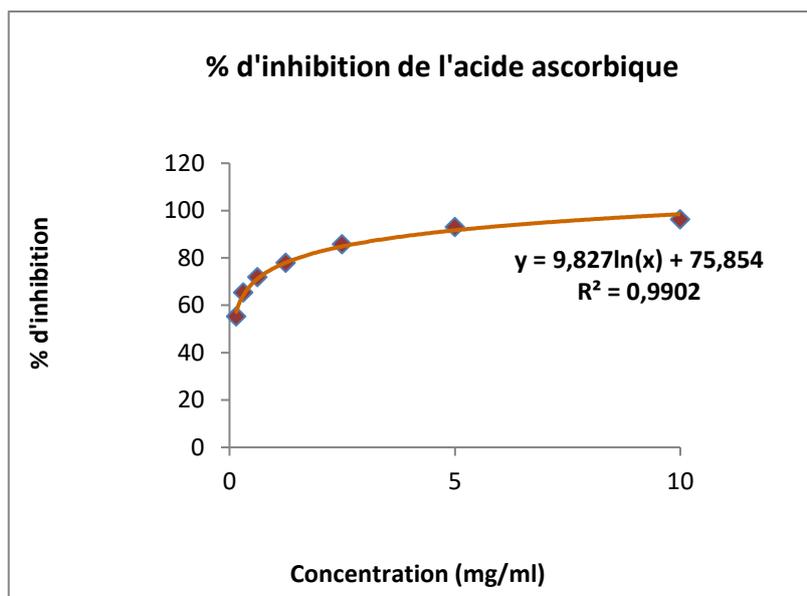


Figure 26 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.

Il semble que l'activité antiradicalaire est fortement dépendante des concentrations des extraits. Plus l'extrait est concentré, plus l'activité est élevée.

D'après l'étude Réalisée par **Tigrine, (2016)**, l'extrait des écorces du citron présente un pourcentage d'inhibition du radical DPPH estimé à 62,5%. En revanche le pourcentage d'inhibition du DPPH enregistré dans l'étude de **Lagha-Benamrouche, (2013)** de l'extrait des feuilles de *Citrus aurantium* est beaucoup plus élevé (99,5%).

L'activité antioxydante a été évaluée en calculant la concentration inhibitrice à 50 % (IC50) qui est la concentration efficace de l'extrait nécessaire pour piéger 50% des radicaux libres DPPH. Plus L'IC50 est faible, plus l'extrait est doté d'un potentiel antioxydant puissant. Les résultats de l'activité antioxydante exprimée en IC50 des différents extraits du *Citrus reticulata* (écorces, feuilles et pépins) ainsi que le standard (acide ascorbique) sont représentés dans le tableau et la figure ci -dessous (figure 27) (tableau 4 en annexe).

Nous remarquons que l'extrait des feuilles présente l'IC50 la plus faible (1,40 mg/ml), suivi par l'extrait des pépins (1,78 mg/ml) ensuite l'extrait des écorces (20,73 mg/ml). En comparant ces valeurs par rapport à l'acide ascorbique (IC50 : 0,072 mg/ml) qui reste l'antioxydant de référence (connu pour sa puissance antioxydante), on peut dire que l'extrait des feuilles possède la plus grande activité antiradicalaire comparativement aux autres extraits testés.

Résultats et discussion

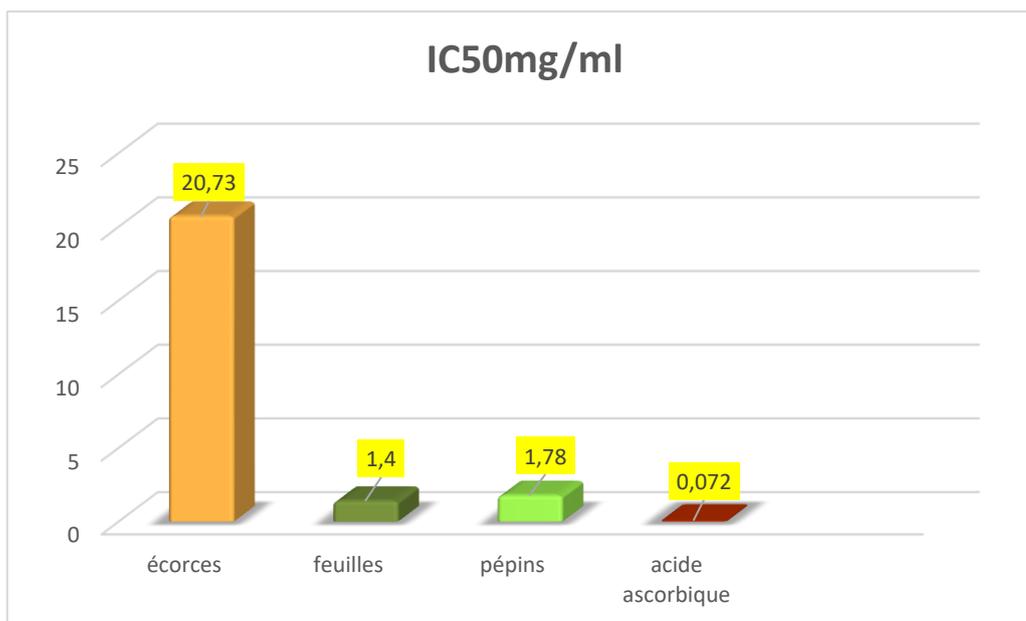


Figure 27 : Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la réduction de 50% du fer des différents extraits en mg/ml.

En comparant nos résultats à d'autres travaux, nous avons remarqué que l'extrait méthanolique des feuilles de *Citrus climentina* présente une valeur d'IC50 estimée à 0,04185 mg/ml (**khettal et al., 2017**), largement inférieur à nos résultats.

D'autres travaux sur les extraits des pépins des *Citrus reticulata blanco* effectués par **Zhang et al., (2018)** ont indiqué un potentiel antioxydant estimé à une moyenne de $1,23 \pm 0,1$ presque similaire à celui trouvé dans notre étude.

Cependant, l'étude réalisée par **Ghasemi et al., (2009)** sur l'extrait des écores *Citrus poonensis* (Ponkan) (d'IC50 : 0,6 mg/ml) ont enregistré des valeurs largement inférieures à celles notées dans notre analyse (20,73 mg/ml).

En générale, le potentiel réducteur des extraits des plantes est dû à la présence de molécules capables de donner des électrons qui peuvent réagir avec les radicaux libres et les transformer en produits stables, parmi ces molécules : les polyphénols (**Reddy et al., 2007**). En outre, la différence de l'activité antioxydante des Citrus peut être attribuée à la présence des flavonoïdes ainsi que d'autres composés phénoliques qui possèdent différents effets antioxydants (**Ouerdane et Ramdani, 2007 ; Doukani et Tabak, 2017**).

Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la carcinogenèse et prolifération cellulaire (**Ghedira, 2005**).

Résultats et discussion

Les flavonoïdes les plus rencontrés dans les agrumes sont les flavonones, concentré surtout dans les écorces (**Tomás-Barberán et al., 2000**) ; ainsi que les naringénines et les hespéridines (**Mouly et al., 1996**) .Les flavones notamment les quercétines (**Ghedira , 2005**) qui, sont présents en faible quantité dans les écorces d'agrumes (**M'hiri , 2015**), et les flavones glycosylés (diosmine) considérés comme ingrédients actifs de certains médicaments (maladie de l'appareil circulatoire) (**Del Rio et al., 2004**).

L'activité antioxydante des extraits végétaux dépend aussi du type et de la polarité des solvants d'extraction, la procédure d'extraction de la pureté des composés actifs, la technique d'essai et le type d'échantillon utilisé (**Ismail et Haber, 2004**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales ont été utilisées dans la médecine traditionnelle durant plusieurs années. Ces plantes restent l'origine des principes actifs connus par leur pouvoir thérapeutique ; c'est pour cette raison qu'elles deviennent un propos de plusieurs recherches, ils constituent toujours des sources essentielles de médicaments.

Dans le but de la valorisation des plantes aromatiques médicinales, *Citrus reticulata* est l'une des espèces d'agrumes les plus connues et les plus consommées en Algérie.

Dans le cadre de notre travail, nous avons évalué les activités biologiques des trois extraits bruts (pépins, écorces et feuilles) du *Citrus reticulata* à savoir l'activité antioxydante et l'activité anti-inflammatoire.

En premier lieu, nous avons déterminé les taux des rendements des extraits bruts obtenus en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction, et qui ont montré une rentabilité importante, commençant par l'extrait d'écorce qui a donné le rendement le plus élevé (38%) ensuite celui des feuilles (13%) et enfin l'extrait des pépins (9%).

Nous avons ensuite évalué l'activité anti-inflammatoire des trois extraits du *Citrus reticulata* qui a révélé qu'à différentes concentrations (100, 300, 500 µg/ml), le plus puissant effet inhibiteur de la dénaturation de l'albumine et de la stabilisation érythrocytaire a été obtenu avec l'extrait d'écorce suivi par les pépins et les feuilles. De même, à la concentration de 500µg/ml, nous avons noté que le pourcentage de stabilisation de la membrane des globules rouges le plus élevé a été enregistré au niveau de l'extrait des écorces (60,86%) ensuite l'extrait de pépins (55,88%) tandis que le pourcentage le plus faible estimé à 36,88 % a été observée dans l'extrait des feuilles.

Cependant l'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits réalisés par la détermination de leur pouvoir de piégeage du radical du DPPH et celle du pouvoir réducteur (FRAP), a révélé que l'extrait des feuilles du *Citrus reticulata* possédait la meilleure activité antioxydante.

Par conséquent, on peut dire que les différentes parties du *Citrus reticulata* sont douées d'activités, mais différentes puisque l'extrait d'écorces était plus doué pour son activité anti-inflammatoire et c'est celui des feuilles qui a présenté la meilleure activité antioxydante. Ces résultats sont probablement liés à la composition de chacun de ces extraits.

Conclusion et perspectives

On peut conclure donc, que les sous-produits du *Citrus reticulata*, considérés comme déchets, présentent un potentiel important autant qu'agents anti-inflammatoire (l'extrait des écorces) et antioxydant (l'extrait des feuilles), grâce à la présence de composés bioactifs probablement responsables de ces activités biologiques, et peuvent donc être utilisés comme produits nutraceutiques. Ce qui nous pousse à vouloir approfondir plus cette investigation pour mieux connaître ces molécules bioactives, et pourquoi pas valoriser d'autres produits jetés par les industries de transformation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Acer, E., Kaya Erdogan, H., Yüksel Çanakçı, N., & Saracoglu, Z. N. (2019). The effect of omalizumab on hematological and inflammatory parameters in patients with chronic spontaneous urticaria. *Cutaneous and ocular toxicology*, 38(1), 5-8.
- Adarsh Verma, M., Ajay Kumar, P., Kavitha, D., & Anurag, K. B. (2011). Anti-denaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in-vitro. *Int. J. Pharm. Bio. Sci*, 2, 1-6.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*, 84(4), 551-562.
- Annick, A.A. (2018). Evaluation des activités anti-inflammatoire et antioxydante de l'extrait hydro-éthanolique de l'écorce de racines de *Dichrostachys cinerea* L. Wight et Arn. (Fabaceae). Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Félix Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire. P : 8-10

B

- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Barbarie, D. (2006). Activité anti radicalaire d'extrait de jus de fruit du figuer. *Lebanese Science Journal*, 7(1), 3.
- Benrouibah, N., Kadja, N. (2021). L'inflammation et les maladies inflammatoires (Doctoral dissertation, university center of abdalhafid boussouf-MILA).
- Bensalem, O., Horchi, D. (2021). Contribution à l'étude de la production de cellulase levurienne par fermentation en milieu solide à base de déchets d'agrumes. (Mémoire de Master en Biochimie, Université des Frères Mentouri, Constantine1).
- Bhutia, S. (2020). Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of *citrus macroptera* montr. *Evaluation*, 13(8).
- Boudries, H., Madani, K., Touati, N., Souagui, S., Medouni, S., Chibane, M. (2012). Activités antioxydantes de la pulpe, teneur en minéraux et propriétés nutritionnelles du jus des cultivars algériens de clémentine et de mandarine. *Journal africain de biotechnologie*, 11 (18), 4285-4267.
- Boulila, A., Hassen, I., Haouari, L., Mejri, F., Amor, I. B., Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Industrial Crops and Products*, 74, 485-493.
- Bourkhiss, M. B., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., Satrani, B. (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société royale des sciences de Liège*.
- Bouterfas, K., Mehdadi, Z., Elaoufi, M. M., Latreche, A., Benchiha, W. (2016, November). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 74, No. 6, pp. 453-462). Elsevier Masson.

Références bibliographiques

- Brixi Gormat N. (2017) Activités biologiques de l'huile de pépins de bigarade (*Citrus aurantium*) chez le rat Wistar soumis à un régime supplémenté en cholestérol (thèse de doctorat). Université Abou-Bekr Belkaid.

C

- Capet, C., Bentot, C., Druesne, L., Chassagne, P. H., & Doucet, J. (2001). Les effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez le sujet âgé. *La Revue de gériatrie*, 26(5), 379-384.
- Carip, C. (2010). Biologie appliquée à la santé. 2ème édition, collection BTS économie sociale et familiale. *Lavoisier, paris, France*, 313-315.

D

- Dahmani M.M. (2019). Evaluation De L'activité Biologique Des Polyphénols De *CarthamusCaeruleus* L (asteraceae). (Thèse de doctorat). Université M'hamed Bougara-Boumardes.
- Deattu, N., Narayanan, N., Suseela, L. (2012). Evaluation of Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Polyherbal Extract by In Vitro Methods. *Res. J. Pharm. Bio. Chemical. Sci*, 3(4), 727-732.
- Del Río, J. A., Fuster, M. D., Gómez, P., Porras, I., García-Lidón, A., Ortuño, A. (2004). Citrus limon: A source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food chemistry*, 84(3), 457-461.
- Desai, S., Desai, A., Kanzaria, S., Mishra, P., Meshram, D. B. In Vitro Evaluation of anti-Inflammatory and antiarthritic activity of citrus limetta peel.
- Desmier, T. (2016). *Les antioxydants de nos jours : définition et applications* (Doctoral dissertation).
- Dhingra, A. K., Chopra, B., Bonthagarala, B. (2018). Natural anti-inflammatory agents: recent Progress and Future Perspectives. *Ann. Pharmacol. Pharm*, 3(5), 1158.
- Diallo, I. (2019). Potentiels anti-oxydants et anti-inflammatoires de sporophores de *Lentinula edodes* (Shiitake) sous différentes conditions de culture (Doctoral dissertation, Université Montpellier).
- Diankov, S., Karsheva, M., Hinkov, I. (2011). Extraction of natural antioxidants from lemon peels. Kinetics and antioxidant capacity. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46(3), 315-319.
- Dufour, C., & Dangles, O. (2005). Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects*, 1721(1-3), 164-173.

E

- E. Tripoli, M. L. Guardia, S. Giammanco, D. D. Majo and M. Giammanco. (2007). "Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A Review," *Food Chemistry*, 104(2), 466-479. DOI : 10.1016/j.foodchem.2006.11.054

Références bibliographiques

- El-Haoud, H., Boufellous, M., Berrani, A., Tazougart, H., Bengueddour, R. (2018). Screening phytochimique D'une plante medicinale: mentha spicata L. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 7, 226-233.
- Embeya, V. O., Mavungu, G. N. (2019). Evaluation de l'activité antipyrétique, analgésique et anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de Vitex congolensis De Wild. & T. Durand. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(7), 3066-3078.
- Erdemoglu, N., Küpeli, E., Yeşilada, E. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 89(1), 123-129.

F

- Fadhlillah, FM, Oktaviani, W., Mariani, R. (2019, décembre). Activité antioxydante de l'extrait d'éthanol, de la fraction n-hexane, de la fraction acétate d'éthyle et de la fraction eau des feuilles d'oranger Garut (*Citrus reticulata* Blanco). Dans *Journal of Physics:Conference Series* (Vol. 1402, No. 5, p. 055083). Édition IOP.
- FAO (2012). FAOSTAT : <http://faostat3.fao.org/home/E>.
- Favier, A. (2006, November). Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396). Elsevier Masson.

G

- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ebrahim zadeh, MA (2009). Activité antioxydante, teneur en phénols et flavonoïdes des pelures et tissus de 13 espèces d'agrumes. *Pak J Pharmsei*, 22 (3), 277-281.
- Ghedira, K. (2005). Flavonoids: structure, biological activities, prophylactic function and therapeutic uses. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- Grandin, M. (2013). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne. Document étayé par une analyse d'ordonnances d'une pharmacie rurale.

H

- Habibur Rahman, M., Eswaraiah, 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, 115-21.
- Haidari, F., Mohammad shahi, M., Zarei, M., & Fathi, M. (2019). Protective effect of citrus lemon on inflammation and adipokine levels in acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55.
- Haioun A et Hamoudi F. (2015). Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne Anethium graveolens et leur effet cardioprotecteur contre la toxicité de la doxorubicine. (Mémoire de Master). Université des Frères Mentouri Constantine.

Références bibliographiques

- Hajjaj, G. (2017). Screening phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *matricaria chamomilla* l. et de *l'ormenismixta* l.(asteraceae).
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). *Le stress oxydant. Revue médicale de Liège*, 62(10).
- Harris, G. G., Brannan, R. G. (2009). A preliminary evaluation of antioxidant compounds, reducing potential, and radical scavenging of pawpaw (*Asimina tribloba*) fruit pulp from different stages of ripeness. *LWT-Food Science and Technology*, 42(1), 275-279.
- Hassan, G. S., Rahman, D. E. A., Abdelmajeed, E. A., Refaey, R. H., Salem, M. A., & Nissan, Y. M. (2019). New pyrazole derivatives: Synthesis, anti-inflammatory activity, cyclooxygenase inhibition assay and evaluation of mPGES. *European journal of medicinal chemistry*, 171, 332-342.
- Hegazy, AE et Ibrahim, MI (2012). Activités antioxydantes des extraits d'écorce d'orange. *Revue mondiale des sciences appliquées*, 18 (5), 684-688.
- Henriksen, EJ (2019). Rôle du stress oxydatif dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2. Dans *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* (pp. 3-17). Presse académique.
- Heymonet, C. (2013). Les plantes à visée anti-inflammatoire utilisées en phytothérapie (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Huda-Faujan, N., Noriham, A., Norrakiah, A., Babji, A. S. (2007). Antioxidative activities of water extracts of some Malaysian herbs. *ASEAN Food Journal*.
- Huet, R. (1991). Les huiles essentielles d'agrumes. *Fruits*, 46(4), 501-513.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

K

- Kähkönen, MP, Hopia, AI, Vuorela, HJ, Rauha, JP, Pihlaja, K., Kujala, TS et Heinonen, M. (1999). Activité antioxydante des extraits de plantes contenant des composés phénoliques. *Journal de chimie agricole et alimentaire*, 47 (10), 3954-3962.
- 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 *Mimusops elengi* leaves.*Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), S976-S980.[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60346-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60346-3)
- Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian, A., Jaafar, H. Z. (2012). Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules*, 17(2), 1203-1218.
- Katsinelos, P., Lazaraki, G., Anastasiadis, S., Chatzimavroudis, G., Katsinelos, T., Terzoudis, S., Kountouras, J. (2019). The impact of selective serotonin receptor inhibitors on post-endoscopic sphincterotomy bleeding, alone or with concurrent aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of Gastroenterology*, 32(6), 614.

Références bibliographiques

- Kernouf, N. (2019). Effet des extraits de *Capparis spinosa* sur la production des médiateurs inflammatoires des neutrophiles et des monocytes (Doctoral dissertation).
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food chemistry*, 119(2), 851-858.
- Khettal, B., Kadri, N., Tighilet, K., Adjebli, A., Dahmoune, F., Maiza-Benabdeslam, F. (2017). Composés phénoliques des feuilles de Citrus : Activité antioxydante et inhibition enzymatique du brunissement. *Journal de médecine complémentaire et intégrative*, 14 (1).
- Kim, H., Moon, JY, Mosaddik, A. et Cho, SK (2010). Induction de l'apoptose dans les cellules HeLa du carcinome cervical humain par l'extrait de feuille de *Citrus grandis* Osbeck (Dangyuja) riche en flavones polyméthoxylés. *Toxicologie alimentaire et chimique*, 48 (8-9), 2435-2442.

L

- Lacavé-Lapalun, J. V. (2013). Réponse immunitaire induite par l'irradiation colorectale : manipulation thérapeutique des « toll like receptors » (Doctoral dissertation, Paris 6).
- Ladaniya, MS (2008). Cultivars commerciaux d'agrumes frais et pays producteurs. Agrumes : biologie, technologie et évaluation. Presse universitaire, San Diego, 13-65.
- Lagha-Benamrouche, S., Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723-730.
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182-188.
- Lim. T.K. (2012). *Citrus reticulata* Blanco in Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer sciences et Business Media B.V.; 4: 695-715. ontogeny. *Flora*. 199, 464-475.
- Lu et al. (2008) in Duganath, N., Rubesh Kumar, S., Kumanan, R et Jayaveera, K.N. (2010). Evaluation of anti-denaturation Property and anti-Oxidant activity of Traditionally Used Medicinal Plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(2), 1-7.

M

- Ma, Y. Q., Chen, J. C., Liu, D. H., Ye, X. Q. (2008). Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel. *Journal of food science*, 73(8), T115-T120.
- Madhuri, S., Hegde, A. U., Srilakshmi, N. S., Prashith Kekuda, T. R. (2014). Antimicrobial activity of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* peel extracts. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation (JPSI)*, 3(4), 366-368.
- Madjoudja, O. (2012). *Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales*. Mémoire de licence. Université d'Agadir
- Malik, A., Najda, A., Bains, A., Nurzyńska-Wierdak, R. et Chawla, P. (2021). Caractérisation de l'extrait méthanolique de zeste de *Citrus nobilis* pour une activité antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire. *Molécules*, 26 (14), 4310.

Références bibliographiques

- Mansour, S. (2015). Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium L*, *Artemisia herba alba Asso* et *Hypericumscarboides*, Étude in vivo. Oran : Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf.
- Manvar, M. N., Desai, T. R. (2014). In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activities of fruits of *Vernonia anthelmintica* Willd. (Asteraceae). *Asian J. Pharm. Res*, 4(4), 186-188.
- Maroon, J. C., Bost, J. W., & Maroon, A. (2010). Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical neurology international*, 1.
- Marzouki, H., Khaldi, A., Chamli, R., Bouzid, S., Piras, A., Falconieri, D., Marongiu, B. (2009). Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*, 23(3), 230-237.
- Mebirouk, R., Naimi, D. (2017). Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) (Doctoral dissertation, Université Frères Mentouri-Constantine 1).
- Menichini, F., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Conforti, F., De Luca, D., Statti, G. A., Tundis, R. (2011). Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica L. cv Diamante* flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1549-1555.
- Meziti, H. (2018). Evaluation de l'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits de *Malva parviflora L* (Doctoral dissertation).
- 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).
- Moon, J. K., Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1655-1666.
- Mouly, P. P., Gaydou, E. M., Arzouyan, C. R., & Estienne, J. M. (1996). Différenciation des jus de *Citrus* par analyses statistiques multivariées. Partie II. Cas des oranges et des mandarines. *Analisis*, 24(6), 230-239.
- Mukhtar, R., Khan, M. M., Fatima, B., Abbas, M., Shahid, A. (2005). In vitro regeneration and multiple shoots induction in *Citrus reticulata* (Blanco). *Int. J. Agric. Biol*, 7(3), 414-416.

N

- Nayak, A., Bhushan, B. (2019). An overview of the recent trends on the waste valorization techniques for food wastes. *Journal of environmental management*, 233, 352-370.
- Ndoye Foe, FMC, Tchingang, TFK, Nyegue, AM, Abdou, JP, Yaya, AJG, Tchinda, AT, ... Etoa, FX (2016). Composition chimique, propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires in vitro des huiles essentielles de quatre plantes diététiques et médicinales du Cameroun. *BMC médecine complémentaire et alternative*, 16 (1), 1-12.

O

Références bibliographiques

- 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.
- Oikeh, EI, Ayevbomwan, M., Irabor, F., Oikeh, AO, Oviasogie, FE et Omoregie, ES (2020). Évaluation du contenu phénolique, des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits huileux et non huileux de graines de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Nutrition préventive et science alimentaire*, 25 (3), 280.
- Orliaguet, G., Gall, O., Benabess-Lambert, F. (2013). Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*, 17(5), 228-237.
- Ouali, T., Sadouni, Y. (2017). Evaluation in vitro des activités antioxydante et anti inflammatoire des huiles essentielles de l'écorce de *Citrus limon*. Mémoire de Master. Université A. MIRA - Bejaia. Repéré à URL : <http://univ.bejaia.dz/dspace/123456789/4750>
- Ouerdane, S., Ramdani, F. (2007). Etude du pouvoir antioxydant de deux agrumes : le citron et le pamplemousse. Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Contrôle de Qualité et Analyse. Université Abderrahmane Mira - Bejaia. p45.
- Oufa madjoudja, (2012). Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales. (memoire licence). Université d'Agadir
- Oumbiche N, hachamoui K, (2013). Activités antioxydant et antibactérienne des polyphénols des feuilles de *Citrus reticulata blanco (mandarine)* (mémoire de master), université Abderrahmane mira.

P

- Pallavi, P., Kumar, V., Hussain, M. W., & Patra, A. (2018). Excited-state intramolecular proton transfer-based multifunctional solid-state emitter: a fluorescent platform with “write-erase-write” function. *ACS applied materials interfaces*, 10(51), 44696-44705.
- Papoutsis, K., Pristijono, P., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Bowyer, M. C., Scarlett, C. J., Vuong, Q. V. (2018). Screening the effect of four ultrasound-assisted extraction parameters on hesperidin and phenolic acid content of aqueous citrus pomace extracts. *Food bioscience*, 21, 20-26.
- Pincemail, J., Heusele, C., Bonté, F., Lim et, R., Defraigne, J. O. (2001). Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Actualité Médicale Internationale. Métabolismes-Hormones-Nutrition*, 5(4), 158-164.

R

- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., Nayik, G. A. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), 351-358.
- Rahman, M. A., bin Imran, T., & Islam, S. (2013). Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic effects of the phenolics of *Leea indica* leaf extract. *Saudi journal of biological sciences*, 20(3), 213-225.
- Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., &Aruoma, O. I. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits:

Références bibliographiques

- Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278(1), 75-87.
- Rapisarda, P., Fabroni, S., Peterek, S., Russo, G., & Mock, H. P. (2009). Juice of new citrus hybrids (*Citrus clementina* Hort. ex Tan. × *C. sinensis* L. Osbeck) as a source of natural antioxidants. *Food chemistry*, 117(2), 212-218.
 - Rashid, U., Ibrahim, M., Yasin, S., Yunus, R., Taufiq-Yap, Y. H., Knothe, G. (2013). Biodiesel from *Citrus reticulata* (mandarin orange) seed oil, a potential non-food feedstock. *Industrial Crops and Products*, 45, 355-359.
 - Rathisre, P. R., Mohan, R., & Murugesan, K. (2013). In-vitro Anti-Inflammatory Activity of Methanolic Root Extract of *Erythrina Indica* Lam. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, 3(4), 48-51.
 - Reddy, M. K., Gupta, S. K., Jacob, M. R., Khan, S. I., & Ferreira, D. (2007). Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta medica*, 53(05), 461-467.
 - Rincon A.M., Vasquez A.M., Sadille F.C. (2005). Chemical composition and bioactive compounds of flow of orange (*Citrus sinensis*), tangerine (*Citrus reticulata*) and gape fruit (*Citrus paladin*) peels cultivated in Venezuela; *Arch Latinoam Nutr*; 55(3): 305-310.
 - Rock, E., Fardet, A. (2014). Les antioxydants des agrumes : action en solitaire ou matricielle ? *Phytothérapie*, 12(2), 66-75.
 - Roquilly, A., Asehnoune, K. (2019). Corticoïdes et sepsis. *Anesthésie & Réanimation*, 5(3), 186-192.
 - Roy, S. P., Niranjana, C. M., Jyothi, T. M., Shankrayya, M. M., Vishawanath, K. M., Prabhu, K., Setty, R. S. (2010). Antiulcer and anti-inflammatory activity of aerial parts *Enicostemma littorale* Blume. *Journal of Young Pharmacists*, 2(4), 369-373.

S

- Safdar, M. N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., Saddozai, A. A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of food and drug analysis*, 25(3), 488-500.
- Salunkhe D. K., Kadam S. (1995). Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing. CRC Press, 632 p.
- Sangeetha, M., Kousalya, K., Lavanya, R., Sowmya, C., Chamundeeswari, D., Maheswara, U. C. (2011). In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of Leaves of *Cleodendron Inerme*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(1), 822-827
- Santos, R. M., Fortes, G. A., Ferri, P. H., & Santos, S. C. (2011). Influence of foliar nutrients on phenol levels in leaves of *Eugenia uniflora*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 581-586.
- Setty, A. R., & Sigal, L. H. (2005, June). Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 34, No. 6, pp. 773-784). WB Saunders.

Références bibliographiques

- Shohaib.T, Shafique M., Dhanya.N, Madhu.C.Divakar. (2011). Importance of flavonoids in therapeutics; *Hygeia Journal for Drugs and Medicines (.J.D.M)*; 3 (1): 1-18.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.*American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Soheyb, H., Houcem, M. (2017). Etude de la diversité des insectes auxiliaires (coléoptères carabiques) dans un verger d'agrumes de la région de Guelma.
- Spiegel-Roy, P., & Goldschmidt, E. E. (1996). *The biology of citrus*. Cambridge university press.
- Su-Chen,H, Chih-Cheng,L, Investigation of Heat-Treating Conditions for Enhancing the Anti-Inflammatory Activity of Citrus Fruit (*Citrus reticulata*) Peels. 7976 *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 7976–7982. DOI: 10.1021/jf801434c

T

- Telli, A., Mahboub, N., Boudjeneh, S., Siboukeur, O. E. K., Moulti-Mati, F. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L.) variété ghars. *Annales des sciences et technologie*, 2(2), 107-114.
- Tigrine, N. (2016). Activité antioxydante des extraits d'écorces et de pulpe de *citrus limon* et *citrus sinensis*. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaïa.
- Tomás-Barberán, F. A., & Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1024-1032.
- Tumbas, V. T., Četković, G. S., Đilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., Vulić, J. J., Knez, Ž., Škerget, M. (2010). Antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel. *Acta periodica technologica*, (41), 195-203.

U

- USDA (United States Department of Agriculture). 2014. Citrus: World Markets and Trade.

V

- Vinson, J. A., Liang, X., Proch, J., Hontz, B. A., Dancel, J., Sandone, N. (2002). Polyphenol antioxidants in citrus juices: in vitro and in vivo studies relevant to heart disease. In *Flavonoids in cell function* (pp. 113-122). Springer, Boston, MA.

W

- Williams, L., O'Connor, A., 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

Références bibliographiques

animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Med J*, 57, 327-331.

- Wu, J., Chen, S., Ge, S., Miao, J., Li, J., & Zhang, Q. (2013). Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 42-51.

Y

- Yousfi M., Djeridane A., Khacheba I., 2008. Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha -amylase. *Mémoire d'Ingénieur d'Etat en biologie*. Université de Laghouat.74 p.
- Yu, J., Wang, L., Walzem, RL, Miller, EG, Pike, LM et Patil, BS (2005). Activité antioxydante des limonoïdes d'agrumes, des flavonoïdes et des coumarines. *Journal de chimie agricole et alimentaire*, 53 (6), 2009-2014.

Z

- Zerbato, M. (2010). Interet du dosage par micro methode de la proteine C reactive au cabinet de pediatrie (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
- Zhang H., Zhi-qin, Y. Y. F. Z. (2018). Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*C. reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food chemistry*, 196, 885-896.

ANNEXES

Annexe 1

Tableau 1 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction des différentes concentrations d'extraits de *Citrus reticulata* et de l'acide salicylique.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Pourcentage d'inhibition de la dénaturation (%)			
	<i>Ac. Salicylique</i>	<i>Ecorces</i>	<i>Pépins</i>	<i>Feuilles</i>
100	70,03	69,88	66,28	18,16
300	76,08	76,22	68,01	29,68
500	81,12	72,03	69,02	34,44

Tableau 2 : Pourcentage de stabilisation de membrane des globules rouges en fonctions des différentes concentrations d'extraits et de l'acide salicylique.

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Pourcentage de stabilisation (%)			
	<i>Ac. Salicylique</i>	<i>Ecorces</i>	<i>Pépins</i>	<i>Feuilles</i>
100	67,65	45,48	59,95	30,09
300	72,85	55,20	52,04	32,13
500	74,66	60,86	55,88	36,88

Annexes

Tableau 3 : Le pouvoir réducteur des différents extraits de *Citrus reticulata* et de l'acide ascorbique.

Concentration (mg/ml)	Acide ascorbique	Ecorces	Feuilles	Pépins
0,075	0,67	0,02	0,1975	0,0205
0,15	1,207	0,0465	0,2055	0,0385
0,31	2,34	0,0735	0,2615	0,0965
0,62	2,42	0,1675	0,3705	0,1335
1,25	2,55	0,274	0,6765	0,2795
2,5	2,58	0,6295	0,946	0,3435
5	2,59	0,9635	1,5825	0,5925
10	2,8	1,2535	3	0,9035

Tableau 4 : Les résultats des IC₅₀ pour le test de DPPH.

	IC 50(mg/ml)
Ecorces	20,73
Feuilles	1,40
Pépins	1,78
Acide ascorbique	0,072