

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité Biotechnologie Microbienne



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Réf :

Mémoire de Fin d'Etude

En vue de l'obtention du diplôme de Master
en Biotechnologie Microbienne

Thème

**Evaluation des activités biologiques des huiles
essentielles et composés phénoliques de sous-produit
de fabrication de jus d'orange et de mandarine**

Présenté par :

MOUHOU Narimane & MOHAMADI Amar

Soutenu le : 13 juillet 2022

Devant le jury :

Mr. BETTACHE Azzeddine

Pr

Président.

Mme. LAINCER Firdousse

MCA

Promotrice.

Mr. LADJOUZI Rachid

MAA

Examineur.

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciement

En préambule à ce manuscrit, nous adressons nos remerciements les plus sincères tout d'abord au « Bon Dieu » le plus puissant de nous avoir guidé vers le chemin du savoir et de nous avoir donné le courage, la patience et la santé qui été indispensables tout au long de notre parcours.

*Nos remerciements s'adressent en premier lieu à notre chère promotrice **Dr. LAINCER Firdous** pour avoir accepté de nous encadrer et pour le temps qu'elle nous a accordé tout au long de la réalisation de ce travail. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles, la disponibilité, les conseils et le soutien moral.*

*Et nous tenons à remercier **Mr MADI Nassim** pour son encouragement et son soutien au siens du centre de recherche CRBt.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mr DJEMAOUNE Lounis** pour l'attribution du thème.*

*Nos remerciements **Mr CHIKHOUN** qui nous a aidé avec son matériel*

*Nos associons nos reconnaissances à tout le personnel du centre de recherche en biotechnologie (C.R.Bt) à leurs tête **Dr. BENSOUICI Chawki***

Nous tenons également à remercier les membres de jury pour l'honneur qu'ils nos ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tout particulièrement :

***Mr LADJOUZI.**, de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.*

***Mr BETTACHE.**, qui nous a honorées en acceptant d'être président de jury.*

Nos remerciements vont également à tous les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*A mon cher papa **MALIK**, ma chère maman **ZOUBIDA** et ma grand-mère **ADADA**
Aucune dédicace ne serait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour
les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie
pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre
bénédictioin m'accompagnera toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux
tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais
assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur, longue vie et faire en sorte que
jamais je ne vous déçoive.*

*A mes frères **Narim** et **Nafaa***

*A mes sœurs **Yasmina**, **Lynes**, **Katia**, **Najat** et ma chère **Chouchou** ainsi **Wassila** et son **Mari***

*A mon binôme et mon mari **Amar** qui m'a supporté, soutenu et surtout compris en permanence,
pour son aide, son encouragement, ses
Sacrifices, sa fidélité et sa gentillesse.*

*A ma **mama Kika** et ma cousine **Thiziri***

*A ma belle famille nana **KHADIDJA** et 3emi **ALLAOUA** mes belles sœurs et mes beaux frères
A nos amis **Hicham**, **Lotfi**, **Amar**,*

Narimane

Dédicace

*A mon cher père **ALLAOUA**, ma chère mère **KHADIDJA**, ma chère grand-mère **HALIMA**.*

*A la mémoire de ma tante **MOUNIRA** et ma grand-mère **FATMA**.*

En cette occasion je veux exprimer ma reconnaissance aux efforts que vous mes parents ; aviez fourni pour mon éducation et mes études, que ce travail modeste soit l'honorable récompense à vos efforts et vos sacrifices.

Que Dieu le tout puissant vous accorde la foie, santé et le bonheur, tel que vous l'aviez fait pour moi depuis mon enfance, que votre satisfaction m'accompagne tout au long de ma vie.

*A mes frère **MOHAMED**, **YOUNES** et **ZAKARIA***

*A mes sœurs **WANISSEM**, **RAWYA** et son **MARI***

*A mes beaux-frères **MOUHCINE**, **LOTFI**, **HICHAM** et **DJAAFER***

*A mes belles-sœurs **CHOUCHOU**, **KATIA**, **NADJET**, **YASMINA** et **LYNES**.*

*A mon binôme et chère femme **NARIMANE**, qui a était à mes côtés durant les bons et les plus pénibles moments, qui a su me soutenir et me supporter, qui s'est sacrifié pour moi et pour notre travail ainsi que notre relation.*

*A ma belle-famille da **MALIK** et khalti **ZOUBIDA**, mes beaux-frères ainsi que ma belle-sœur et son mari.*

*A mes cher **CAPRICE**, **OSCAR**, **OSTORA** et **MR CHVIKHOU**.*

AMAR.

Table de matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre I

Généralités sur les agrumes

I. Généralités sur les agrumes.....3

I.1. Classification3

I.2. Anatomie3

I.3. Propriétés chimiques4

I.4. Technologie de production de jus d'agrumes5

I.5. Sous-produits d'agrumes.....6

Chapitre II

Les huiles essentielles d'agrumes

II. Les huiles essentielles7

II.1. Définition.....7

II.2. Composition7

II.3. Effets thérapeutiques8

II.4. Effet antimicrobien8

II.5. Activité antioxydante8

II.6. Toxicité des huiles essentielles.....9

Chapitre III

Les extraits phénoliques d'agrumes

III. Les extraits phénoliques10

III.1. Définition.....10

III.2. Localisation.....10

III.3. Constituants	11
III.4. Effet antioxydant	11
III.5. Intérêt biologique	11

Chapitre IV

Matériels et Méthodes

IV. Matériels et méthodes.....	12
IV.1. La matière végétale.....	12
IV.1.1. Lyophilisation.....	13
IV.1.2. Broyage.....	13
IV.1.3. Tamisage.....	13
IV.1.4. Détermination de l'humidité.....	14
IV.2. Extraction des huiles essentielles d'orange et de mandarine par hydrodistillation.....	15
IV.2.1. Mode opératoire.....	15
IV.2.2. Rendement d'extraction des huiles essentielles.....	16
IV.3. Extraction des composés bioactifs des déchets d'orange et de mandarine.....	16
IV.3.1. Taux d'extraction.....	17
IV.3.2. Dosage des Polyphénols totaux.....	17
IV.4. Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles et extraits phénoliques.....	17
IV.4.1. Activités antioxydantes.....	17
IV.4.1.1. Activité Antiradicalaire au DPPH.....	17
IV.4.1.2. Activité du Pourvoir Réducteur (FRAP).....	18
IV.4.1.3. Activité Phenanthroline.....	19
IV.4.2. Activités enzymatiques.....	20
IV.4.2.1. Activité antidiabétique.....	20
IV.4.3. Activité antifongique.....	21

Chapitre V

Résultats et Discussion

V. Résultats et discussions.....	24
V.1. Humidité.....	24
V.2. Rendement en huiles essentielles.....	25
V.3. Taux d'extraction des extraits phénoliques.....	25
V.4. Dosage des polyphénols totaux.....	27
V.5. Activités antioxydantes.....	28
V.5.1. Pouvoir antiradicalaire DPPH.....	28
V.5.2. Pouvoir réducteur par FRAP.....	29
V.5.3. Activité de réduction par la formation du complexe Fe⁺²- Phenanthroline.....	31
V.6. Activités enzymatiques.....	32
V.6.1. Evaluation de l'activité antidiabétique.....	32
V.7. Activité antifongique.....	33
Conclusion générale.....	34
Annexes	
Références bibliographiques	

Liste des figures

Figure 01 Structure anatomique d'un agrumes.....	5
Figure 02 Pourcentages de constituants d'agrumes.....	6
Figure 03 Schéma de la chaîne de transformation des agrumes.....	7
Figure 04 Les différentes variétés d'agrumes et leurs sous-produits.....	8
Figure 05 Localisation des composés phénoliques au niveau de la cellule.....	14
Figure 06 Procédé d'extraction de jus et récupération des déchets.....	12
Figure 07 Lyophilisation du sous-produit d'agrumes.....	13
Figure 08 Poudre de mandarine et d'orange obtenue.....	14
Figure 09 Dépôt du déchet dans l'étuve.....	14
Figure 10 Extraction des huiles essentielles par Hydrodistillation.....	15
Figure 11 Microonde utilisée pour l'extraction des extraits phénoliques.....	16
Figure 12 Transformation du radical DPPH• en DPPH-H.....	18
Figure 13 Réduction de fer Fe^{3+} en Fe^{2+}	19
Figure 14 Formation de complexe $Fe(II)$ -Phénanthroline.....	20
Figure 15 Préparation du milieu PDA.....	22
Figure 16 Dépôts du champignon sur les milieux PDA.....	22
Figure 17 Taux d'humidité et de matière sèche d'écorces de mandarine et d'orange.....	24
Figure 18 Taux d'extraction de composé phénoliques à partir de déchets d'orange et de mandarine.....	26
Figure 19 Principaux constituants des essences d'agrumes et des huiles essentielles (annexe II).	
Figure (20) Courbe d'étalonnage des composés phénoliques (Concentration en Acide gallique mg/ml) (annexe V).	
Figure (21) Courbe d'étalon du Trolox (annexe V).	

Liste des tableaux

Tableau I : Composition chimique des agrumes.....	6
Tableau II : Classification chimique des huiles essentielles.....	10
Tableau III : Activités biologiques des extraits phénoliques.....	15
Tableau IV : Rendement d'extraction des huiles essentielles d'orange et de mandarine.....	25
Tableau V : Teneur en polyphénols de sous-produit d'orange et de mandarine.....	27
Tableau VI : IC50 de sous-produit d'orange et de mandarine en utilisant le test DPPH.....	28
Tableau VII : A0,5 des huiles essentielles et des l'extraits phénolique d'orange et de mandarine en utilisant le test FRAP.....	30
Tableau VIII : Valeurs des A0.5 dans le test Phenanthroline.....	31
Tableau IX : Effet in vitro de différente concentration d'huiles essentielles et des extraits phénoliques de l'orange et de mandarine sur la croissance mycélienne de FOL.....	33

Liste des abréviations

DPPH: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

HEs: Huiles essentielles.

EP: Extrait phénoliques.

mg: Milligram.

µl: Microlitres

BHA : Butylhydroxyanisole

BHT : Butylhydroxytoluène

°C : Degré Celsius

IC₅₀ : Concentration d'inhibition à 50%

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FRAP : Pouvoir réducteur

pH : Potentiel hydrogène

MF : Matière Fraiche

MS : Matière Sèche

EAG: Equivalent d'acide gallique.

ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity

Introduction

Générale

Introduction générale

Les agrumes, originaires d'Asie du Sud-est, sont une culture agricole importante dans le monde en raison de leur forte consommation et de leur commercialisation durant l'année. Ils ont été introduits en Afrique il y a des milliers d'années par le biais du commerce, puis ils ont été introduits en Europe sous l'Empire romain comme symbole de la société noble. Au Moyen Âge, les agrumes se sont rapidement adaptés au climat méditerranéen et ont été introduits en Amérique par les explorateurs espagnols. Aujourd'hui, 140 pays tropicaux et subtropicaux cultivent les agrumes, dont l'Algérie (**Chen et al., 2019**).

Les statistiques de la production mondiale d'agrumes de l'année 2019 ont été établies par la Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) ils ont été estimées à 143755,6 mille tonnes, l'Algérie présente une production d'environ 1593,5 mille tonnes.

À la fin de la transformation, l'industrie produit des résidus solides, semi-solides et des eaux usées. Les pelures d'agrumes sont les principaux résultats de la transformation du fruit, elles constituent une source de pollution lorsqu'elles ne sont pas traitées (**Lagha-Benamrouche 2018**). Les sous-produits présentent un pH faible (acide) et des concentrations élevées en composés organiques, dont les huiles essentielles, qui constituent le principal problème pour l'environnement biologique (**Zema et al., 2018**). Des études récentes ont montré que ces écorces sont une source de composés biologiquement actifs tel que la vitamine C, ainsi que des métabolites secondaires tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les huiles essentielles, sont abondants (**Huang et al., 2010**).

Plusieurs études attestent les propriétés pharmacologiques et nutraceutiques d'écorces d'agrumes. Ces activités biologiques sont liées à des quantités importantes de polyphénols, notamment des acides phénoliques et des flavonoïdes. Récemment, une attention particulière a été accordée par de nombreuses industries à la récupération et au recyclage des composés à valeur ajoutée des écorces d'agrumes afin de les exploiter au cours du processus de production. Cette attention est essentiellement liée à la quantité de biomasse d'écorces d'agrumes et à sa disponibilité tout au long de l'année. Les écorces d'agrumes sont une riche source de flavonoïdes, de coumarines, de stérols, de glycosides et d'huiles volatiles (**Rezzadori et al., 2012 ; Sharma et al., 2017**). Les flavonoïdes les plus abondants des agrumes, généralement connus sous le nom de flavanones, comprennent l'hespéridine, la naringine, la narirutine et la néohespéridine. En outre, les huiles essentielles d'agrumes sont utilisées comme conservateurs naturels en raison de leur large spectre d'activités biologiques,

y compris les effets antimicrobiens et antioxydants (**Mitropoulou et al., 2017**). En raison de leur odeur agréable rafraîchissante et riche en arômes, les huiles essentielles d'agrumes sont également utilisées dans les purificateurs d'air, les produits d'entretien ménager, les parfums et cosmétiques (**Dosoky et al., 2018**).

D'énormes quantités de déchets d'agrumes sont produites par les industries chaque année sous forme de pelures. L'unité de production d'El-Kseur au niveau de la wilaya de Bejaia transforme environ 1100 tonnes d'orange et 80 tonnes de mandarine durant l'année 2022, ce qui a généré une importante quantité de déchets. Ces résidus sont utilisés comme aliments pour animaux ou directement jetés, sans traitement approprié, ce qui entraîne des problèmes environnementaux. Par conséquent, la réduction de la quantité de déchets et la promotion de l'industrie des agrumes par le traitement des déchets restent un défi. De plus, de nombreux composés à valeur ajoutée commercialement importants peuvent être efficacement extraits des pelures d'agrumes ou peuvent être réutilisés de plusieurs sortes.

Dans ce contexte, s'inscrit notre travail dans le cadre de la valorisation biotechnologique d'un déchet agro-alimentaire issu de la transformation d'agrumes de deux variétés d'orange et la mandarine récupérées au niveau d'Unité El-Kseur (Tchina) Groupe Cevital

La valorisation consiste dans l'extraction des huiles essentielles et des composés phénoliques. Dans le cadre de ce travail, nous avons développé une étude comparative entre deux variétés de citrus à voir l'orange (*citrus sinensis*) et la mandarine (*citrus reticulata*) cultivés en Algérie, pour le déchet engendré au cours de la production, dans le but de d'extraire les substances bioactives et déterminer leur propriétés biologique, (I) l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH, pouvoir réducteur et le phenanthroline, (II) l'évaluation de l'activité antioxydante par le test d'ORAC, (III) l'inhibition de l'activité enzymatique de l'uréase et de l'alpha-amylase, (IV) évaluation de la cytotoxicité vis-à-vis le *Tribolium castaneum* ou le rouge de farine. La valorisation de ce déchet s'est focalisée sur l'extraction et l'étude des huiles essentielles et des extraits phénoliques. Dans cet objectif nous avons calculé l'humidité du déchet récupéré, le rendement en huile essentielle et le taux d'extraction des polyphénols.

Ce travail a pour objectif aussi de la détermination de l'activité biologique, antifongique et enzymatique des huiles essentielles et des composés phénoliques dans le but de remplacer les substances synthétiques par des substances naturelles.

Chapitre I

Généralité sur les agrumes

I. Généralités sur les grumes

I.1. Classification des agrumes

Les agrumes appartiennent à la sous-famille des angiospermes Aurantioideae de la famille des Rutaceae, de la tribu des Citreae et de la sous-tribu des Citrinae. Les agrumes sont divisés en plusieurs genres, dont trois les plus cultivés au monde : Poncirus, Fortunella et Citrus. Le genre Citrus est le plus important où l'on trouve les espèces les plus cultivées au monde, qui sont nommées ici : orange (*Citrus sinensis*) ; mandarine (*Citrus reticulata*) ; clémentine (*Citrus clementina*) ; citron (*Citrus limon*) et pomelo (*Citrus paradisi*) (M'Hiri 2015).

I.2. L'anatomie d'un agrume

La morphologie des agrumes diffère d'une variété à l'autre selon le type, la qualité et le degré de maturité. L'anatomie générale des agrumes consiste en albédo ou l'endocarpe (17%), la pulpe (26%), le jus (45%), flavédo ou le péricarpe (10%) et les graines (02%) (Mahato et al., 2018). La structure anatomique et les teneurs des agrumes sont présentés dans les figures (01) et (02) respectivement.

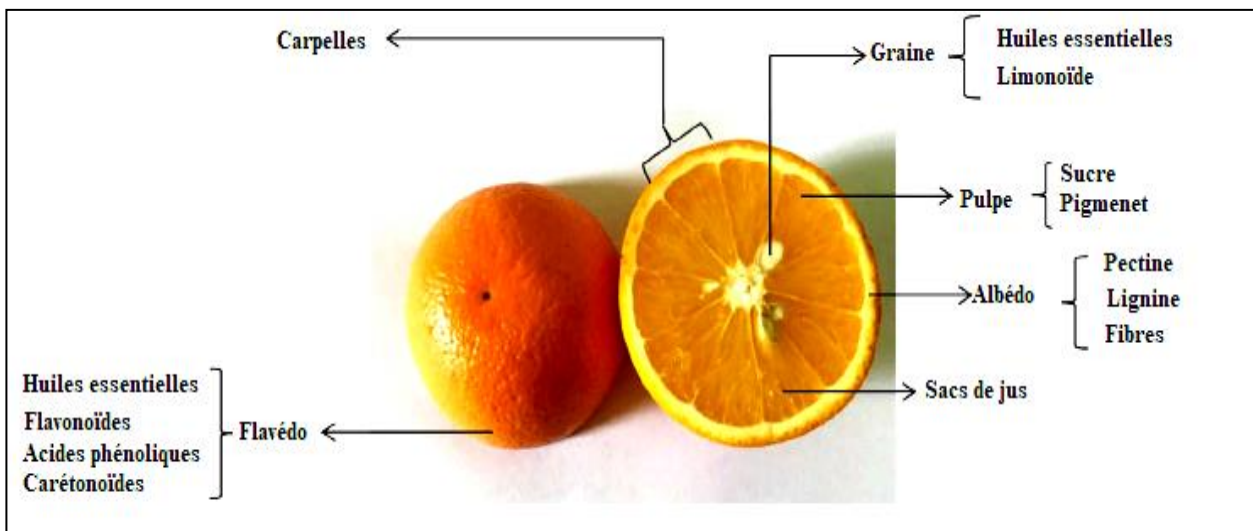


Figure (01) : Structure anatomique d'un agrumes (Panwar et al., 2021)

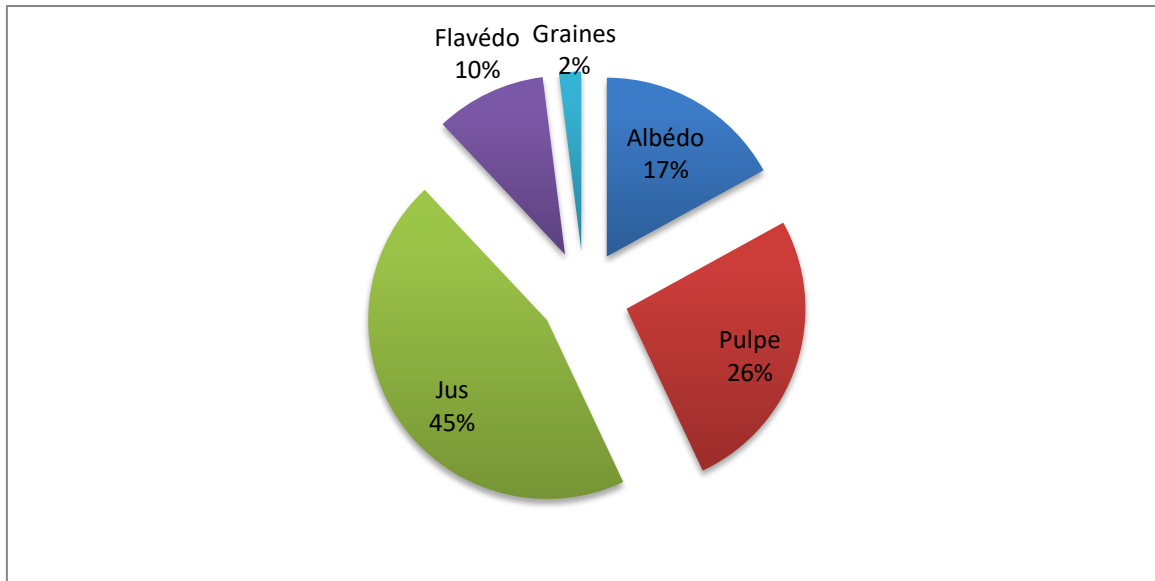


Figure (02) : Pourcentages de constituants d'agrumes (Mahato et al., 2018)

I.3. Propriétés chimiques des agrumes

En général, les agrumes sont constitués de 87% d'eau et 13% de micronutriments, ces micronutriments représentent les huiles essentielles (05%), les protéines (09%), les fibres (11%), les acides (16%), les glucosides (10%), la pectine (21%), les minéraux (10%), les graisses (03%) et les pentosane (15%) (Martinez 2010). Le tableau I représente la composition chimique d'agrumes.

Tableau I : Composition chimique des agrumes (Martinez 2010)

Composition chimique		Quantité (%)
Eau		87 %
	Huiles essentielles	05 %
	Protéines	09 %
	Fibres	11 %
	Acides	16 %
Micronutriments	13%	
	Glucosides	10 %
	Pectine	21 %
	Minéraux	10 %
	Graisses	03 %
	Pentosane	15%

I.4. Technologie de production de jus d'agrumes

Les agrumes tiennent leur réputation grâce à leur goût agréable et rafraîchissant, les consommateurs en bénéficient à la fois de la vitamine C, de l'acide folique et des fibres alimentaires (Johnson 2001). La transformation des agrumes suit plusieurs étapes avant d'avoir le produit final tel que le jus, les marmelades, les gelées, les potpourris, les confitures et les arômes (Kimball 1999).

Le processus commence par la réception des fruits, par la suite ils subissent un lavage à l'eau chlorée, calibrage et triage des fruits, l'extraction et la finition du jus, traitement thermique, enfin le stockage du produit fini avant son emballage et sa distribution (Zema et al., 2018). La chaîne de transformation d'agrumes est représentée dans la figure (03).

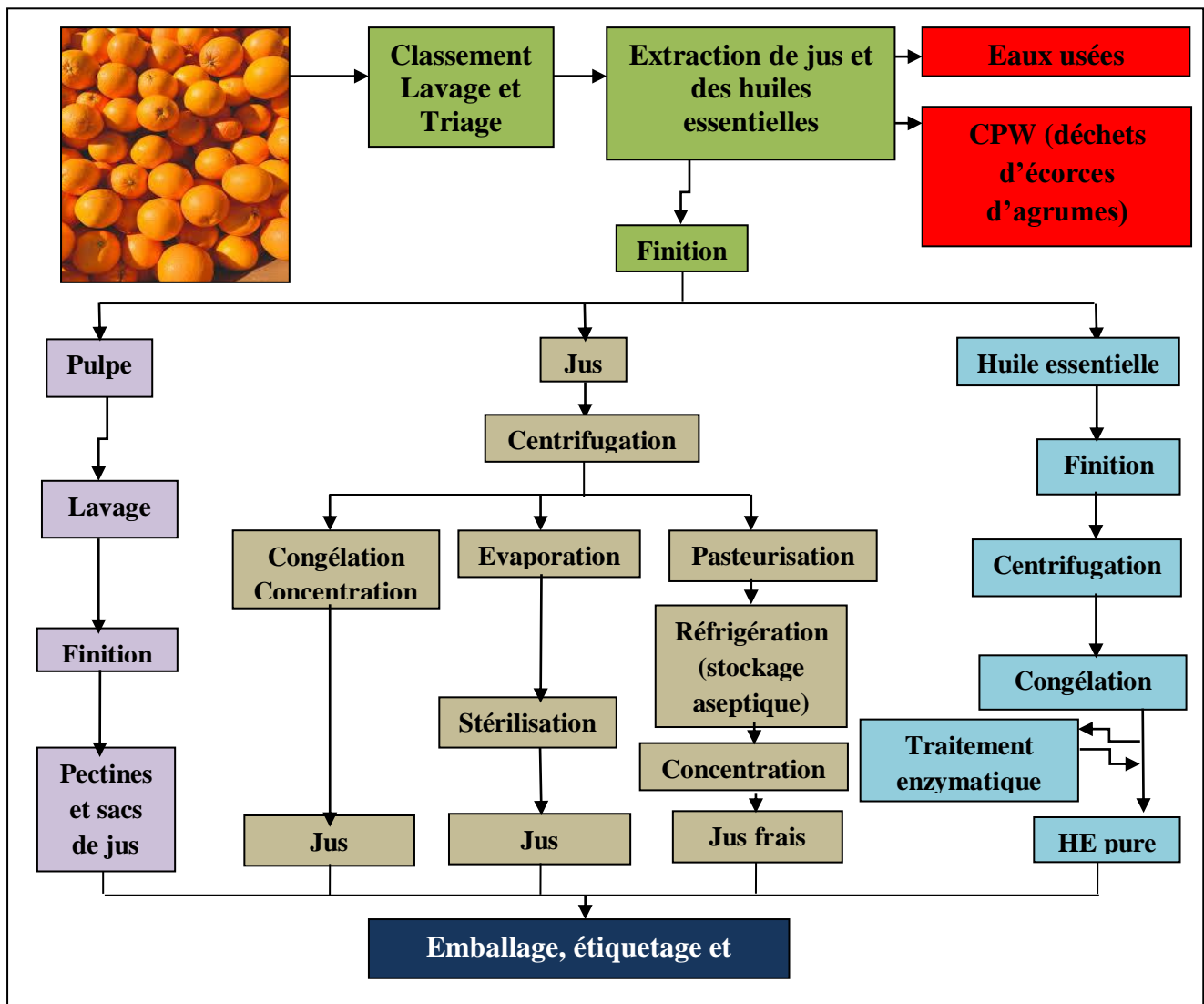


Figure (03): Schéma de la chaîne de transformation des agrumes (Johnson 2001).

I.5. Sous-produits d'agrumes

A chaque fin de transformation des agrumes pour en extraire le jus, l'industrie génère une masse importante de déchets d'agrumes, résidus solides contenant 50-70% d'écorces, 30-35% graines et des traces de pulpes (**Panwar et al., 2021**).

Les sous-produits des résidus d'agrumes peuvent être des écorces confisquées, de la pectine, des enzymes, des huiles essentielles (**Sayah et al., 2013**). Les différentes variétés d'agrumes ainsi que produits et sous-produits sont illustrées dans la figure (04).

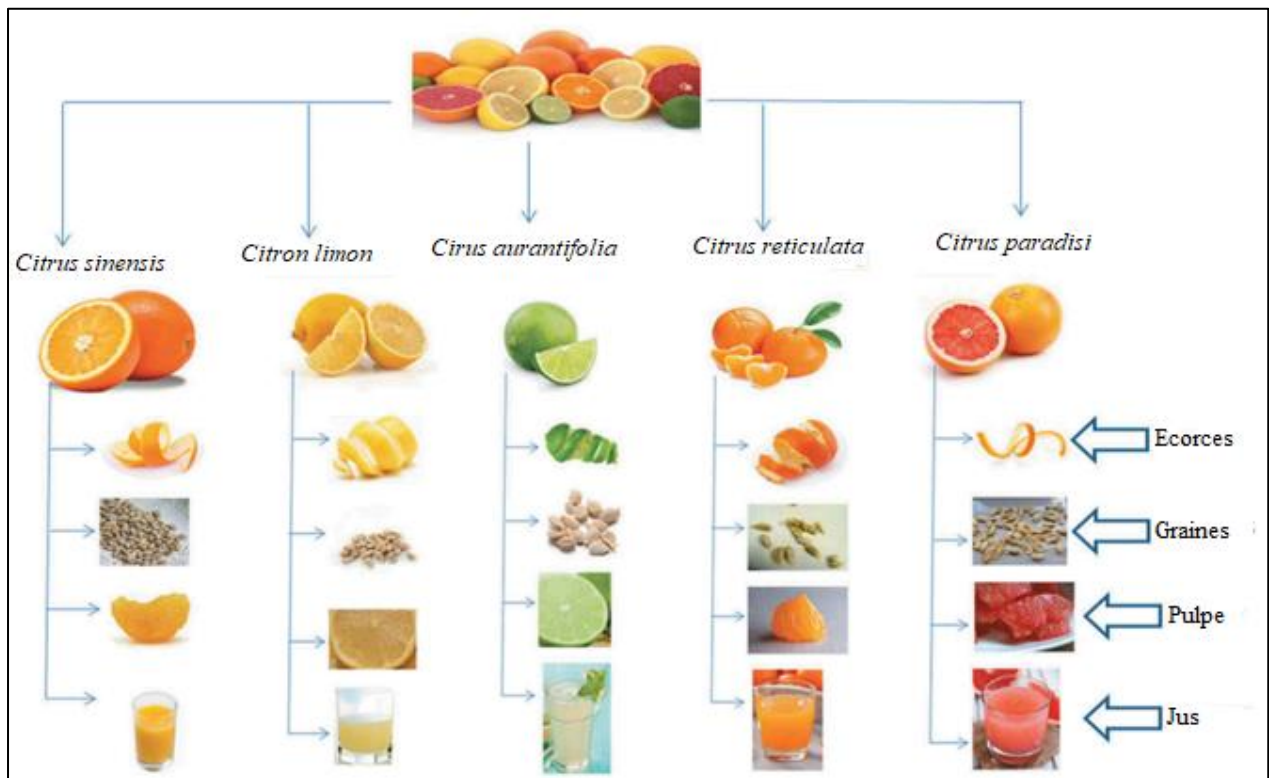


Figure (04) : Les différentes variétés d'agrumes et leurs sous-produits (Sayah et al., 2013)

Chapitre II

Les Huiles Essentielle d'agrumes

II. Les Huiles Essentielle d'agrumes

II.1. Définition

Composés aromatiques présents en grande quantité dans les glandes oléifères présentes à différentes profondeurs dans la peau des agrumes, précisément dans la partie flavedo et les cuticules. Non solubles dans l'eau mais solubles dans l'alcool et d'autres huiles naturelles, les HE d'agrumes regroupent environ 400 composés dont la composition dépend de l'espèce, de la variété, de la culture et des méthodes d'extraction (Nannapaneni *et al.*, 2009).

II.2. Composition

Les huiles essentielles contiennent seulement des terpènes les plus volatils, les constituants sont principalement des mono terpènes et des sesquiterpènes dont la formule générale est de $(C_5 H_8)_n$. Des composés d'arôme volatiles qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : phénols, hydrocarbures, alcools, aldéhydes, cétones, esters et éthers (Oussalah *et al.*, 2006). Les différents composants d'huile essentielle d'agrumes sont énumérés dans le tableau II. Les structures des composés sont illustrées dans l'annexe II.

Tableau II : Classification chimique des huiles essentielles (Bounasla 2008).

Composition	Exemple	Description
Hydrocarbure	Pinène, limonène	Présence des atomes de carbone et d'hydrogène
Alcool	Menthol, trepaning-4-al, geranial	Présence de groupe (OH) attaché à la structure terpène
Aldéhyde	Citral (géraniale/neral) citronellal	Terpénoïdes avec un groupe (C=O) et hydrogène lie avec le carbone
Aldéhydes cycliques	Cinnamic aldéhyde vanillin	Groupe d'aldéhyde attaché à l'anneau benzénique.
Phénol	Thymol-eugénoïl carvacrol	Groupe hydroxyde attaché à l'anneau benzénique.
Cétone	Camphor, thujone	Présence de groupe carbone lie aux deux atomes de carbone.
Ether phénolique	Safrol, anéthol myristiéin	Présence d'O2 avec le carbone et anneau de benzénique.
Oxyde	Cineole, asaridole	Présence d'oxygène adjacent au deux ou plusieurs carbones
Ester	Méthyle salicylate, allyl isothiocyanate	Produit obtenus après mélange d'acide et alcool.

II.3. Effets thérapeutiques

Les HE d'une origine naturelle peuvent être parfois dangereuses et toxiques pour la consommation et la santé humaine, donc pour une bonne utilisation et pour avoir l'effet thérapeutique recherché ; il faut bien choisir la dose et le mode d'administration qui est approprié. Les HE peuvent pénétrer profondément et rapidement les couches épidermiques et atteindre la circulation sanguine grâce à des agents terpéniques qui accélèrent la pénétration. Les voies d'administration des HE les plus couramment utilisées sont la voie cutanée et la voie orale. L'utilisation par voie cutanée en massage ou en friction est conseillée pour utiliser les HE diluées (1 à 50%) dans une huile végétale pour limiter les risques d'irritations. L'utilisation par voie orale les HE doivent toujours être mélangées à du miel ou à des sirops d'érable (Couic-Marinier et al., 2013).

Les HE d'agrumes peuvent également être utilisées comme calmant du système nerveux autonome, comme antistress (HE de mandarine), comme apaisant du sommeil (HE d'orange) (Solari 2019). Les HE peuvent également réguler les monoamines dans le corps qui diminuent les symptômes dépressifs (selon l'hypothèse 5-HT de la dépression), peuvent réguler les neurotrophines en diminuant le niveau d'anxiété et de dépression), réguler le système neuroendocrinien pour traiter le syndrome prémenstruel et les troubles de la ménopause, utilisées pour traiter le stress oxydatif causé par les espèces réactives de l'oxygène et contre l'inflammation grâce à ses propriétés anti-inflammatoires (Fung et al., 2021).

II.4. Effet antimicrobien

Les HE ont une activité potentielle vis-à-vis *S. aureus* et *C. albicans*, en générale ce sont les bactéries à Gram (-) sont plus résistantes que les bactéries Gram (+) (Burt, 2004). La plupart des composants des HE sont des hydrocarbures ils possèdent au moins un cycle carboné dans leur structure et sont hydrophobes ce qui augmente l'activité vis-à-vis des microorganismes (Ruiz et al., 2014).

Les propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques des HE sont largement connues ; elles sont traditionnellement utilisées comme traitement des infections des poumons ou des voies respiratoires. En raison de leur pouvoir sécrétolytique et sécrétomoteur, les HE sont soit inhalées sous forme de vapeur, soit administrées par voie orale mélangées à d'autres produits ou appliquées en massage à travers la peau. La phase gazeuse (administration par inhalation de la vapeur) présente de meilleure activité antibactérienne, antivirale et

antifongique. Les huiles essentielles considérées comme CRAS (Generally Recognized as Safe) ont démontré des propriétés antimicrobiennes contre les bactéries responsables des infections des voies respiratoires qui se développent dans de nombreuses infections virales comme le rhume et comprennent l'amygdalite, sinusite, bronchite et pneumonie (**Arena et al., 2021**).

II.5. Activité antioxydante

Les antioxydants, de nature chimique, ont la possibilité de réduire le rancissement, de retarder la peroxydation lipidique sans affecter les propriétés sensorielles et nutritionnelles du produit ou de l'aliment. Les antioxydants permettent de conserver la bonne qualité du produit et d'augmenter sa durée de vie et sa conservation (**Djenane et al., 2016**).

Un antioxydant idéal doit présenter des caractéristiques spécifiques telles que la solubilité dans les graisses, être efficace à faible dose, ne pas présenter de toxicité, ne pas donner de couleur, d'odeur ou de saveur indésirable à l'aliment, et doit être résistant aux processus technologiques et stable dans les produits finis (**Poknory 2001**). Le limonène est le composé des huiles essentielles qui montre une forte activité antioxydante (**Lagha-Benamrouche, 2018**).

II.6. Toxicité des huiles essentielles

Selon la relation "dose-effet", les HE peuvent être dangereusement toxiques pour la santé humaine à des doses d'utilisation élevées (**Carson et al., 2011**).

Les HE d'agrumes sont photo-toxiques en raison de leur composition en furocoumarines qui sont des composés photo-sensibilisants. Après application cutanée des HE et exposition aux effets des rayons UV du soleil, une décoloration de la peau se manifeste par une couleur rouge. Seules les HE de Citrus limon qui ne présentent aucune toxicité (**Teuscher et al., 2005**).

Chapitre III

Les Extraits Phénoliques d'agrumes

III. Extraits phénoliques d'agrumes

III.1. Définition

Les extraits phénoliques d'agrumes regroupent à la fois les flavonoïdes, polyphénols et les acides, ils sont présents d'une façon abondante dans les aliments dont l'origine est végétale en tant que des antioxydants naturels. Leur présence dans les aliments est une prévention contre les pathologies humaines.

En plus du rôle comme des antioxydants, ils sont aussi utilisés comme des conservateurs alimentaires, des colorants naturels, pour la production du papier, de la peinture et dans la cosmétique (Hayat et al., 2010).

III.2. Localisation

Les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Ils sont présents aussi dans diverses substances naturelles comme les fruits rouges, le raisin ...etc. (Middleton et al., 2000).

A l'échelle cellulaire, ces molécules sont stockées dans des vacuoles cytoplasmiques mais seulement dans les cellules périphériques des épidermes de la plante (Martin et al., 2002). L'anatomie cellulaire est illustrée dans la figure (05).

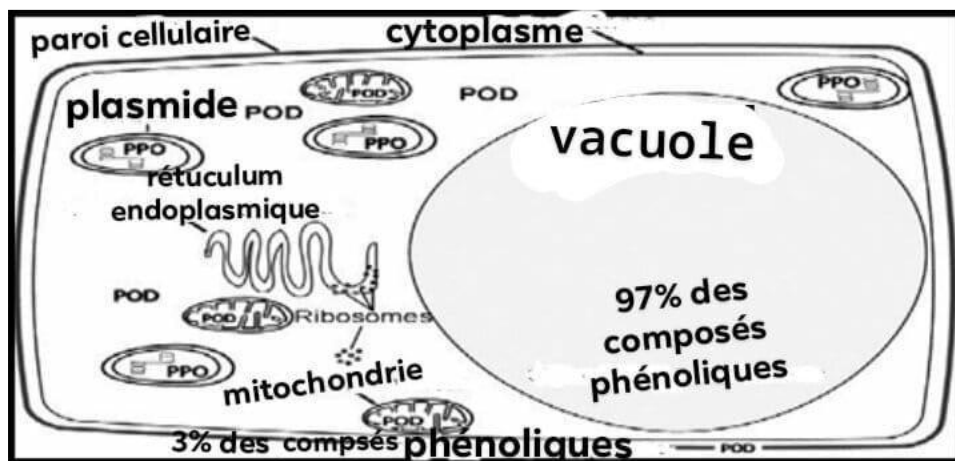


Figure (05) : Localisation des composés phénoliques au niveau de la cellule (Toivonen et al., 2008).

III.3. Constituants des extraits phénoliques d'agrumes

Les extraits phénoliques d'agrumes sont généralement constitués de flavonoïdes (Reecher 2003), d'acides phénoliques (Richter 1993), de tannins (Bruneton 1999) et de la vitamine C (Willox J-K.2003).

III.4. Effet antioxydant des composés phénoliques

Grâce à leur pouvoir antioxydant, les composés phénoliques sont considérés comme de très bons antimutagènes et anticarcinogènes, parallèlement au composés phénoliques l'utilisation des antioxydants de synthèse comme la BHT (butylhydroxytoluène) et le BHA (butylhydroxyanisole), ils sont considérés dangereux en raison de risques toxicologiques, alors il est préférable de songer à changer ces antioxydants par ceux d'origine naturelle. L'activité antioxydantes des composés phénoliques agit soit en bloquant la formation des radicaux libres soit en fixant directement l'oxygène ou en inhibant l'activité lipoxygénase (Fleuriet et al., 1996).

III.5. Intérêt biologique des extraits phénoliques

Les extraits phénoliques présentent plusieurs activités biologiques qui sont énumérés dans le tableau III.

Tableau III : Activités biologiques des extraits phénoliques (Zohra 2005).

Composés phénoliques	Activités
Acides phénols (cinnamiques et Benzoïques)	Antibactériens, antifongiques, antioxydants
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedémateuses.
Flavonoïdes	Antitumorales, anticarcinogènes, anti-inflammatoires, hypotenseurs et diurétiques, antioxydants.
Anthocynes	Protection des veines et capillaires.
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, antitumorales, antifongiques, anti-inflammatoires.
Tannins galliques et catéchiqes	Antioxydants.

Chapitre IV

Matériels et Méthodes

IV. Matériels et méthodes

Le travail a été réalisé au sein des laboratoires de Biochimie Appliquée/ Génie biologique au niveau de l'université Abderrahmane Mira Bejaïa et Centre de Recherche Biotechnologie de Constantine. Le but de notre travail est l'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles et extraits phénoliques des sous-produits de fabrication de jus orange et mandarine.

IV.1. La matière végétale :

La présente étude est réalisée sur des déchet (écorce, pulpe et même pépins) de deux variétés d'agrumes à savoir *Citrus sinensis* (orange) et *Citrus reticulata* (la mandarine) récupérées au niveau d'Unité El-Kseur (Tchina) Groupe Cevital (16 décembre 2021) après un écrasement total du fruit. Les échantillons ont été transportés dans des boîtes couvertes avec des sacs noirs pour minimiser l'impact de la lumière sur la matière. Aussitôt arriver au laboratoire le déchet est conservé à -4°C . Le procédé d'extraction de jus et récupération du déchet est illustré dans la figure (06).

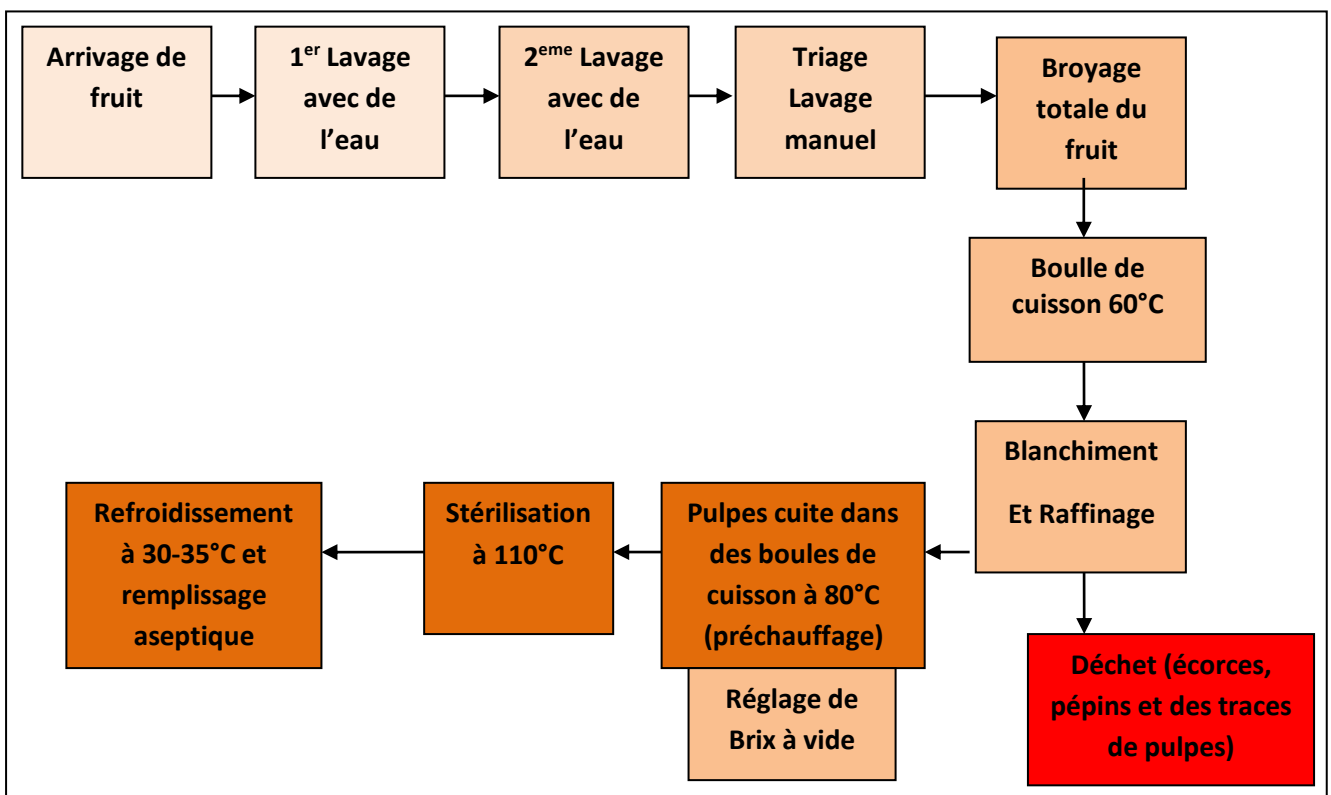


Figure (06) : Procédé d'extraction de jus et récupération des déchets

Une partie des déchets sont conservés afin d'extraire les huiles essentielles tandis que qu'une autre portion subie des étapes suivante : lyophilisation, broyage et tamisage dans le but d'avoir une poudre homogène pour l'extraction des composés phénoliques.

IV.1.1. Lyophilisation

Son principe est le séchage à basse température permettant de retirer l'eau continue dans un produit.

Le déchet congelé est lyophilisé (figure 07) dans un lyophilisateur (CHRIST ALPHA 1-2 LD France) pendant 48h.



Figure (07) : Lyophilisation du sous-produit d'agrumes

IV.1.2. Broyage

Le résidu sec obtenu a d'abord subi un broyage à l'aide d'un broyeur afin d'obtenir des poudres plus en moins fines

IV.1.3. Tamisage

Réaliser à l'aide d'un tamiseur électrique (RETSCH AS 200) à 125 μm de diamètre. La poudre obtenue a été conservé dans des boîtes en verre opaque et hermétique (figure07) conservé à 4°C.



Figure (08) : Poudre de mandarine et d'orange obtenue

IV.1.4. Détermination de l'humidité (H %) :

Une portion du déchet de fruit (10 g environ) est incubée dans une étuve à $103 \pm 2^\circ \text{C}$ jusqu'à un poids constant. La figure (09) illustre le dépôt du déchet dans l'étuve. L'humidité est exprimée en pourcentage massique de la partie comestible du fruit selon l'équation suivante :

$$\text{Humidité (\%)} = [(\text{Pds frais} - \text{Pds sec}) / \text{Pds frais}] * 100$$



Figure (09) : Dépôt du déchet dans l'étuve

IV.2. Extraction des huiles essentielles d'orange et de mandarine par Hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par Hydrodistillation. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique, la chaleur permet l'éclatement des sacs oléifères et la libération des molécules odorantes qu'ils contiennent. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotrope (**Bruneton 1993**). L'hydrodistillateur est représenté dans la figure (10)

IV.2.1. Mode opératoire

Une masse d'environ 800 à 900 g de la matière végétale est immergée dans environ 2l d'eau distillée, ce dernier est placé dans un chauffe ballon et porter à ébullition. La vapeur hétérogène libérée se condense et devient liquide au contact du froid dans le réfrigérant. Le réfrigérant est équipé d'une entrée et une sortie d'eau froide (environ 4°C) qui sert à la condensation de la vapeur. Le condensât est recueilli dans une ampoule à décanter pour séparer les deux phases l'huile et l'eau par différence de densité (**Bruneton 1993**). Les huiles essentielles ont été stockées au réfrigérateur.



Figure (10) : Extraction des huiles essentielles par Hydrodistillation

IV.2.2. Rendement d'extraction des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle (HE) est le rapport entre la masse HE récupérée et la masse du déchet d'agrumes utilisé. Le rendement est calculé selon la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{mHE}{mD} \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle.

mHE: Masse d'huile essentielle (g).

mD: Masse de déchet (g).

IV.3. Extraction des composés bioactifs des déchets de mandarine et orange

L'extraction assistée par micro-ondes est réalisée dans des conditions déjà optimisées dans une étude précédente. 0,212g et 0,124g de poudre des déchets de mandarine et orange respectivement, additionnés à 20 ml d'acétone sont introduites dans la chambre d'extraction. L'extraction dure 80s en utilisant la micro-onde de marque (MAXMO23S, MAXIPOWER), les puissances micro-ondes appliquées est de 300 W. La solution subit une centrifugation 5000rpm pendant 10min. L'extrait est récupéré par filtration à l'aide du papier filtre. La microonde utilisée est illustrée dans la figure (11).



Figure (11) : Microonde utilisée pour l'extraction des extraits phénoliques

IV.3.1. Taux d'extraction

$$T(\%) = \frac{(P1 - P0)}{E} \times 100$$

T: Taux d'extraction en composés phénoliques (%).

P1: Masse du verre de montre après séchage (g).

P0: Masse du verre de montre vide (g).

E : Masse de la poudre d'écorce (g).

IV.3.2. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques est déterminée selon la méthode décrite par **Özcan et al., (2021)**. 0,4 ml d'extrait sont mélangés avec 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (pendant 5 min). 10 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7,5%) sont additionnés puis on ajuste avec de l'eau distillé a un volume de 25ml, un blanc contenant tous les réactifs, excepté l'échantillon, est préparé dans les mêmes conditions. Après 1 heure d'incubation à l'obscurité, la lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 765 nm. La teneur des polyphénols totaux est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par 100 g de matière sèche d'échantillon (mg EAG/100g MS), par référence à une courbe d'étalonnage d'acide gallique.

IV.4. Evaluation des activités biologiques des huiles essentielles et extraits phénoliques

IV.4.1. Activités antioxydantes

IV.4.1.1. Activité antiradicalaire au DPPH

➤ Principe

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité antiradicalaire des antioxydants à piéger le radical libre DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle), de couleur violet qui absorbe à 517 nm, par le transfert de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle sur le DPPH[•] qui est transformé en une molécule stable DPPH-H de couleur jaune (Figure12).

L'activité antiradicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH[•], le BHA est utilisés comme standards antioxydant (**Blois 1958**).

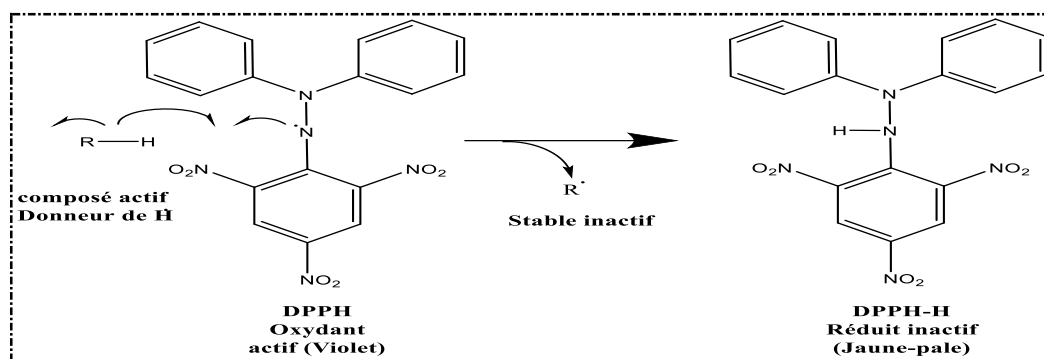


Figure (12) : Transformation du radical DPPH• en DPPH-H (Konan, Mamyrbékova-Békro et al. 2017)

➤ Mode opératoire

Sachant que toutes les opérations sont réalisées en triplicate, 40 μL de la solution d'extrait étudié dissout dans méthanol à différentes concentrations ont été ajoutés à 160 μL de DPPH fraîchement préparée à une concentration de (0,1 mM). Après une incubation de 30 min à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre le blanc correspondant. La lecture est faite par un lecteur de microplaques de marque Perkin Elmer (USA).

La capacité à piéger le radical DPPH a été calculée selon l'équation suivante:

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Les résultats ont été exprimés en valeur IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{ml}$) correspondant à la concentration d'inhibition de 50%.

IV.4.1.2. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

La méthode FRAP est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} sous forme de ferrocyanure de potassium de couleur bleue, (figure 13). L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 700 nm. Cette activité est déterminée par la méthode d'Oyaizu (1986) avec une petite modification.

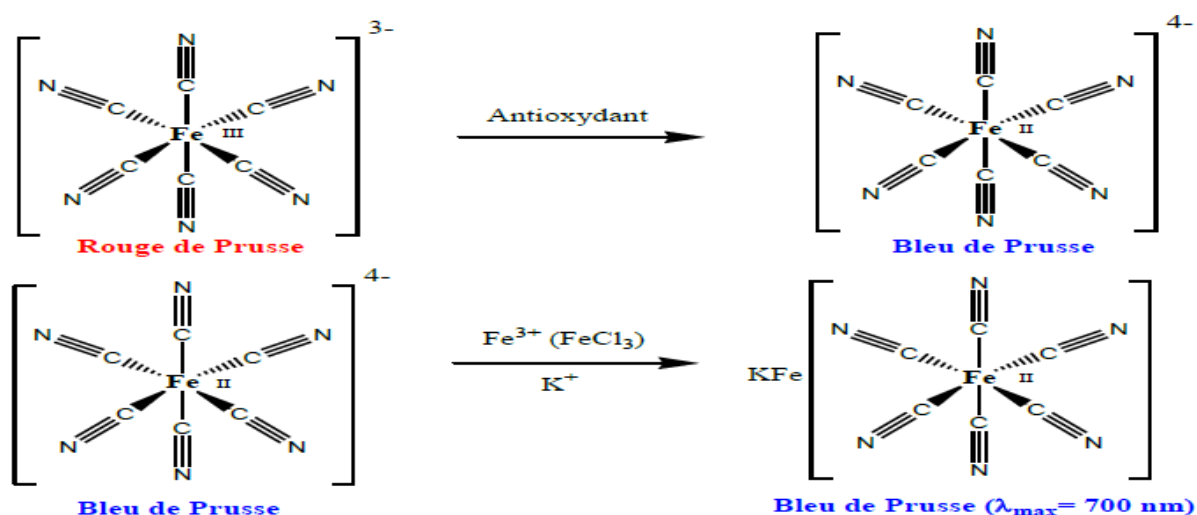


Figure (13) : Réduction de fer Fe^{3+} en Fe^{2+}

➤ Mode opératoire

10 μl de l'extrait à différentes concentrations ont été mélangé avec 40 μl d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 50 μl d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50 μL de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10%, 40 μL d'eau distillée et 10 μL de FeCl_3 à 0,1% sont additionnés. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 700nm. Une augmentation de l'absorbance est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits testés.

Les résultats ont été exprimés en valeur $A_{0.5}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) correspondant à l'absorbance 0,5.

IV.4.1.3. Activité Phenanthroline

L'activité de pouvoir réducteur (FRAP) et l'activité de la Phenanthroline s'appuie sur le même principe car cette dernière est un cas particulier de la première. Le pouvoir réducteur est déterminé par une simple mesure de l'absorbance à 510 nm. Seul le fer ferreux $\text{Fe}(\text{II})$ ou Fe^{2+} forme un complexe stable avec l'orthophénanthroline et donne une couleur orangée. On nomme ce complexe féroïen (Wieser 2007) (figure14). Cette réaction est rapide et hautement sensible (Tsfaldet, et al., 2004).

L'activité de Phenanthroline est déterminée par la méthode de (Szydłowska-Czerniak, et al., 2008).

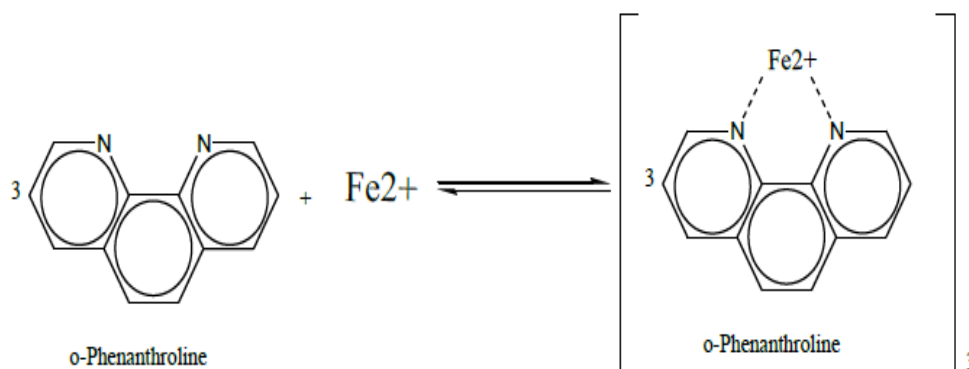


Figure (14): Formation de complexe Fe (II)-Phenanthroline

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 10 µl de l'extrait à différentes concentrations est déposé avec 50 µl de Chlorure de fer anhydre (FeCl₃ (0,2%)) (0.02g de FeCl₃ dans 10ml de H₂O), 30 µl de Phenanthroline (0,5%) (0.05g de 1,10-Phenanthroline dans 10ml de MeOH) et 110 µl de Méthanol(MeOH). Le mélange obtenu est incubé dans l'étuve à l'obscurité à 30°C pendant 20min et l'absorbance est mesurée à 510nm, un standard de référence est utilisé le (BHT).

IV.4.2. Les activités enzymatiques

IV.4.2.1. Activité antidiabétique

Activité inhibitrice de l'Alpha- Amylase est déterminée par la méthode de **Zengin, et al., (2014)** en utilisant iodine/potassium iodine.

➤ **Procédure :**

Dans une plaque à 96 puits, 25 µL d'échantillon préparé dans du méthanol à différentes concentrations ont été mélangés avec 50 µL d'une solution d'α- amylase (1U/ml) préparé dans un tampon phosphate (pH 6,9), le tout est incubé pendant 10 min à 37 ° C. La réaction a été initiée par l'addition de 50 µL d'une solution d'amidon à 0,1%. Le mélange réactionnel a été incubé pendant 10 min à 37 ° C. La réaction a été stoppée par l'addition de 25 µL HCl (1 M), suivie par l'ajout de 100 µL d'IKI. L'absorbance a été mesurée à 630 nm.

Calcul du % d'inhibition selon l'équation suivante :

$$\%INH = 1 - \left[\frac{(Ac-Ae)-(As-Ab)}{Ac-Ae} \right] \times 100$$

Sachant que :

- A_c : Absorbance (Amidon + IKI + HCL + Vol du solvant d'extrait + Vol tampon d'enz.).
- A_e : Absorbance (Enz + Amidon + IKI + HCL + Vol de solvant d'extrait).
- A_s : Absorbance (Enz + Extrait + Amidon + IKI + HCL).
- A_b : Absorbance (Extrait + IKI + 125 μ l de tampon).

IV.4.3. Activité antifongique :

L'activité inhibitrice des différents composés, sur la croissance du mycélium phytopathogène *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (FOL) souche 4287, est déterminée en mesurant la croissance radiale du champignon sur milieu PDA (Potato, D-glucose, Agar).

Un volume de 1 ml de solution de DMSO contenant un volume de nos échantillons à différentes concentrations à savoir pour H.E de mandarine une série de trois dilutions (mg d'échantillon dans 1ml de solution DMSO) a été préparée (135.5 mg/ml, 81.3 mg/ml et 54.2 mg/ml), pour H.E d'orange (135.5 mg/ml, 54.2 mg/ml et 27.1 mg/ml), ainsi une série de trois dilutions (10mg/ml, 5mg/ml et 2.5 mg/ml) a été préparée pour les composés phénoliques d'orange et de mandarine, à partir des solutions mères de 38mg d'échantillon dans 1ml d'eau pure (composés phénolique solubles dans l'eau et non-soluble dans la solution DMSO), chaque dilution est ajoutée à 100 ml de milieu PDA en surfusion (55-60 °C), puis réparti dans quatre boîtes de Pétri.

➤ Préparation du milieu PDA

300g de pomme de terre coupée en petit morceaux sont mitent dans un Erlenmeyer de 1.5L contenant de l'eau distillée, le mélange est porté à ébullition. Le liquide est filtré afin de séparer la pomme de terre et l'eau. 28g de D-glucose est ajouté au liquide récupéré, 21g d'agar est ajouté sous chauffage et agitation. Figure (15). Le dépôt du champignon est illustré dans la figure (16).

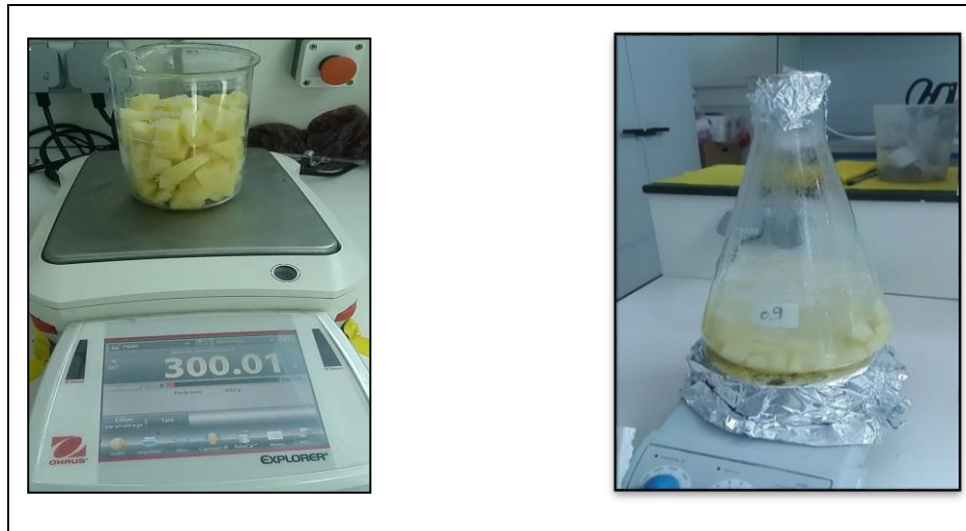


Figure (15) : Préparation du milieu PDA

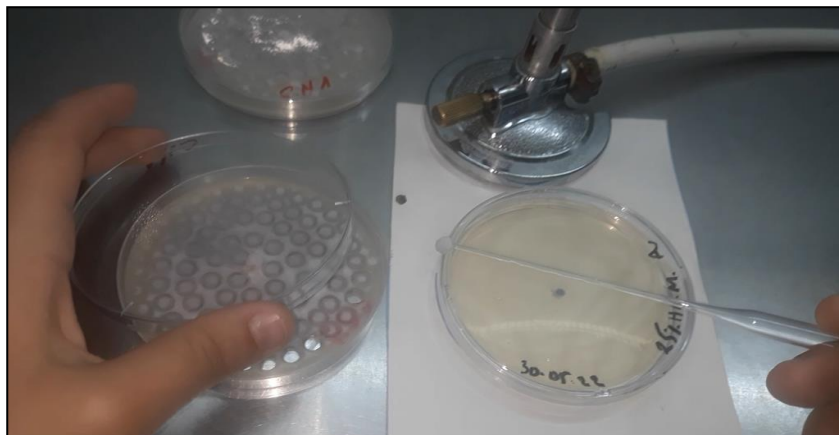


Figure (16) : Dépôts du champignon sur les milieux PDA

➤ **La mesure de l'activité :**

Un disque du mycélium de 5 mm de diamètre est prélevé sur une jeune culture fongique et est déposé aseptiquement au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA et le produit à tester. L'expérience est répétée 4 fois pour chaque traitement. De même, 1 ml de DMSO a été ajouté à 100 ml de milieu PDA, et a été considéré comme un contrôle positif. Le contrôle négatif contient le milieu PDA sans aucun autre produit. Méthode décrite selon (Song, et al., 2004).

Après 6 jours d'incubation à 25°C, la croissance mycélienne de l'agent phytopathogène est mesurée en mm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition

de la croissance de chaque champignon par chaque produit par rapport aux diamètres moyens des colonies de chaque champignon cultivé en milieu témoin. Ainsi, l'activité d'inhibition a été exprimée en pourcentage et a été calculée avec la formule selon **Dennis et al., (1971)**.

$$I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

I = taux d'inhibition en %

C = croissance radiale de l'agent phytopathogène en mm sur milieu PDA avec DMSO (contrôle)

T = croissance radiale, en mm, de l'agent phytopathogène sur milieu PDA contenant le complexe à tester.

➤ **Etude statistique:**

Une analyse descriptive des résultats des trois essais a été réalisée par une analyse de la variance (ANOVA) suivi du test de « Newman-Keuls » à l'aide du logiciel STATISTICA 5.5 Fr. Le degré de signification des données est estimé à la probabilité $p < 0,05$. Les coefficients de corrélation sont obtenus par l'analyse de régression linéaire à travers le coefficient de Pearson à la probabilité $p < 0,05$.

Chapitre V

Résultats et Discussion

V. Résultats et discussions

V.1. Humidité

Les taux d'humidité (H%) et de matière sèche (MS%) sont calculés et rapportés sur les histogrammes de la **figure (17)**.

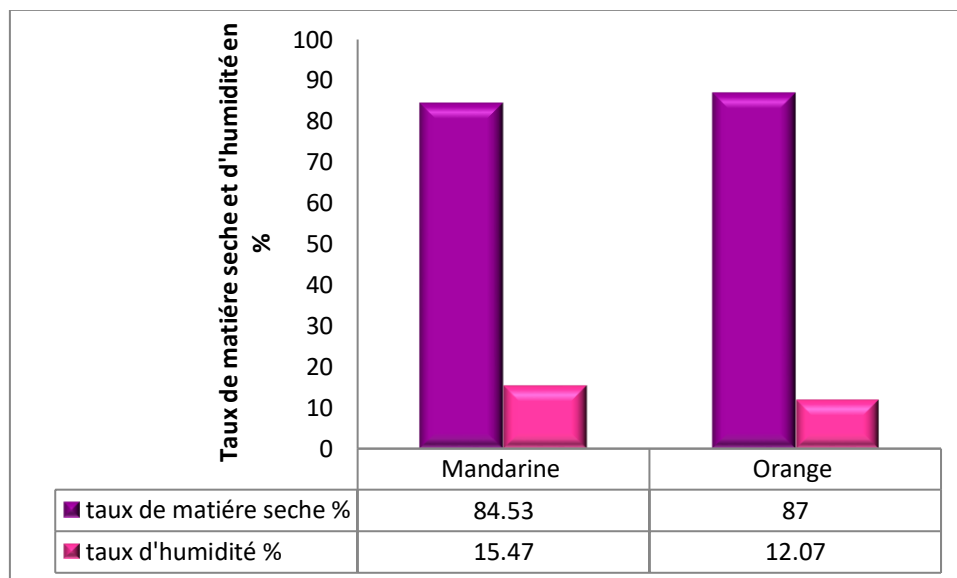


Figure (17) : Taux d'humidité et de matière sèche d'écorces de mandarine et d'orange

Les résultats obtenus en teneur d'eau sont de 15,47 % \pm 0,94 et 12,07 % \pm 0,53 pour la mandarine et l'orange respectivement. Par conséquent, le pourcentage de matière sèche de mandarine et d'orange sont supérieure 5 et 7 fois que sa teneur en eau (84,53 et 87%) respectivement.

Nos résultats sont inférieurs à ceux d'**Ofla et al., (2021)** pour lesquelles les valeurs varient de 19- 42,9%.

Les faibles teneurs freinent la prolifération microbienne et permettent une bonne conservation du matériel végétal.

Selon **Lavollay (1947)** les teneurs en humidité des sous-produits de la fabrication industrielle des jus d'agrumes (orange et mandarine) sont de 14%. Cependant, les caractéristiques physicochimiques peuvent être changées d'une manière significative, elles dépendent d'un certain nombre de facteurs, ainsi de la diversité entre les variétés et les facteurs environnementaux (climat, fertilité du sol et degré de maturation).

V.2. Rendement en huiles essentielles (HE)

Les rendements d'extraction en huile essentielle (HE) à partir de déchets d'orange et mandarine sont regroupés dans le **tableau IV**.

Tableau IV : Rendement d'extraction des huiles essentielles d'orange et de mandarine

Fruits	Rendement par rapport à l'écorce (m/m) en %
Orange	0,20
Mandarine	0,22

Le meilleur rendement enregistré est de 0,22% pour la mandarine, qui est légèrement supérieure à celui d'orange (0,20%). Nos résultats sont inférieurs à ceux de **Boudries (2016)** **Ferhat et al., (2006)** et ont respectivement des pourcentages de 0,63% en mandarine récolté de la wilaya de Bejaia (Oued Ghir) et 0,39% pour l'orange algérienne.

La teneur en huiles essentielles varie selon plusieurs facteurs influençant comme le génotype, la saison de récolte, l'origine, l'environnement, la méthode d'extraction. (**Asili et al., 2007; Blank et al., 2007; Bousbia et al., 2009; Hosni et al., 2010**).

Nos résultats concordent avec ceux de **Bourgou (2012)** en effet la mandarine possède le rendement le plus élevé en huiles essentielles, suivi du citron, puis l'orange et l'orange amer. Plusieurs études attestent que la maturation joue un rôle primordial dans le rendement en HE avec un rendement élevé au 2^{ème} stade de maturation (**Bouhali 2015**). D'autre part la méthode d'extraction du jus et la notre du déchet influe sur le rendement en HE.

V.3. Taux d'extraction des composés phénoliques

Avant toute analyse quantitative ou qualitative, le sous-produit doit subir une extraction (**Muanda 2010**). L'isolement du composé phénolique peut se faire facilement à partir de la matière végétale par extraction du solvant organique (l'acétone, méthanol, éthanol) (**Telli et al., 2010**).

Pour cette raison nous avons utilisé l'acétone à 30% pour l'extraction des composés bioactifs qui a été déjà optimisé dans une étude précédente. Nous avons obtenus un taux

d'extraction de 23,5% et 22,1% pour le déchet de la mandarine et l'orange respectivement. Les résultats sont présentés dans la **figure (21)**.

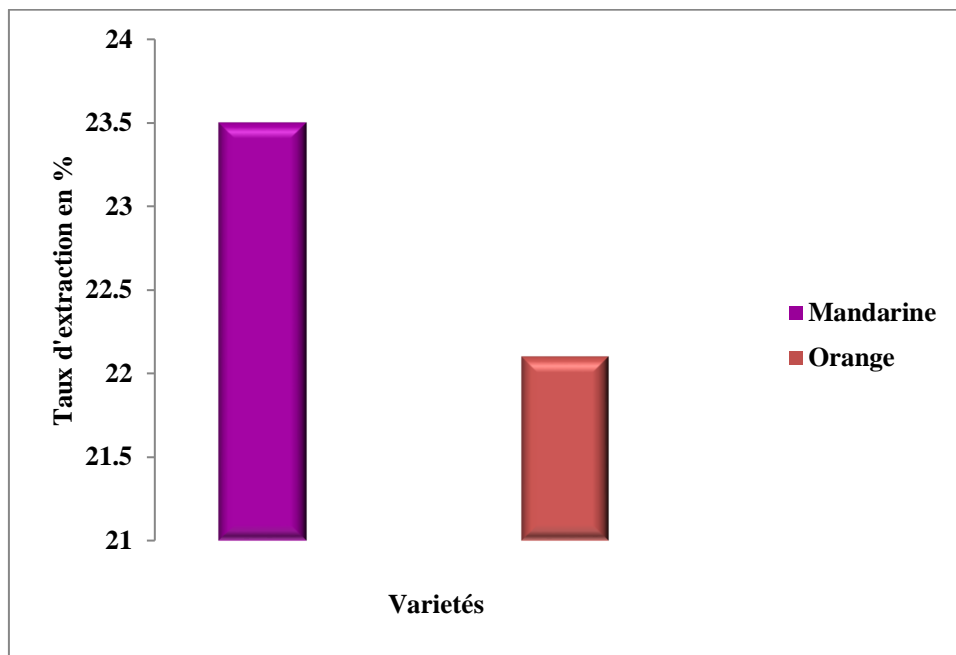


Figure (18) : Taux d'extraction de composé phénoliques à partir de déchets d'orange et de mandarine

Le séchage des écorces est recommandé avant l'étape d'extraction qui peut être réalisé généralement aussitôt après la collecte des échantillons. L'eau présente une source de dégradation des polyphénols par le phénomène d'oxydation. Par ailleurs, les cellules végétales renferment des enzymes susceptibles de modifier les composés phénoliques, en particulier les polyphénols oxydases via des réactions de brunissements enzymatiques (Ünal, 2007). Le séchage semble entraîner l'inhibition de ces enzymes et permet aussi de conserver les poudres pendant longtemps sans modification des caractéristiques (Owen *et al.*, 1999 ; Ribereau-Gayon, 1968).

L'extraction des composés phénoliques à partir du matériel végétal dépend de la quantité des composés solubilisés par le solvant, elle est influencée par leur structure chimique, la méthode d'extraction, la taille des particules formant l'échantillon, le temps et les conditions de stockage ainsi que la présence de substances interférentes (Naczka *et al.*, 2004).

La taille des particules végétales joue un rôle important dans l'extraction des composés phénoliques. Il est généralement admis que sous une forme broyée, la matière végétale présente une plus grande surface de contact avec le solvant, permettant ainsi d'accélérer la cinétique et d'améliorer le rendement (Escribano-Bailon, 2003 ; Bonnaille *et al.*, 2012).

V.4. Dosage des Polyphénols totaux

Les composés phénoliques sont largement distribués dans les agrumes. Ils contribuent aux qualités nutritionnelles et sensorielles des fruits et légumes ; ils sont responsables de leurs couleur, flaveur et goût.

Les résultats des teneurs en composés phénoliques des fruits étudiés sont représentés dans l'histogramme dans le **tableau V**.

Tableau V : Teneur en polyphénols de sous-produit d'orange et de mandarine

Variétés	Orange	Mandarine
Teneur en polyphénols totaux (Mg équivalent d'acide gallique/100 g MS)	1242,33 ± 21,19	1146,83 ± 8,57

* Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types, moyenne ± écart type (n=3).

Les teneurs en composés phénoliques totaux des sous-produits d'orange et de mandarine analysés présentent des différences significatives ($p < 0,05$). Pour l'orange une valeur de 1242,33 ± 21,19 mg de EAG/100g MS suivi par la mandarine a une valeur de 1146,23 ± 8,57 Mg de EAG/100g MS. La teneur en polyphénols totaux est élevée de 7,74 % pour l'orange par rapport à la mandarine.

Les teneurs en polyphénols totaux des variétés étudiées sont plus importantes que celles rapportées par **Gorinstein et al., (2001)** dont les valeurs sont de 154 mg/100g (orange) et ceux de **Tounsi et al., (2011)** pour le jus des différents agrumes (784,67 orange amer ; citron 333 ; sanguine 255 ; et celle de mandarine 106,22 Mg équivalent d'acide gallique/100 g MS). Des résultats semblables ont été obtenus par **Karman et al., (2009)** (13220 à 22320 Mg EAG/100g MS), et **Ghasemi et al., (2009 a)** pour les écorces des oranges douces a des valeurs qui varient de 13290 à 16000 Mg EAG/100g MS. D'après l'étude de **Lagha et al., (2013)** la concentration des écorces et les feuilles de l'orange double fine en polyphénols totaux est de 1228 et 1336 Mg EAG /100g MS respectivement. Une autre étude réalisée par **Ghasemi et al., (2009 b)** sur l'écorce de 13 variétés de citrus, ont exhibé des valeurs qui varient de 104,2 ; 161,7 et 172,1 mg EGA/g MS d'écorce selon les variétés de mandarine (*Citrus reticulata*), ces derniers sont supérieurs à nos valeurs.

Les différences observées entre les résultats des différents travaux et ceux obtenus dans la présente étude peuvent être liées aux conditions de culture, la saison, la méthode d'extraction, le degré de maturation des fruits et les conditions de l'environnement (Krzak, 2002 ; Balasundram *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2006).

La fluctuation des teneurs en polyphénols des différents sous-produits d'agrumes récupérés au niveau de l'industrie est probablement due au type d'extraction de jus et la nature du déchet. Ces derniers sont constitués d'écorces pulpes et pépins, en effet, dans le procédé d'extraction du jus c'est le fruit en entier qui subit un écrasement puis un chauffage ce qui entraîne une perte des polyphénols dans le sous-produit. Courbe d'étalonnage des composés phénoliques dans l'annexe V.

V.5. Activité Antioxydante

V.5.1. Pouvoir antiradicalaire (DPPH)

La méthode du DPPH est rapide, sensible et reproductible, elle est simple pour estimer l'activité antioxydante des extraits de fruits et de légumes (Du *et al.*, 2009). La capacité antioxydante des différents extraits de sous-produits d'orange et de mandarine ainsi deux standards Trolox et acide ascorbique en utilisant le test de DPPH a donné des valeurs d'IC₅₀ présentés dans le **tableau VI**.

Tableau VI : IC₅₀ de sous-produit d'orange et de mandarine en utilisant le test DPPH

	Huiles essentielle	Extraits phénoliques	Standards	
Sous-produits d'orange	2014,26 ± 0,76 ^a	686,23 ± 2,99 ^a	Trolox	5,12 ± 0,21
Sous-produits de mandarine	>5000	782,74 ± 14,18 ^b	Acide Ascorbique	4,39 ± 0,01

* Dans la même colonne les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types, moyenne ± écart type (n=3).

Les résultats de la présente étude montrent une différence significative ($p < 0,05$) entre les extraits phénolique et une différence significative ($p < 0,05$) entre les huiles essentielles.

L'extrait phénolique d'orange (*C. Sinensis*) s'est révélé être le plus actif entre les deux extraits avec un IC₅₀ de 686,23 ± 2,99 µg/ml tandis que l'extrait phénolique de mandarine (*C. Reticulata*) a un IC₅₀ de 782,74 ± 14,18 µg/ml. Huile essentielle d'orange (*C. Sinensis*) à marqué

la meilleure activité entre les deux huiles avec un IC_{50} de $2014,26 \pm 0,76$ $\mu\text{g/ml}$ par contre le HE de mandarine (*C. reticulata*) a clairement montré la plus faible capacité antioxydante. Le IC_{50} du Trolox et de l'acide ascorbique présentent de faible IC_{50} $5,12 \pm 0,21$ $\mu\text{g/mL}$ et $4,39 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Nos résultats sont plus élevés que ceux de da **Silva et al.**, (2018) d'écorces de variété Pomelo implantée au Brazil et ceux de **Ofla et al**, (2021) pour différentes variétés de Citrus implantés en Tunisie.

On ce qui concerne l'huile essentielle de l'orange nos résultats sont meilleur que ceux rapportés par **Bdraa et al.**, (2020) pour une huile essentielle de pamplemousse implantées à Bejaia. Parmi les huiles essentielles étudiées (**Teixeira et al.**, 2013), le pamplemousse et le citron ont révélé les plus faibles activités de piégeage des radicaux, cette dernière dépend principalement de la composition de l'huile. Ainsi, les fractions d'huiles essentielles d'origan ayant une teneur plus élevée en phénol ont eu une activité meilleure (**Olmedo et al.**, 2014). Les mêmes conclusions ont été notées par (**Olmedo et al.**, 2015) pour les huiles de laurier, de thymus, d'origan et de romarin.

L'activité antiradicalaire peut être affectée par de nombreux facteurs tels que, la polarité des solvants, la procédure d'extraction et la variation des espèces utilisées (**Ismail, 1996**).

V.5.2. Pouvoir réducteur par FRAP

Le pouvoir réducteur mesure la capacité d'un antioxydant à donner un électron (**Lim et al.**, 2007) ces antioxydants sont des piègeurs de radicaux libres et agissent sur certains précurseurs peroxydes et empêchent ainsi la réaction en chaîne de la peroxydation (**Chang et al.**, 2007). Une augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une augmentation de la capacité de réduction due à une augmentation de la formation du complexe (**Gülcin, 2010 ; Ribeiro et al.**, 2008).

Les résultats du pouvoir réducteur des composés phénoliques et des huiles essentielles des deux variétés d'agrume (orange et mandarine) analysées ainsi deux standards (Trolox et acide ascorbique), sont représentés dans le **tableau VII**.

Tableau VII : A0,5 des huiles essentielles et des l'extraits phénolique d'orange et de mandarine en utilisant le test FRAP

	Extraits phénoliques	Huiles essentielle	Standards	
Sous-produits d'orange	1585,00±69,46 ^a	4828,57±111,35 ^b	Trolox	5,25±0,20
Sous-produits de mandarine	1640,74±27,72 ^b	>5000	Acide Ascorbique	3,62±0,29

* Dans la même colonne les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types, moyenne ± écart type (n=3).

Les valeurs du pouvoir réducteur des extraits des deux variétés (orange et mandarine) étudiés présentent des différences significatives ($p \leq 0,05$).

L'EP d'orange (*C. Sinensis*) s'est révélé être le plus actif entre les deux extraits avec un IC50 de 1585,00±69,46µg/ml tandis que le CP de mandarine (*C. Reticulata*) a un IC50 de 1640±27,72 µg/ml. HE d'orange (*C. Sinensis*) à marqué la meilleure activité entre les deux huiles avec un IC50 de 4828,57±111,3 µg/ml par contre le HE de mandarine (*C. reticulata*) a clairement montré la plus faible capacité antioxydante. L'activité des standards Trolox et l'acide ascorbique sont de 5,25±0,20 µg/mL et 3,62±0,29 µg/mL respectivement.

L'activité antioxydante montrée par les extraits d'agrumes peut être due à la présence de phénols, flavonoïdes, caroténoïdes et d'acide ascorbique (Abeyasinghe et al., 2007 ; Gardner et al., 2000 ; Gorinstein et al., 2001 ; Gorinstein et al., 2004 ; Jayaprakasha et al., 2007 ; Yoo et al., 2004).

Plusieurs études précédentes ont désigné que la composition phytochimique et l'activité antiradicalaire peuvent varier considérablement selon les espèces et les cultivars d'agrumes (Guimaraes et al., 2010 ; Jayaprakasha et al., 2008 ; Ramful et al., 2011 ; Ye et al., 2011 Boudries et al., 2012 ; Goulas et al., 2012 ;).

En outre, la méthode d'extraction, le solvant utilisé, l'origine géographique, le temps de stockage, les parties d'agrumes, le stade de maturation (Guo et al., 2003 ; R Huang et al., 2007 ; Menichini et al., 2011 ; Plaza et al., 2011) pourraient également influencer cette capacité antioxydante. En effet, Halvorsen et al., (2002) ont rapporté que l'origine géographique influence l'activité antioxydante des échantillons de fruits prélevés dans différentes régions du monde.

V.5.3. Activité de réduction par la formation du complexe Fe²⁺-Phenanthroline

Ce test est basé sur la réduction du fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) par un composé riche en antioxydant. Le Fe²⁺ forme un complexe stable avec la Phenanthroline La couleur rouge orange issue de cette réduction est mesurée par spectrophotométrie à 510 nm. Le control positif dans ce test est le Trolox et l'acide ascorbique. Les résultats sont présentés dans le **tableau VIII**.

Tableau VIII : Valeurs des A_{0.5} dans le test Phenanthroline

	Huiles essentielle	Extraits phénoliques	Standards	
Sous-produits d'orange	>200	124,17±5,24 ^a	Trolox	5,21±0,27
Sous-produits de mandarine	>200	>200	Acide Ascorbique	3,08±0,02

* Dans la même colonne les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$),

* les barres verticales représentent les écarts types, moyenne ± écart type (n=3).

En comparaison avec d'autres extraits, EP de (*C. Sinensis*) a présenté la meilleure activité de réduction du fer avec A_{0.5} qui est de 124,17±5,24 µg/ml, l'activité est très faible par rapport a celle du Trolox et l'acide ascorbique (respectivement 5,21±0,27 et 3,08±0,02 µg/mL).

La capacité chélatrice est très importante, du fait qu'elle réduit la concentration des métaux de transition catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer sous forme de Fe²⁺ peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de FENTON, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxydes et alcoxydes qui peuvent à leur tour entretenir la réaction en chaîne. Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment une liaison de type σ avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique sous forme de Fe²⁺ par la formation d'un complexe stable. La configuration favorable structure-fonction des composés contenant deux ou plusieurs des groupes suivants : -OH, -COOH, -C=O, -NR₂, -S-

et -O- montre la capacité des échantillons à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} (**Rahmani et al., 2015**). On peut supposer que la faible activité réductrice des extraits testés est due à l'absence de ces composés.

Cette étude est la première dans l'évaluation de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe^{+2} -Phenanthroline des variétés étudiées.

V.6. Les activités enzymatiques

V.6.1. Evaluation de l'activité antidiabétique

L'activité antidiabétique des huiles essentielles et de composés phénoliques d'orange et de mandarine sont testées par l'inhibition de l'enzyme alpha-amylase (α -amylase).

L'activité inhibitrice d'alpha amylase des différents extraits étudiés a montré que HE de mandarine est le plus actif entre les extraits analysés avec un taux d'inhibition de $19,53 \pm 1,59\%$, suivi par le HE d'orange avec un taux d'inhibition de $16,40 \pm 0,37\%$. La valeur la plus faible du taux d'inhibition est obtenu par le composé phénolique d'orange par un taux d'inhibition de $7,27 \pm 0,05\%$. Nos résultats sont inférieurs à ceux de Benayad et al., (2021) qui présentent des taux d'inhibition élevés plus de 50 % pour des concentrations de 0,5 et 1 mg/ml d'écorces de *Citrus aurantium*, d'autre part nos résultats sont proches de ceux de **Schiano et al., (2021)** qui ont trouvés des IC 50 de 8 mg/ml pour les sous-produits de nectarine

Comme le rapporte la littérature, des composés tels que les dérivés de l'acide quinique et les flavonols mono et diglycosylés (par exemple, l'acide néochlorogénique, l'acide et la rutine) sont étroitement liés à l'inhibition de l'alpha -amylase (**Sun, et al., 2019**).

L'extrait d'écorces de mandarine (*Citrus reticulata*) a présenté une anti-hyperglycémie et une anti-hyperinsulinémie chez des souris nourries par un régime riche en graisses (**Guo et al. 2016**). Les auteurs ont rapporté que l'extrait d'écorces de *Citrus reticulata* a réduit de manière significative le taux de glucose sanguin chez les souris nourries avec l'extrait d'écorce.

De même, l'extrait d'écorce réduit significativement le taux d'insuline plasmatique chez les souris nourries avec l'extrait d'écorce. En outre, Les écorces de (*Citrus reticulata*) et d'orange (*Citrus sinensis*) ont été signalées comme contenant des niveaux élevés de polyméthoxyflavones, qui ont été démontrées comme possédant des propriétés antidiabétiques (**Schiano, et al., 2022**).

L'inhibition in vitro de l'activité α -amylase pourrait être attribuée au contenu phénolique des écorces d'agrumes. Les flavonoïdes des agrumes ont été signalés pour réduire les niveaux

de glucose chez les patients diabétiques via l'inhibition de l'activité α -amylase (Benayad, et al., 2021).

V.7. Activité antifongique

Les résultats de l'activité antifongique des extraits phénoliques et des huiles essentielles d'agrumes à différentes concentrations sur milieu PDA indiquent que celles-ci exercent une action inhibitrice sur la croissance du *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (FOL) et ils sont résumés dans le **tableau IX**.

Tableau IX : Effet in vitro de différente concentration d'huiles essentielles et des extraits phénoliques de l'orange et de mandarine sur la croissance mycélienne de FOL

Echantillons		Croissance radial (cm)	
Temoins	T+	6	Taux d'inhibition (%)
	T-	5,975	
	HEO 27,1mg/ml	6,275	-4,58
	HEO 54,2mg/ml	6,616	-10,26
	HEO 135,2mg/ml	6,533	-8,88
Huiles essentielles	HEM 54,2mg/ml	5,48	8,66
	HEM 81.3mg/ml	5,455	9,08
	HEM 135,5mg/ml	5,1	15
	EXO 2,5mg/ml	4,6	23,33
	EXO 05mg/ml	5,65	5,83
Extraits phénoliques	EXO 10mg/ml	6,4	-6,66
	EXM 2,5mg/ml	6,35	-5,83
	EXM 05mg/ml	5,925	1,25
	EXM 10mg/ml	6,66	-11

D'après les résultats on observe l'extraits phénolique d'orange à 2.5 mg/ml a donné le plus grand taux d'inhibition (23,33%), suivi du l'huile essentielle de mandarine à 135,5 mg/ml avec un taux d'inhibition de 15%, puis l'huile essentielle de mandarine à 54.2 mg/ml (10%). En revanche le plus faible taux d'inhibition est obtenu par l'extrait phénolique de mandarine à 10mg/ml (-11% avec un diamètre de croissance du mycélium de 6,6 cm).

Hamdani et al., (2017) ont montré qu'avec les huiles essentielles de mandarine (*Citrus reticulata*), l'inhibition de la croissance mycélienne a été complète (PIc de 100 %) avec les concentrations allant de 0,1 à 1 mg/ml pour l'espèce testée du genre *Fusarium*.

La littérature rapporte le pouvoir antifongique qu'expriment les huiles essentielles des citrus (Sharma et *al.*, 2008 ; Phillips, C.A et *al.*,2012). Leur pouvoir inhibiteur est important avec l'augmentation de la concentration. Et c'est le cas dans notre étude (résultats de HE de mandarine).

De nombreux auteurs (**Caccioni, D.R et al.,1998 ; Uribe, S et al.,1985**) relient leur pouvoir fongicide à la composition chimique et annoncent qu'il peut être corrélé positivement aux composants phytochimiques tels que les monoterpènes. Beaucoup de travaux rapportent la richesse des huiles essentielles des citrus en monoterpènes. Ce sont des composés apolaires doués d'un grand pouvoir pénétrant (**Mishra AK et al., 1994**).

Conclusion Générale

Conclusion générale

Les *Citrus* « agrumes » sont une source fiable des principes actifs connus pour son pouvoir antioxydant, et leurs propriétés thérapeutiques. Ces propriétés sont recherchées dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation biotechnologique des coproduits d'agrumes par l'extraction des huiles essentielles (HEs) et des extraits phénoliques et déterminer leurs activité biologique, enzymatique et antifongique dans le but de remplacer les substances synthétiques par des substances naturelles.

L'hydrodistillation nous a permet d'extraire les huiles essentielles à partir de déchets de deux variétés d'agrumes à savoir l'orange (*Citrus sinensis*) et la mandarine (*Citrus reticulata*) avec un rendement de 0,20% et 0,22% respectivement. Et l'extraction des composés phénolique a été assistée par la micro-onde avec un taux d'extraction de 23,5% pour la mandarine et 22,1% pour l'orange.

Le dosage des polyphénols indique que la teneur en polyphénols totaux est de 1242,33±21,19 Mg de EAG/100 MS pour l'extrait d'orange et 1146,83±8,5719 Mg de EAG/100 MS pour l'extrait de mandarine.

L'évaluation de l'activité antioxydante des HEs et des extraits phénoliques étudiés, a été faite par quatre méthodes (piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur par frappe, par la formation du complexe Fe⁺²-Phenanthroline et la détermination de la valeur de l'ORAC), a montré que les HEs et les extraites étudier ont un potentiel antioxydant *in-vitro* intéressant.

L'évaluation de l'activité enzymatique et antifongique des HEs et des extraits phénoliques étudiés a manifestée globalement une faible activité. La méthode d'extraction du jus aurait un impact sur la qualité des huiles essentielles et des extraits phénoliques, leurs compositions en biomolécules et surtout leurs activités biologiques.

L'évaluation de la cytotoxicité a montré que les huiles essentielles d'orange et de mandarine ont un effet larvicide à une concentration de 25mg/ml.

Cette étude ouvre une voie de recherche valorisante pour ces coproduits d'agrumes. Ainsi il est possible d'appliquer ces HEs et ces composés phénoliques comme des agents conservateurs pour

certaines aliments ou comme des agents de désinfection. La disponibilité de la matière première (déchets agrumicoles) permet la production en masse des HEs et des extraits.

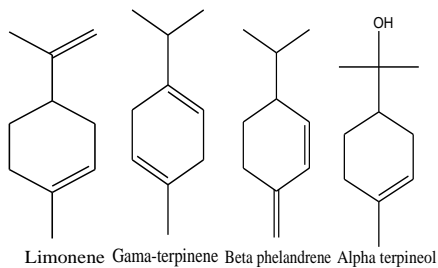
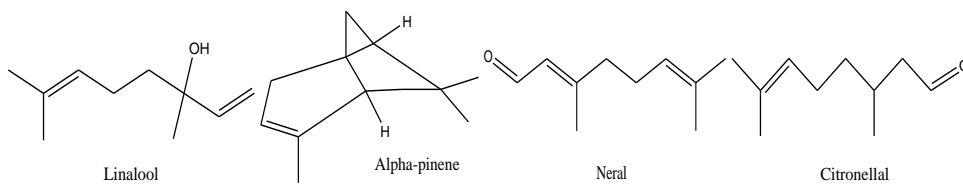
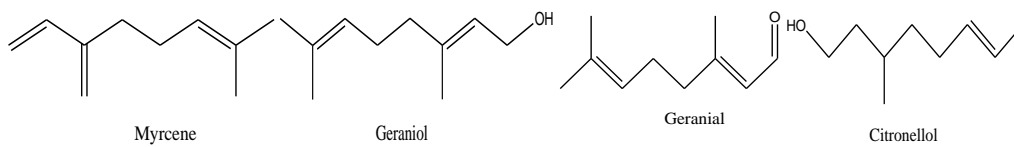
En perspectives, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur les coproduits d'agrumes.

Il serait donc intéressant de pousser et approfondir ce travail par :

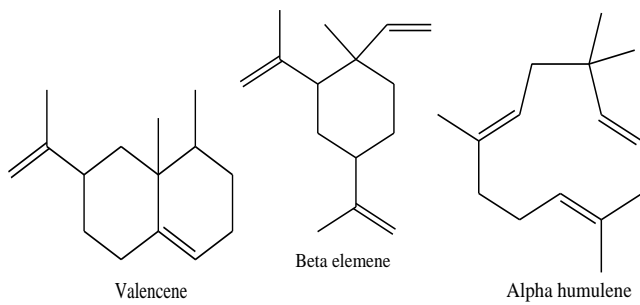
- Etudier l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits phénoliques d'orange et de mandarine.
- Etendre l'étude sur d'autres activités biologiques telles que l'activité anticancéreuse, anti-inflammatoire et anti-Alzheimer.
- Caractérisation des extraits phénoliques.

ANNEXES

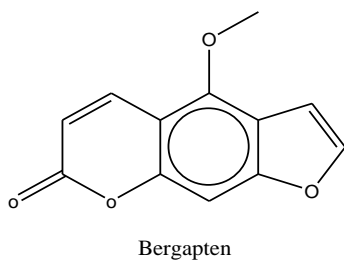
Annexe II



Structure des monoterpènes.



Structure des sesquiterpènes.



Structure de la coumarine.

Figure (19) : Principaux constituants des essences d'agrumes et des huiles essentielles (Praloran 1971).

Annexe V

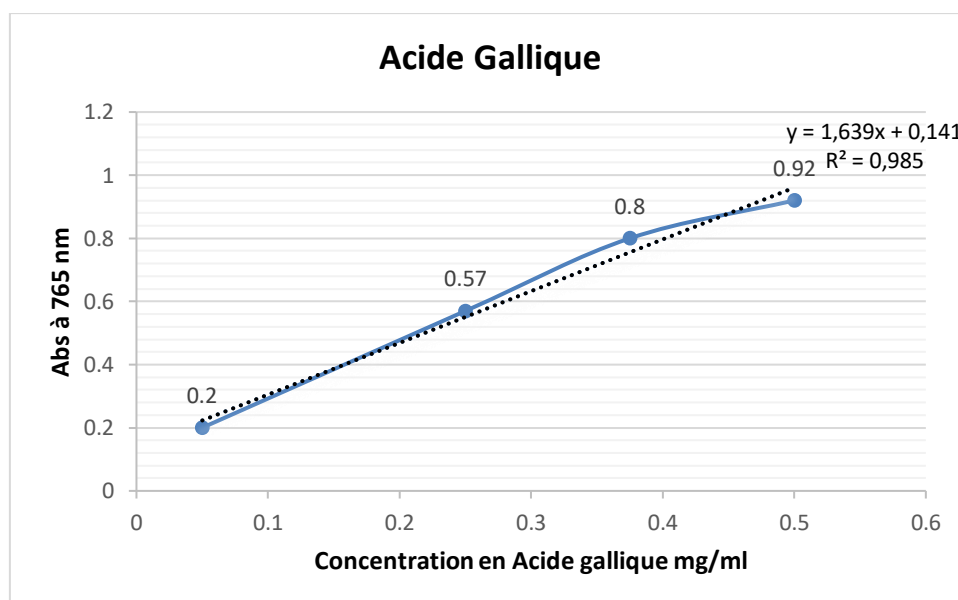


Figure (20) : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques (Concentration en Acide gallique mg/ml)

Annexe V

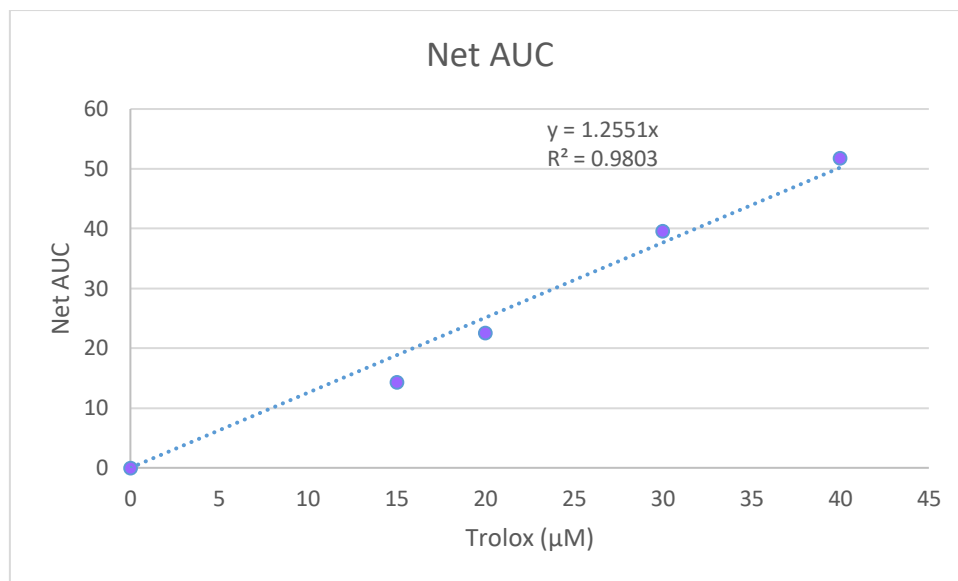


Figure (21) : Courbe d'étalon du Trolox

A

- Arena, M. E., M. R. Alberto, et al. (2021). "Potential use of Citrus essential oils against acute respiratory syndrome caused by coronavirus." *Journal of Essential Oil Research* **33**(4): 330-341.
- Abeyasinghe, D., X. Li, et al. (2007). "Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species." *Food Chemistry* **104**(4): 1338-1344.
- Alfred Ngenge, T., S. Kucukaydin, et al. (2021). "Evaluation of enzyme inhibition and anti-quorum sensing potentials of *Melaleuca alternifolia* and *Citrus sinensis* essential oils." *Natural Product Communications* **16**(9): 1934578X211044565.
- Ali, A. M., D. S. Mohamed, et al. (2017). "Antifeedant activity and some biochemical effects of garlic and lemon essential oils on *Spodoptera littoralis* (Boisduval)(Lepidoptera: Noctuidae)." *Journal of Entomology and Zoology Studies* **5**(3): 1476-1482.
- Asili, J., G. Asghari, et al. (2007). "INFLUENCE OF EXTRACTION METHODS ON THE YIELD AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF *PLATYCLADUS ORIENTALIS* (L.) FRANCO." *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* **2**(1): 25-33.

B

- Benayad, O., Bouhrim, M., Tiji, S., Kharchoufa, L., Addi, M., Drouet, S., ... & Mimouni, M. (2021). Phytochemical profile, α -glucosidase, and α -amylase inhibition potential and toxicity evaluation of extracts from *Citrus aurantium* (L) peel, a valuable by-product from Northeastern Morocco. *Biomolecules*, *11*(11), 1555.
- BOUNASLA, Y. K. (2008). UTILISATION DES RUTACEAE DANS LA LUTTE ANTIBACTERIENNE, Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila.
- Beecher, G. R. (2003). "Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake." *The Journal of nutrition* **133**(10): 3248S-3254S.
- Bruneton, J. (1999). "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd." Lavoisier, Paris **1120**.
- Blois, M. S. (1958). "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical." *Nature* **181**(4617): 1199-1200.
- Bruneton, J. (1993). *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales*.

- Balasundram, N., K. Sundram, et al. (2006). "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses." *Food Chemistry* **99**(1): 191-203.
- Blank, A. F., A. G. Costa, et al. (2007). "Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil." *Revista Brasileira de Farmacognosia* **17**: 557-564.
- Bonnaillie, C., M. Salacs, et al. (2012). "Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.)." *Revue de génie industriel* **7**: 35-45.
- Boudries, H. (2016). "Caractérisation physico-chimique et activités antioxydantes de quelques variétés d'agrumes algériennes. Cas de quelques variétés de clémentines."
- Boudries, H., K. Madani, et al. (2012). "Pulp antioxidant activities, mineral contents and juice nutritional properties of Algerian Clementine Cultivars and Mandarin." *African Journal of Biotechnology* **11**(18): 4285-4267.
- Bourgou, S., F. Z. Rahali, et al. (2012). "Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation." *The Scientific World Journal* **2012**.
- Bousbia, N., M. A. Vian, et al. (2009). "A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity." *Journal of food Engineering* **90**(3): 409-413.

C

- Chen, Y., T. J. Barzee, et al. (2019). *Citrus. Integrated processing technologies for food and agricultural by-products*, Elsevier: 217-242.
- Carson, C. F. and K. A. Hammer (2011). "Chemistry and bioactivity of essential oils." *Lipids Essent Oils Antimicrob Agents* **25**: 203-238.
- Couic-Marinier, F. and A. Lobstein (2013). "Mode d'utilisation des huiles essentielles." *Actualités pharmaceutiques* **52**(525): 26-30.
- Caccioni DRL, Guizzardi M, Biondi DM, et al (1998) Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Inter J Food Microbiol* **43**: 73–9
- Cano, A., A. Medina, et al. (2008). "Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars." *Journal of Food Composition and Analysis* **21**(5): 377-381.

Chang, H.-C., G.-J. Huang, et al. (2007). "Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as "Gusuibu"." *Botanical studies* **48**(4): 397-406.

D

Dosoky, N. S. and W. N. Setzer (2018). "Biological activities and safety of Citrus spp. essential oils." *International Journal of Molecular Sciences* **19**(7): 1966.

Decker, E. A., K. Warner, et al. (2005). "Measuring antioxidant effectiveness in food." *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(10): 4303-4310.

Djenane, D., J. A. Beltrán, et al. (2016). "Influence of vacuum-ageing duration of whole beef on retail shelf life of steaks packaged with oregano (*Origanum vulgare* L.) active film under high O₂." *Journal of food science and technology* **53**(12): 4244-4257.

Du, G., M. Li, et al. (2009). "Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and vitamin C in Actinidia fruits." *Food Chemistry* **113**(2): 557-562.

Da Silva, E. S., Oliveira, B. G., Pereira, A. C. H., Pimentel, E. F., Pezzuto, J. M., Lenz, D., ... & Endringer, D. C. (2018). Induction of NAD (P) H: Quinone reductase 1 (QR 1) and antioxidant activities in vitro of 'Toranja Burarama'(Citrus maxima [Burm.] Merr.). *Phytotherapy Research*, 32(10), 2059-2068.

E

Escribano-Bailon, M. (2003). "Polyphenol extraction from foods." *Methods in polyphenol analysis*.

F

Fung, T. K., B. W. Lau, et al. (2021). "Therapeutic effect and mechanisms of essential oils in mood disorders: Interaction between the nervous and respiratory systems." *International Journal of Molecular Sciences* **22**(9): 4844.

Fleuriet, A., C. Uhel, et al. (1996). "Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme." *Acta botanica gallica* **143**(6): 493-500.

Ferhat, M. A., B. Y. Meklati, et al. (2006). "An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel." *Journal of Chromatography A* **1112**(1-2): 121-126.

Franco, O. L., D. J. Rigden, et al. (2002). "Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection." *European journal of biochemistry* **269**(2): 397-412.

G

Gardner, P. T., T. A. White, et al. (2000). "The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices." *Food Chemistry* **68**(4): 471-474.

Ghafar, M., K. N. Prasad, et al. (2010). "Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species." *African Journal of Biotechnology* **9**(3).

Ghasemi, K., Y. Ghasemi, et al. (2009) a. "Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues." *Pak J Pharm Sci* **22**(3): 277-281.

Ghasemi, K., Y. Ghasemi, et al. (2009) b. "Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues." *Pak J Pharm Sci* **22**(3): 277-281.

Gorinstein, S., O. Martín-Belloso, et al. (2001). "Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits." *Food Chemistry* **74**(3): 309-315.

Gorinstein, S., Z. Zachwieja, et al. (2004). "Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid." *LWT-Food Science and Technology* **37**(3): 337-343.

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

Green, C. O., A. O. Wheatley, et al. (2007). "Determination of polymethoxylated flavones in peels of selected Jamaican and Mexican citrus (*Citrus* spp.) cultivars by high-performance liquid chromatography." *Biomedical chromatography* **21**(1): 48-54.

Guimarães, R., L. Barros, et al. (2010). "Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange." *Food and Chemical Toxicology* **48**(1): 99-106.

Gülçin, İ. (2010). "Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight." *Innovative food science & emerging technologies* **11**(1): 210-218.

Guo, C., J. Yang, et al. (2003). "Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay." *Nutrition research* **23**(12): 1719-1726.

Guo J, Tao H, Cao Y et al (2016) Prevention of Obesity and Type 2 Diabetes with Aged Citrus Peel (Chenpi) Extract. *J Agric Food Chem* 64:2053–2061

H

- Huang, Y.-S. and S.-C. Ho (2010). "Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel." *Food Chemistry* **119**(3): 868-873.
- Hayat, K., X. Zhang, et al. (2010). "Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity." *Separation and Purification Technology* **73**(3): 371-376.
- Huang, D., B. Ou, et al. (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(6): 1841-1856.
- Hamdani, F. Z., & Allem, R. (2017). Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de Citrus vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium* sp in vitro. *Phytothérapie*, 15(5), 263-266.
- Halvorsen, B. L., K. Holte, et al. (2002). "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants." *The Journal of nutrition* **132**(3): 461-471.
- Hosni, K., N. Zahed, et al. (2010). "Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence." *Food Chemistry* **123**(4): 1098-1104.
- Huang, D., B. Ou, et al. (2005). "The chemistry behind antioxidant capacity assays." *Journal of agricultural and food chemistry* **53**(6): 1841-1856.
- Huang, R., R. Xia, et al. (2007). "Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation." *Scientia Horticulturae* **113**(2): 166-172.

I

- Ismail, A.-M. S. (1996). "Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains." *Process Biochemistry* **31**(7): 645-650.

J

- Johnson, T. M. (2001). La production de jus d'agrumes et l'application des technologies au marché des agrumes frais. Symposium sur les agrumes Chine/FAO.

- Jayaprakasha, G., B. Girenavar, et al. (2008). "Radical scavenging activities of Rio Red grapefruits and Sour orange fruit extracts in different in vitro model systems." *Bioresource technology* **99**(10): 4484-4494.
- Jayaprakasha, G. and B. S. Patil (2007). "In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange." *Food Chemistry* **101**(1): 410-418.

K

- Konan, V. K., J. A. Mamyrbékova-Békro, et al. (2017). "Composition organique et activité anti-radicalaire de *Bombax costatum* de Côte d'Ivoire." *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine* **18**(2): 21-27.
- Karman, G., G. Yosef, et al. (2009). "Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues."
- Kimball, D. A. (1999). *Research and Development: The Future of Citrus Processing*. Citrus Processing, Springer: 423-433.

L

- Lagha-Benamrouche, S. (2018). "Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles." *Revue Nature et Technologie* **10**(1): 112-115.
- L.Krzak (2002). "mythe ou réalité Dieta." *Les vertus de la pomme* **29**: 27-28.
- Lagha-Benamrouche, S. and K. Madani (2013). "Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves." *Industrial Crops and Products* **50**: 723-730.
- Lavollay, J. (1947). "Les sous-produits de l'industrie des jus de fruits." *Fruits* **2**(11): 354-359.
- Li, B., B. Smith, et al. (2006). "Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method." *Separation and Purification Technology* **48**(2): 182-188.
- Lim, Y. Y., T. T. Lim, et al. (2007). "Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study." *Food Chemistry* **103**(3): 1003-1008.

M

- Mitropoulou, G., E. Fitsiou, et al. (2017). "Citrus medica essential oil exhibits significant antimicrobial and antiproliferative activity." *LWT* **84**: 344-352.
- 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, Université de Lorraine.
- Martínez, M., Yáñez, R., Alonsó, J. L., & Parajó, J. C. (2010). "(2010). Chemical production of pectic oligosaccharides from orange peel wastes." *Industrial and Engineering Chemistry Research***49**.
- Menichini, F., M. R. Loizzo, et al. (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.
- Mishra AK, Dubey NK (1994) Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *App Environ Microb* 60 : 1101–5
- Muanda, F. N. (2010). "Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques." Université Paul Verlaine-Metz: 238.

N

- Nannapaneni, R., V. I. Chalova, et al. (2009). "Campylobacter and Arcobacter species sensitivity to commercial orange oil fractions." *International journal of food microbiology***129**(1): 43-49.

O

- Olfa, T., Gargouri, M., Akrouti, A., Brits, M., Gargouri, M., Ben Ameer, R., ... & Allouche, N. (2021). A comparative study of phytochemical investigation and antioxidative activities of six citrus peel species. *Flavour and Fragrance Journal*, *36*(5), 564-575

- Oussalah, M., S. Caillet, et al. (2006). "Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat." *Meat science* **73**(2): 236-244.
- Oyaizu, M. (1986). "Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine." *The Japanese journal of nutrition and dietetics* **44**(6): 307-315.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill, et al. (2001). "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe." *Journal of agricultural and food chemistry* **49**(10): 4619-4626.
- Owen, P. L. and T. Johns (1999). "Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout." *Journal of ethnopharmacology* **64**(2): 149-160.

P

- Panwar, D., P. S. Panesar, et al. (2021). "Recent trends on the valorization strategies for the management of citrus by-products." *Food Reviews International* **37**(1): 91-120.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon H (2001). "Les antioxydants dans les aliments." *Les Applications pratiques*.
- Praloran, J. (1971). "Les agrumes. Techniques agricoles et Productions tropicales. Paris, France, G." P. Maisonneuve & Larose.
- Plaza, L., I. Crespo, et al. (2011). "Impact of minimal processing on orange bioactive compounds during refrigerated storage." *Food Chemistry* **124**(2): 646-651.
- Phillips CA, Laird K, Allen SC (2012) The uses of Citri-V™® - Year antimicrobial citrus essential oil vapor for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus Niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. *Food Res Int* 47: 310–4

R

- Rezzadori, K., S. Benedetti, et al. (2012). "Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products." *Food and bioproducts processing* **90**(4): 606-614.
- Ruiz, B. and X. Flotats (2014). "Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview." *Waste management* **34**(11): 2063-2079.
- Richter, G. (1993). "Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie."

- Ramful, D., E. Tarnus, et al. (2011). "Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps." *Food research international* **44**(7): 2088-2099.
- Ribeiro, S., L. Barbosa, et al. (2008). "Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties." *Food Chemistry* **110**(3): 620-626.
- Ribèreau-Gayon, P. (1968). "Propriétés chimiques des phénols. Applications aux produits naturels." *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris, France. pp: 28-57.
- Ribèreau-Gayon, P. (1968). "Notion générale sur les composés phénoliques." *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Dunod. pp: 1-40.
- Rolland, Y. (2004). "Antioxydants naturels végétaux." *Oléagineux, Corps gras, Lipides* **11**(6): 419-424.
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological research*, **163**(3), 337-344.

S

- Sun, L.; Warren, F.J.; Gidley, M.J. Natural products for glycaemic control: Polyphenols as inhibitors of alpha-amylase. *Trends Food Sci. Technol.* 2019, **91**, 262–273. [CrossRef]
- Schiano, E., Piccolo, V., Novellino, E., Maisto, M., Iannuzzo, F., Summa, V., & Tenore, G. C. (2022). Thinned Nectarines, an Agro-Food Waste with Antidiabetic Potential: HPLC-HESI-MS/MS Phenolic Characterization and In Vitro Evaluation of Their Beneficial Activities. *Foods*, **11**(7), 1010.
- Sharma, K., N. Mahato, et al. (2017). "Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches." *Nutrition* **34**: 29-46.
- Solari, M.-A. (2019). "Stress et anxiété, recours aux huiles essentielles." *Actualités pharmaceutiques* **58**(590): 29-32.
- Song, W., L. Zhou, et al. (2004). "Tomato Fusarium wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system." *Crop protection* **23**(3): 243-247.
- Szydłowska-Czerniak, A., C. Dianoczki, et al. (2008). "Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods." *Talanta* **76**(4): 899-905.

- Singleton, V. L., R. Orthofer, et al. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, Elsevier. **299**: 152-178.
- Sayah, M., H. Taouda, et al. (2013). "Valorisation des déchets industriels d'agrumes par l'extraction des huiles essentielles Valuation of industrial citrus waste by essential oils extraction." **3**: 124-129.

T

- Teuscher, E., R. Anton, et al. (2005). *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles*, Tec & Doc.
- Tesfaldet, Z. O., J. F. van Staden, et al. (2004). "Sequential injection spectrophotometric determination of iron as Fe (II) in multi-vitamin preparations using 1, 10-phenanthroline as complexing agent." *Talanta* **64**(5): 1189-1195.
- Telli, A., N. Mahboub, et al. (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.
- Tounsi, M. S., W. A. Wannes, et al. (2011). "Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**(1): 142-151.

U

- Ünal, M. Ü. (2007). "Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*)." *Food Chemistry* **100**(3): 909-913.

V

- van der Sluis, A. A., M. Dekker, et al. (2001). "Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions." *Journal of agricultural and food chemistry* **49**(8): 3606-3613.

W

- Willox J-K., C. G.-L. e. L. S. (2003). "Oranges and cardiovascular health." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **43**: 13-18.
- Wieser, M. (2007). "Atomic weights of the elements 2005." *Journal of physical and chemical reference data* **36**(2): 485-496.

X

- Xu, G., X. Ye, et al. (2008). "Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuoyou) during maturity." *Journal of Food Composition and Analysis* **21**(5): 382-389.

Y

- Ye, X.-Q., J.-C. Chen, et al. (2011). "Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits." *Food Chemistry* **124**(4): 1561-1566.
- Yoo, K. M., K. W. Lee, et al. (2004). "Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of Yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) during maturation and between cultivars." *Journal of agricultural and food chemistry* **52**(19): 5907-5913.

Z

- Zema, D., P. Calabrò, et al. (2018). "Valorisation of citrus processing waste: A review." *Waste management* **80**: 252-273.
- Zema, D., P. Calabrò, et al. (2018). "Valorisation of citrus processing waste: A review." *Waste management* **80**: 252-273.
- Zohra, M. (2005). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de region de tlemcen Thèse de magister, université abou bakr belkaid.
- Zengin, G., C. Sarikurkcu, et al. (2014). "A comprehensive study on phytochemical characterization of

Haplophyllum myrtifolium Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes." Industrial Crops and Products

53: 244-251.

Résumé : Notre étude rentre dans le cadre d'un programme de recherche qui vise la mise en valeur des déchets solides des unités industrielles productrices des jus d'agrumes par l'extraction des huiles essentielles (H.Es) et des extraits phénoliques de deux variétés d'agrumes à savoir l'orange (*Citrus sinensis*) et la mandarine (*Citrus reticulata*). Les résultats obtenus montrent la richesse de ces déchets d'agrumes analysés en huiles essentielles et en extraits phénoliques.

Ces huiles essentielles et ses extraits phénoliques sont dotées d'une forte activité antioxydante évaluée par quatre méthodes (piégeage du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur par frappe, par la formation du complexe Fe⁺²-Phenanthroline et la détermination de la valeur de l'ORAC), une activité enzymatique moyenne évaluée par l'inhibition de l'activité de l'alpha amylase et de uréase et une cytotoxicité forte à une concentration de 25mg/ml et une faible activité antifongique.

Mots clés : (*Citrus sinensis*); (*Citrus reticulata*); huiles essentielles; extraits phénoliques; déchets.

Abstract: Our study is part of a research program that aims to enhance the solid waste of industrial units producing citrus juices by extracting essential oils (H.Es) and phenolic extracts of two varieties of citrus fruits namely orange (*Citrus sinensis*) and mandarin (*Citrus reticulata*). The results obtained show the richness of these citrus waste analyzed in essential oils and phenolic extracts.

These essential oils and its phenolic extracts are endowed with a strong antioxidant activity evaluated by four methods (trapping of the DPPH free radical, the reducing power by frappe, by the formation of the complex Fe⁺²-Phenanthroline and the determination of the value of the ORAC), a medium enzymatic activity evaluated by the inhibition of the activity of the alpha amylase and urease and a strong cytotoxicity has a concentration of 25mg/ml and a weak antifungal activity

Key words: (*Citrus sinensis*); (*Citrus reticulata*); essential oils; phenolic extracts; waste.