

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème

Evaluation in-vitro de l'activité anti-inflammatoire des écorces et des pulpes de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*

Présenté par :

M^{elle} : IBELHOULEN NAWAL

M^{elle} : TIGHZERT SONIA

Membre de jury :

Présidente : M^{me} Khettel.B

Examinatrice: M^{elle} Adrare .S

Promoteur: M^r Basli.AK.

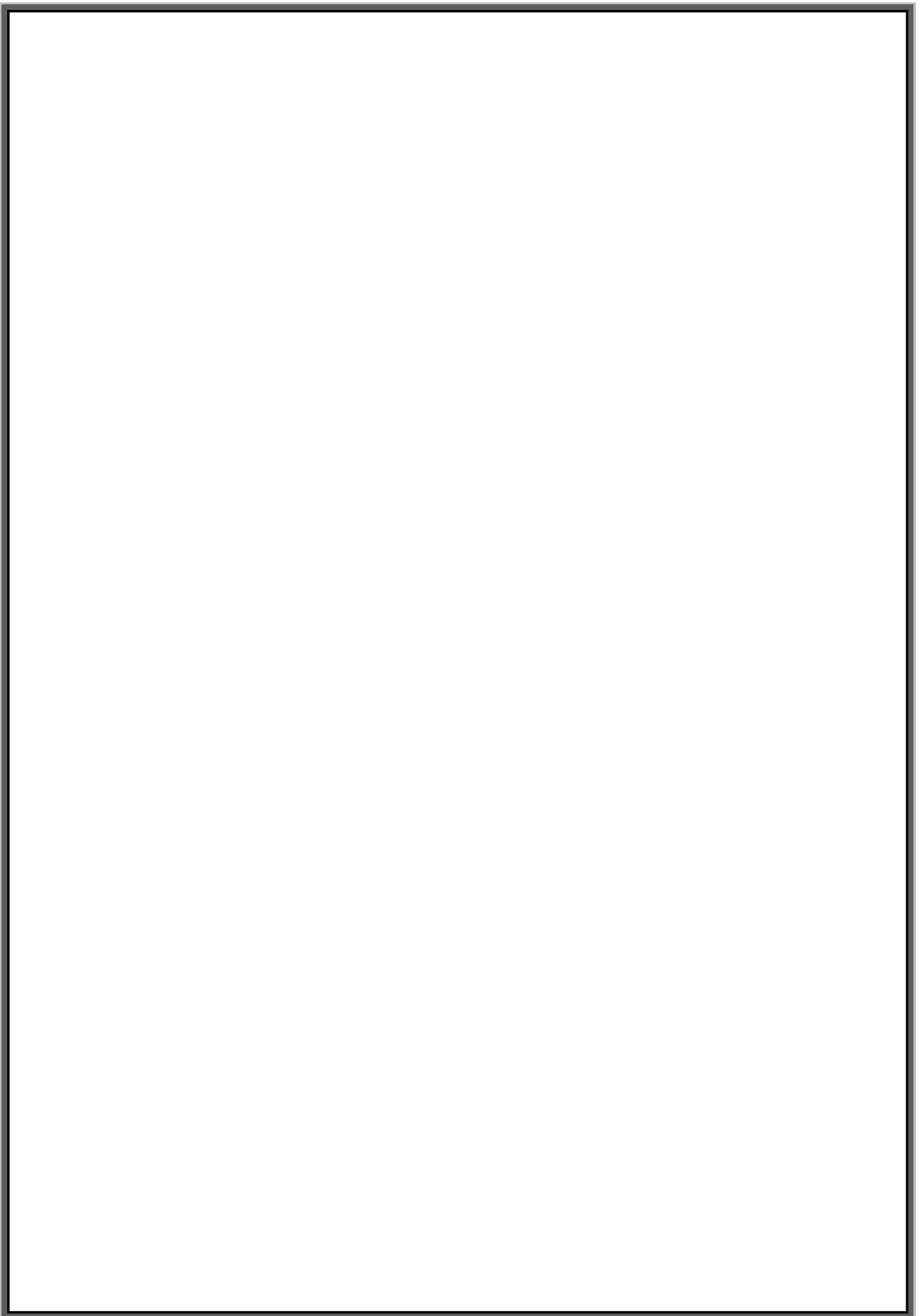
Grade et lieu :

M.C.A

M.A.A

M.C.B

Année universitaire 2015-2016



REMERCIEMENTS

Nous commençons par remercier dieu de nous avoir donné la force et la Patience pour pouvoir mener ce travail.

Je remercie en premier lieu monsieur BASLI A. pour avoir accepté d'être mon encadreur de mémoire, pour sa disponibilité, ses nombreux conseils et encouragements, veuillez trouver ici l'expression de nos profondes gratitude.

Je remercie le docteur KHETAL. B, de nous avoir fait L'honneur de présider le jury.

Notre remerciements vont aussi a Melle. Adrar de nous avoir donné De son temps pour évaluer ce travail.

On vaudra également remercier tous les membres du laboratoire de Biotechnologie végétal et ethnobotanique.

On remercie tous les membres du département BPC.

On remercie tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin.

Dédicaces

Avant tout je remercie Dieu tout puissant qui m'a donné la volonté et le courage et la patience durant mes 5 ans année d'étude.

Aux êtres les plus chères aux monde « mes parents » pour tous les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris afin de me voir réussir. Je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, pour leur présence permanent, leur affection, leur disponibilité et pour tout le mal qu'ils se donnent pour moi

A ma chère grande mère Wiza, je vous souhaite une longue vie pleine de santé

A mes chers frères : Samir, Ferhat, Yazid , je vous souhaite toute la jolie du monde

A mes chers sœurs : Hayat et son époux, et ma petite sœur Cilia.

A mon neveu (Ziadé qui est le plus chère)

A mes oncles maternelles : « khalil Djamel, khalil Hakim, khalil Brahim », à vos femmes « Kahina, Sohila»

A toute ma famille et mes proches

A Ma chère binome sonia et tous les membres de sa famille

A tous mes amis et à toute la promotion de MASTER II en PHARMACOLOGIE Moléculaire (2016)

A mes copines de chambre M203 : Kahina et Katia et à tous les membres de leurs famille

A mon collègue Nadir

En le mérite de ce travaille revient à toutes personnes qui ont participés à sa réalisation et aux quelles j'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciement

Nawal

Dédicaces

Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents, pour tous les efforts et les sacrifices qu'ils ont entrepris afin de me voir réussir .je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, pour leur présence permanent, leur affection, leur disponibilité.

Que dieu vous protège et vous offre une longue vie plein de santé.

.

A mes chers frères : Achour, Kamel, Boubkeur, fateh et Youcef.

A mes très chères sœurs : Aziz, Zahra et son mari Mohand.

A mon cher neveu Achil.

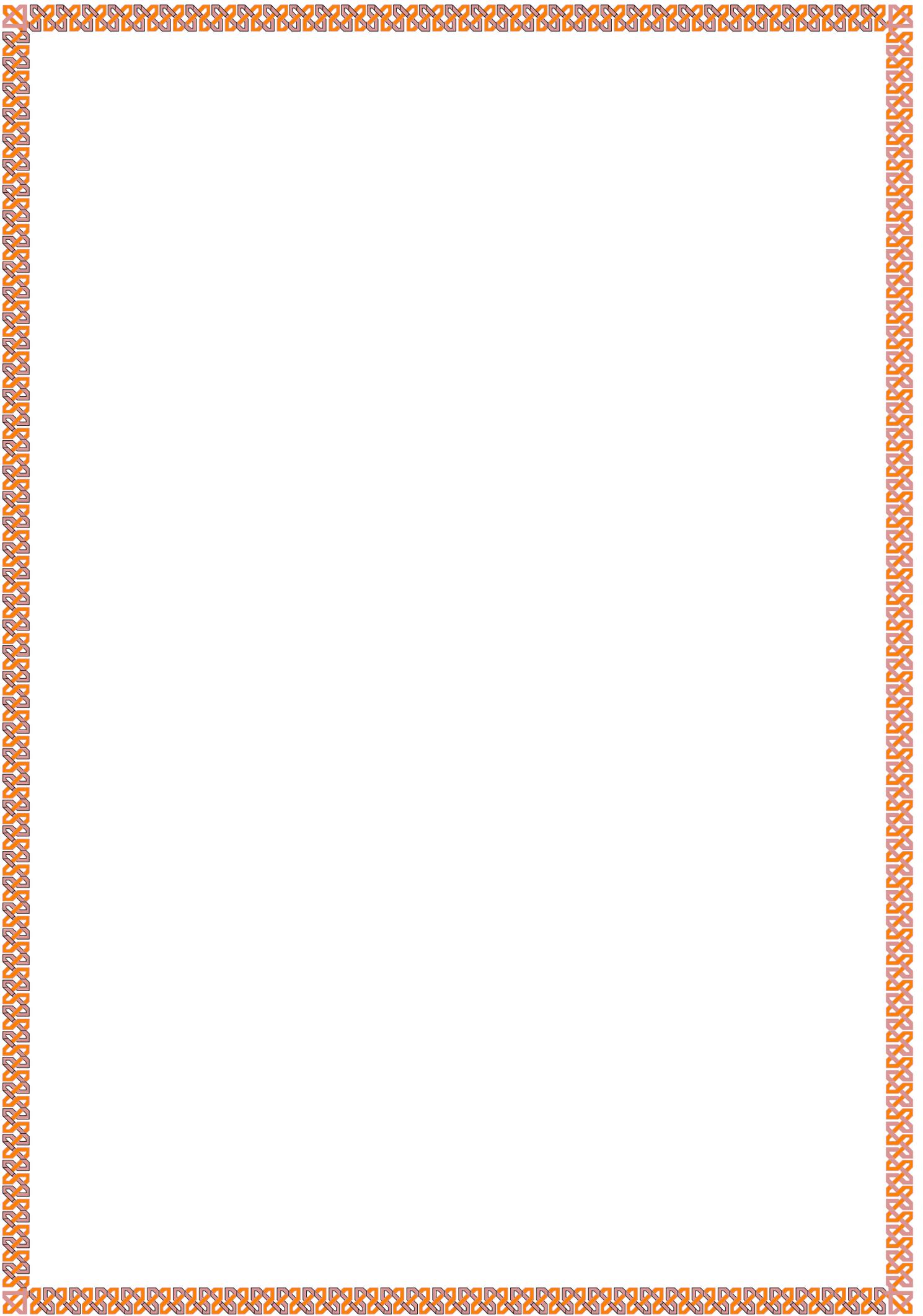
A mes deux chères nièces Luna et Ariss.

A mes belles sœurs Nacera et Hakima

A ma chère collègue Nawel et à toute sa famille.

A mon collègue Nadir et à tous mes amis sans exception.

Sonia



LIST DES ABREVIATIONS

AA : Acide ascorbique

ABTS : Sel d'ammonium de l'acide 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ABS : Absorbance

ADN: Acide désoxyribonucléique

AG : Acide gallique

ALCL₃ : Trichlorure d'aluminium

BHA : Butyle hydroxyanisole

[C]: Concentration

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

E : Extrait

EAG: Equivalent d'acide gallique

E.ETH : Extrait éthanolique

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

EQ : Equivalent la quercétine

ES : Extrait sec

HE : Huile essentielle

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₃PW₀₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique

H₃PM₀₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique

IC₅₀ : Concentration d'inhibition de 50%

LDL: Low density lipoprotéines

LIST DES ABBREVIATIONS

Mg EAG/g ES : Milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec

Mg EQ/g ES : Milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait sec

Mo₈O₂₃ : Oxyde de molybdène

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

nm : Nanomètre

R : Rendement

RL : Radical libre

SOD : Superoxyde dismutase

Trolox : 6-hydroxy-2, 5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique acide

UV : Ultra-violet

W₈O₂₃ : Oxyde de tungstène

LISTE DES FIGURES

1	Fruit de citron avec l'apparence à section transversale	4
2	Coupe transversale de fruit de citrus sinensis	7
3	Structure de base des flavonoïdes	12
4	Structure moléculaire des flavonoïdes	14
5	Photo de la méthode d'extraction des polyphénols à partir des écorces et des pulpes de citrus limon et citrus sinensis	22
6	Photo prise au cours de la décantation des extraits de citrus en présence d'hexane	23
7	Protocole de dosage des polyphénols totaux	25
8	Protocole de dosage des flavonoïdes	26
9	Protocole d'inhibition du radical DPPH	27
10	Protocole d'inhibition du radical ABTS	28
11	Stabilisation membranaire-hémolyse hypotonique	30
12	Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine Kobayachi,	32
13	Taux d'extraction des polyphénols de l'écorce et la pulpe de <i>Citrus limon</i> et <i>Citrus sienensis</i>	34

LISTE DES FIGURES

14	Teneur en polyphénols de l'écorce et la pulpe de <i>Citrus limon</i> et <i>Citrus sinensis</i>	35
15	Teneur en flavonoïdes des écorces et de la pulpe prélevée à partir du citron et l'orange	36
16	Evaluation du pouvoir anti radicalaire des extraits d'écorce et de la pulpe de citron et d'orange	37
17	Activité scavenging du radical ABTS des extraits de <i>Citrus limon</i> et <i>Citrus sinensis</i>	39
18	Stabilisation membranaire-hémolyse hypotonique	41
19	Inhibition de la dénaturation d'albumine humaine par les différents extraits de citrus	42

LISTE DES TABLEAUX

1	Les principales classes des composés phénoliques	10
2	Les acides hydroxybenzoïques	11
3	acides hydroxycinnamiques	12
4	Les valeurs d'IC ₅₀ des différents extraits de citron et d'orange	38
5	les valeurs de TEAC des extraits	40
6	Les valeurs d'IC ₅₀ pour les différents extraits de <i>Citrus limon</i> et <i>Citrus sinensis</i>	41
7	Les valeurs d'IC ₅₀ de l'activité d'inhibition de la dénaturation de l'albumine humaine pour les quatre extraits de citrus	43

SOMMAIRE

Liste des Abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Liste des Annexes

Introduction..... 1

CHAPITRE I : Synthèse bibliographiques

I.1 . Généralité sur les agrumes 3

I.1.1. Historique.....3

I.1.2- Caractères généraux.....3

I.1.3- Les principaux citrus.....3

1.1.3.1- *Citrus limon*.....3

1.1.3.2- *Citrus sinensis*.....6

I.2– Les composées phénolique.....8

I.2.1- Définition.....8

I.2.2– Classification.....9

I.2.3- Intérêts biologiques.....15

I.3-Stress oxydant et réaction inflammatoire.....17

I.3.1-Stress oxydant.....17

I.3.1.1- les radicaux libres.....17

I.3.1.2- Conséquences de stress oxydant.....18

I.3.1.3- Mécanisme d'action d'un antioxydants.....18

I.3.2- Réaction inflammatoire.....19

I.3.2.1- Définition.....19

I.3.2.2- Les causes de l'inflammation.....19

I.3.2.3- Les type de l'inflammation.....20

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

II.1- Matériel végétale.....	21
II.2- Extraction des composés phénoliques.....	21
II.3- Dosage des composés phénoliques.....	24
II.3.1- Dosage des polyphénols totaux.....	24
II.3.2- Dosage des flavonoïdes.....	25
II.4- Evaluations de l'activité antioxydants	26
II.4.1 Test du DPPH.....	26
II.4.2- Test du radical ABTS ⁺	27
II.5- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	29
II.5.1- Stabilisation membranaire (hémolyse hypotonique).....	29
II.5.2- Inhibition de la dénaturation proteique.....	31
II.6. Analyse statistique.....	33

CHAPITRE III : Résultats et discussion

III.1- Taux d'extraction.....	34
III.2- Dosage des composés phénoliques.....	35
III.2.1- Taux des polyphénols totaux.....	35
III.2.2- Taux des flavonoïdes.....	36
III.3 – Activité antioxydant.....	37
III.3.1- Activité scavenging du radical DPPH.....	37
III.3.2- Activité scavenging du radical ABTS.....	39
III.4- Activité anti-inflammatoire.....	40
III.4.1- Stabilisation membranaire.....	40
III.4.2- Dénaturation protéiques.....	42
Conclusion.....	44
Référence bibliographique.....	45

Annexe

Introduction

La médecine traditionnelle demeure le recours principal d'une grande majorité des populations pour résoudre leur problème de santé, non seulement pour les moyens financiers limités face aux produits conventionnels, mais aussi pour éviter les effets secondaires que présentent la majorité des médicaments synthétiques. Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**Ladoh et al., 1997**).

Les plantes et les sources naturelles forment la base de la médecine traditionnelle grâce à leur richesse en composés actifs (polyphénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes) qui ont démontrés des activités biologiques: antimicrobiennes, antioxydants, antiarythmiques, antifongiques, anti-inflammatoires, et anticancéreuses. (**Chutia et al., 2009 ; Kamal et al., 2011**).

Le genre de Citrus appartenant à la famille des Rutaceae est l'une des cultures les plus largement cultivées dans le monde à cause de leurs bénéfices nutritionnelles, ils sont principalement utilisés dans les industries alimentaires dont les écorces sont le principal sous produit durant leur transformation. (**Gmitter et al., 2007**).

Au cours des dernières décennies, un grand nombre d'études ont été menés dans le but d'identifier les composants bioactifs présents dans les différentes parties des citrus, dans une tentative de gagner une compréhension plus profonde de la corrélation entre le régime alimentaire, les prestations de santé et la réduction du risque des maladies (**Barreca et al., 2011**).

Les écorces des citrus, en particulier, sont une source riche en flavonoïdes naturels à haute propriétés pharmacologiques et elles contiennent une grande quantité de phénols en comparant avec la portion comestible (**Okonogi et al., 2007**).

Dans l'objectif de déterminer l'intérêt biologique des écorces et des pulpes de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* la présente étude porte sur :

- L'extraction et le dosage des composés phénoliques de l'écorce et de la pulpe de chaque espèce de citrus (*Citrus limon* et *Citrus sinensis*).
- L'évaluation in vitro des activités antioxydants (effet scavenger vis-à-vis du DPPH et ABTS).
- L'étude préliminaire in vitro de l'activité anti-inflammatoire (stabilisation membranaire et dénaturation protéique).

*Synthèse
bibliographique*

I.1. GENERALITES SUR LES AGRUMES**I.1.1. HISTORIQUE SUR LES AGRUMES**

Le mot « agrume » provient du latin « acrumen », qui désignait dans l'antiquité des arbres à des fruits acides. Originaires d'Asie, notamment d'Indonésie, de Chine, d'Inde ou du Japon, les agrumes sont cultivés depuis des millénaires. Un texte datant de 2200 avant J.C évoque déjà sa présence en Chine à cette époque. Vinrent ensuite le citronnier, importé par les Arabes au XIIe siècle, puis l'oranger et le mandarinier au XIXe siècle, qui vit par la même occasion le développement des fameuses 'orangeries', ces serres spécifiques à la culture de ces plantes frileuses sous des climats européens. Depuis la culture des agrumes n'a cessé de s'étendre de par le monde dans les zones subtropicales et tropicales (**Marouf et Raynand, 2007**).

I.1.2. CARACTERES GENRAUX

C'est l'ensemble des végétaux cultivés de la famille des rutacées, appartenant à 3 genres botaniques, se sont des arbustes ou arbres fruitières épineux de petite taille (4 à 9 m) à port arrondi à feuille persistant. Différents espèces sont cultivées pour leur fruits : citronnier, clémentinier, mandarinier, oranger, pamplemousse, etc. et qui présentent les fruits à des tailles et des poids variables en forme sphériques, l'épicarpe jaune, orange, ouvert contient des poches sécrétrices d'huile essentielle. L'endocarpe est divisé en quartier (de 9 à 16) composés de poils vésiculeux. On les rencontre dans les pays méditerranéens et en Afrique du sud, ils constituent la première production fruitière mondiale (**Marouf et Raynand, 2007**).

I.1.3. LES PRINCIPAUX CITRUS***I.1.3.1. CITRUS LIMON*****A) Description botanique**

Le citronnier est un arbre qui atteint 2.5 à 3 m de haut appartenant à la famille des Rutacées, épineux probablement originaire de sud de la chine. Ces feuilles coriaces sont très aromatiques lorsqu'on les froisse et ses fleurs blanches aux pétales épais dégagent un délicieux parfum, elles donnent des fruits allongés caractéristiques, jaune vif à maturité (Figure N°1).

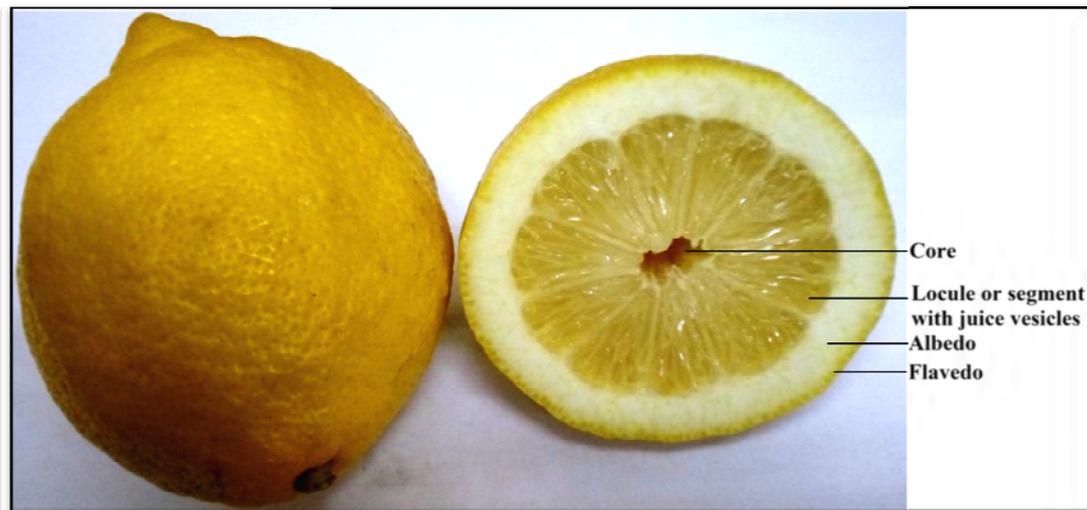


Figure N°1 : Fruit de citron avec l'apparence à section transversale (FAO, 2010)

Le citronnier c'est une espèce très cultivée aujourd'hui dans des climats tropicaux et subtropicaux. Il se développe dans l'endroit où la température se situe entre 16°C et 29°C. Le citronnier est aussi cultivé dans les régions tempérées du monde, dans les pays comme l'Italie, l'Espagne et les pays d'Afrique de nord. D'autres cultivateurs et exportateurs principaux des citrons incluent des pays de l'Est, comme Malaisie, Nouvelle-Calédonie, Australie et d'autres pays (Chandrika *et al.*, 2011).

B) Taxonomie (Goetz, 2014)

La classification botanique de *Citrus limon* est donnée comme suit :

Règne : plantae

Sous Règne : tracheobionata

Division : magnoliophyta

Classe : magnoliopsida

Ordre : sapindales

Famille : Rutacées

Genre : Citrus

Espèce : *Citrus limon*

C) Composition chimique

Comme tous les agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90% d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). L'acidité est due essentiellement à l'acide citrique accompagné de faibles quantités d'acides malique, caféique et férulique. Le fruit présente une haute teneur en vitamine C (40 à 50 mg/100g) et un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables des flavonoïdes. La teneur de ce fruit en glucides est faible mais les fibres (cellulose, hémicelluloses et pectines) représentent 2,1% du poids total. La teneur en protéines ne dépasse pas 1g/100g. Diverses substances minérales ont été identifiées dans le citron à une concentration de 0,5g/100g dont le potassium est le minéral le plus abondant. L'arôme du citron résulte de ses huiles essentielles (HE) abondantes dans les vacuoles de l'écorce; il s'agit d'un mélange de limonène, du citral, du citronellal et des coumarines (Pierre et al, 2001).

D) Usage thérapeutique traditionnel

Depuis longtemps, le fruit et les écorces de *Citrus limon* ont été utilisés pour le traitement de quelques maladies telles que le rhume, la grippe, l'angine, la fièvre, c'est un antiscorbutique et un important désinfectant qui a déjà été utilisé pour la préparation du

champ opératoire et en dermatologie pour combattre certaines affections de la peau, aussi comme un antidote pour divers poisons et spécialement les morsures des scorpions. Par ailleurs, il a été aussi employé pour empêcher les nausées et les vomissements pendant la grossesse, pour arrêter les saignements nasals, il est utile contre les thromboses et également considéré un tonique de l'organisme et un stimulant de l'appétit.

Le *Citrus limon* est aussi très utilisé en cosmétique, il hydrate la peau, fortifie les angles fragiles, fait briller les cheveux tout en atténuant les pellicules (virbel-Alonso, 2011).

1.1.3.2. CITRUS SINENSIS

A) Description botanique

L'oranger est un arbuste sempervirent, pouvant atteindre 10 mètres de haut, avec des branches épineuses et des feuilles de 4 à 10 cm de long. Il est originaire de l'Asie du Sud-est, soit de l'Inde, soit du Viêt Nam ou du sud de la Chine. Le fruit du *Citrus sinensis* est appelé orange douce pour le distinguer de l'orange amère, fruit du *Citrus aurantium*, le bigaradier (ou oranger amer), des fleurs duquel on tire l'essence de néroli et l'eau de fleur d'oranger.(Figure N° 2)

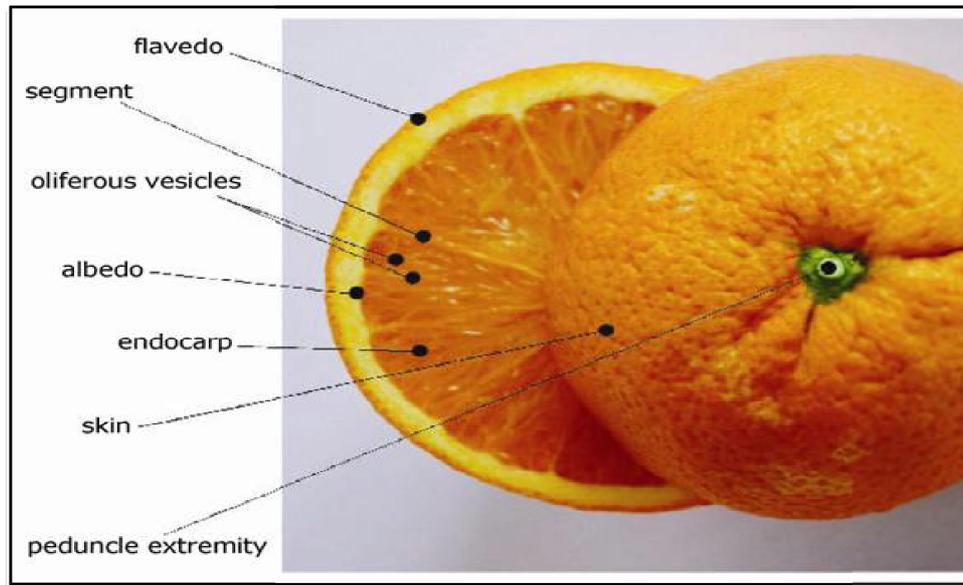


Figure N°2 : Coupe transversale de fruit de *Citrus sinensis* (Goudeau *et al.*, 2008).

B) Taxonomie (Hequet *et al.* 2009)

La classification botanique de *Citrus sinensis* est donnée comme suit :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyte (angiosperme)

Classe : Dicotylédone

Ordre : Rutales

Famille : Rutacée

Genre : Citrus

Espèce : Sinensis

C) Composition biochimique

L'orange contient en moyenne 12 % de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C (80mg/100g), vitamines P, B1, B9, E, provitamine A. Riche en calcium (40 mg /100 g), riche en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile

(Levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion (Milind et Andcharvedi, 2012).

D) Utilisation en traditionnel de *Citrus sinensis*

Les fruits et les écorces ont été utilisés pour prévenir plusieurs maladies telles que des maux de tête et des maladies chroniques comme le diabète. D'autre part, il joue un rôle important dans le combat de la prolifération des microorganismes. Il a été aussi considéré comme un agent puissant antioxydant et hypotenseur. Les écorces ont également été utilisées pour tuer des larves de moustiques.

I.2. LES COMPOSES PHENOLIQUES

A côté des métabolites primaires (glucides, protides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment d'autres métabolites dits « secondaires », qui présentent une source importante de molécules utilisables par l'homme. Ces métabolites font l'objet de nombreuses recherches, notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique (Macheix *et al.*, 2005).

I.2.1. DEFINITION DES POLYPHENOLS

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ils sont localisés de façon hétérogène dans toutes les parties des plantes. Ces composés se caractérisent par la présence d'au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres fonctions (carboxyliques(COOH),...).

Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la plante, ils sont impliqués dans la physiologie, dans les mécanismes de défense, ainsi que dans la coloration de la plante (Macheix *et al.*, 2005). Ils possèdent également un large spectre d'activités biologiques et pharmacologiques comme antioxydants, anti-inflammatoires, anticancéreux et des activités contre les maladies cardiovasculaires. Ces activités sont attribuées en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres, ainsi qu'à leurs affinités de liaison pour une grande variété de protéines dont certains enzymes et récepteurs.

I.2.2.CLASSIFICATION

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en plusieurs classes allant de composés présentant un simple noyau phénolique à des composés polymériques complexes et qui se différencient d'abord par: (**Hopkins, 2003**)

- ✓ La complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées).
- ✓ Par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation).
- ✓ Par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides et protéines).

Les différentes classes de polyphénols sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableaux°1 : Les principales classes des composés phénoliques (Beta *et al.*, 2005).

Squelette carbonée	Classe	Exemple	Origine
C6	Phénols simples	Cathéchols	Nombreuses espèces
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraises
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acide caféïque Acide férulique	Pomme de terre, pomme
	Coumarines	Scopolétine	Citrus
C6-C4	Naphtoquinones	Jugolone	Noix
C6-C2-C6	Stilbénes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoides	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine	Fruits, légumes, fleurs Pommes, raisin, citrus Soja, pois
	Isoflavonoides	Daidzéine	
(C6-C2) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C6-C3) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits
C15	Tanins		Raisin rouges, kaki

A) Les acides phénoliques

Les acides phénoliques se caractérisent par la présence d'une fonction acide et plusieurs fonctions phénoliques, ces acides sont rarement présents à l'état libre et ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques. Les acides phénoliques sont divisés en deux classes :

➤ **Les acides hydroxy-benzoïques :**

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque, (p-hydroxybenzoïques, galliques, syringiques) sont généralement présents à très faibles concentrations chez les végétaux comestibles (**Macheix et al., 2005**). Le tableau ci-dessous montre les dérivés de l'acide hydroxy-benzoïque :

Tableau N°2 : Les acides hydroxybenzoïques (Fadel. et al., 2011)

Acides hydroxybenzoïques					
Dérivés	R1	R2	R3	R4	Formule
Acide parahydroxybenzoïque	H	H	OH	H	
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H	
Acide vanilique	H	OCH ₃	OH	H	
Acide gallique	H	OH	OH	OH	
Acide syringique	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	
Acide salicylique	OH	H	H	H	
Acide gertisque	OH	H	H	OH	

➤ **Les acides hydroxy-cinnamiques**

Représentent une classe très importante dont la structure de base est dérivée de l'acide cinnamique (p-comarique, caféique, férulique) (**Macheix et al., 2005**). Les différents dérivés sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau N°3: les acides hydroxy-cinnamiques (Wang *et al.*, 2005)

Acides hydroxycinnamiques				
Dérivés	R1	R2	R3	Formule
Acide paracoumarique	H	OH	H	
Acide caféique	OH	OH	H	
Acide férulique	OCH ₃	OH	H	
Acide sinapique	OCH ₃	OH	OCH ₃	

B) Les flavonoïdes

Ils représentent une famille large de polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes. Leur structure moléculaire est caractérisée par un squelette carboné de type diphenyl 1,3-propane qui comprend 15 atomes de carbone répartis en deux cycles benzéniques notés A et B reliés entre eux par un noyau pyrène C contenant un oxygène (Ghedira, 2005).

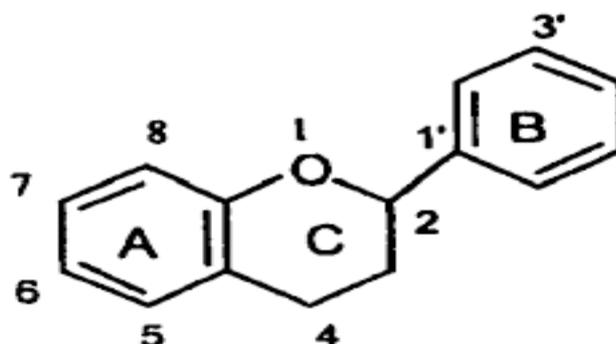


Figure N°3 : Structure de base des flavonoïdes (Ghedira, 2005)

Les flavonoïdes sont souvent rencontrés dans les fruits (notamment du genre *Citrus* où ils représentent jusqu'à 1 % des fruits frais) et les légumes. Des boissons telles que le vin rouge, le thé, le café et la bière. Ils constituent un groupe d'antioxydants naturels qui présentent un intérêt de plus en plus important grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires, antiallergiques, antivirales et antimicrobiennes. En effet ces métabolites sont capables de réduire les radicaux libres (le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde) impliqués particulièrement dans la peroxydation lipidique (Vanamala *et al.*, 2006).

Selon le degré d'oxydation de l'hétérocycle central, les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes : les flavones, les flavonols, les flavanones, les anthocyanes et les isoflavones. (Jiang, Y.*et al.*, 2007). La structure de quelques classes de flavonoïdes est représentée dans la figure N°4 :

- **les flavones** : ils présentent une double liaison, en position 2-3 et le noyau aromatique B est fixé en position 2. Moins répandus dans les fruits et les légumes que les flavonols. Les flavones sont principalement présents sous forme de glycosides, de lutéoline et d'apigénine (Tsao, 2010).
- **Les flavonols** : ils sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3. Ce sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal. Ils sont les plus souvent présents sous forme de glucosides, avec une molécule de glucose ou de rhamnose (Jiang.*et al.*, 2007).
- **Les flavanones** : ils se caractérisent par la saturation de l'hétérocycle le plus souvent glycosilées par un disaccharide en C7 (Jiang *et al.*, 2007).
- **Les isoflavones** : ils se différencient des flavones par la fixation du noyau benzenique au carbone 3 de l'hétérocycle. Ils sont présents presque exclusivement dans les légumineuses et plus particulièrement dans les fabacées (Jiang *et al.*, 2007).
- **Les anthocyanes** : ils constituent le groupe de pigments qui sont dissouts dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs et des tissus auxquels ils donnent des

couleurs rose, rouge, bleu et violet. Ils sont présents dans le vin rouge, certaines céréales, certains légumes feuillus ou racinaires (chou rouge, oignon rouge, radis) (Heller et Forkman., 1993).

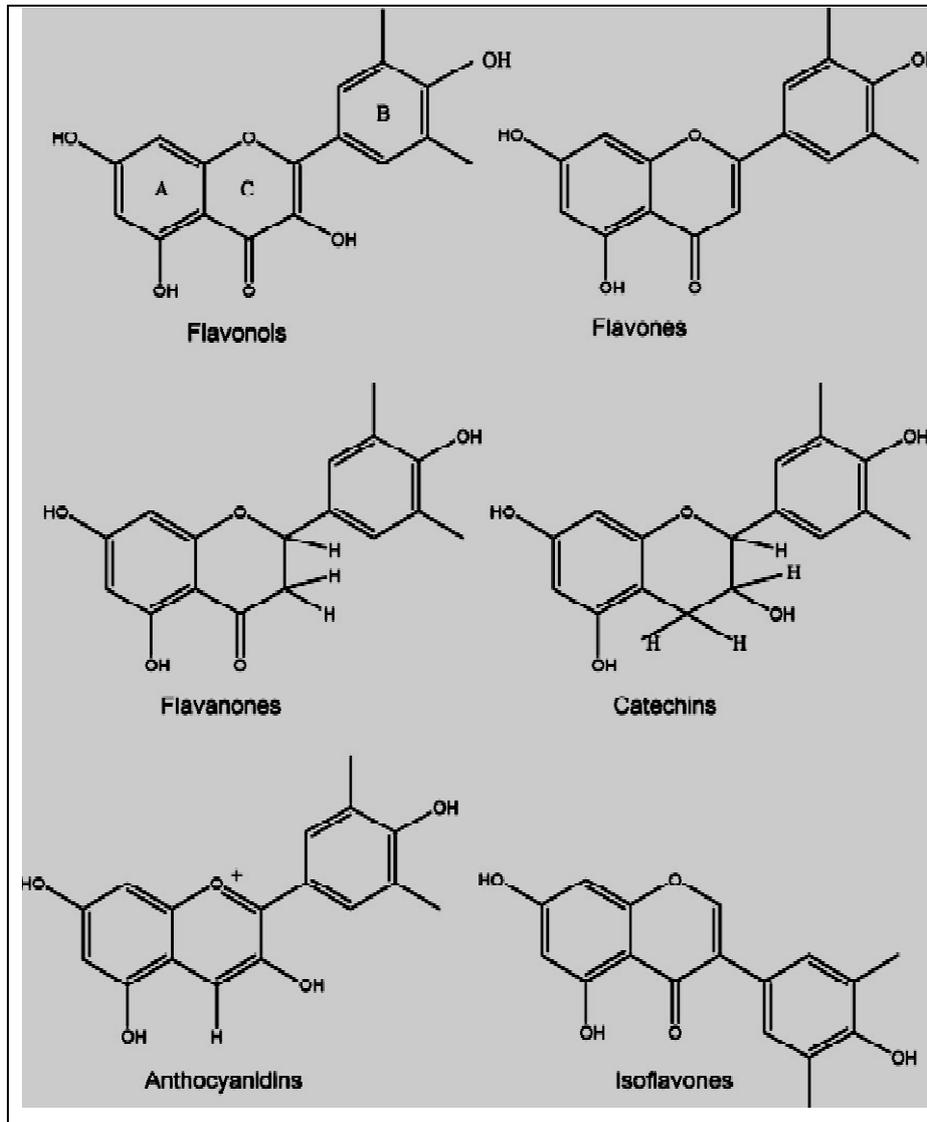


Figure N°4: Structure moléculaire des flavonoïdes (Ghedira, 2005).

C) Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000, se sont des molécules fortement hydroxylés qui

présentent à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine, et d'autres protéines) et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives.

Les tanins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tannins sont le vin et le thé. On distingue: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Takuo et al., 1988**).

➤ **Tanins hydrolysables**

Se sont des polyphénols ayant un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Ils peuvent diminuer la dégradation des parois et être hydrolysés dans l'intestin en libérant des produits toxiques pour le foie et le rein. (**Bruneton, 1999**).

➤ **Tanins condensés**

Les tanins condensés sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols d'un poids moléculaire élevé et qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter-monomérique. Ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides minéraux dilués mais forment à l'ébullition des composés insolubles appelés rouge de tanins (**Bruneton, 1999**).

I.2.3. INTERETS BIOLOGIQUES DES POLYPHENOL

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait, sont des éléments qui font partie de l'alimentation humaine et animale. Des études ont démontré que les flavonoïdes de *Citrus limon* possèdent des activités biologiques très importantes telles que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante, et antiallergique.

➤ **activité anti-inflammatoire**

Plusieurs études ont démontré que les flavonoïdes des agrumes avaient des propriétés anti-inflammatoires. Ils sont capables d'inhiber les kinases et phosphodiésterases essentiels pour l'activation et la transduction du signal cellulaire. Ils ont également une incidence sur

l'activation de certain nombre de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, y compris les lymphocyte T et B (Menthey *et al.*, 2001).

➤ **activité antiallergique**

Citrus limon a également des propriétés antiallergiques qui sont dues à sa richesse en quercitrine, hespéridine et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, un neurotransmetteur impliqués dans les réactions allergiques et l'inflammations (Menthey *et al.*, 2001).

➤ **activité antimicrobienne**

Plusieurs études expérimentales ont montrée que les flavonoïdes de *Citrus limon* ont une activité antimicrobienne très importante ; la quercitrine et l'hespéridine inhibent l'infectiosité et la réplication de l'*Herpès Simplex*, le poliovirus, le virus *Syncytial Hespérétine*, l'aglycone d'hespéridine, possède une activité antimicrobienne modérée contre *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* (Menthey *et al.*, 2001).

➤ **Activité antioxydant**

Les polyphénols sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piègeurs des radicaux libres par les interventions directes sur les molécules pro-oxydantes ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton. Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles ou lipophiles et ils sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétique (Menthey *et al.*, 2001).

I.3.STRESS OXYDANT ET REACTION INFLAMMATOIRE

I.3.1.STRESS OXYDANT

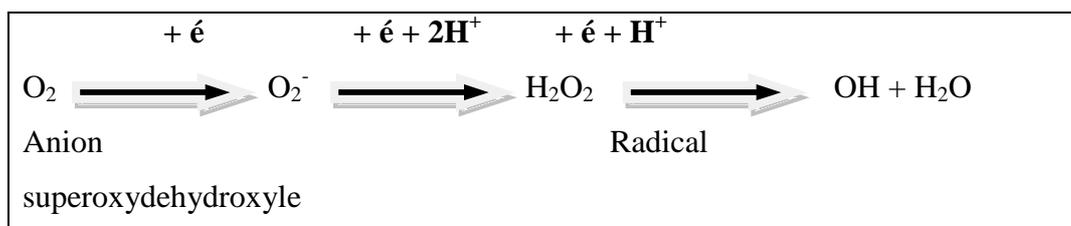
Le stress oxydant est un état de déséquilibre entre la production d'éléments oxydants et l'efficacité du système de défense antioxydant résultant au sein d'un individu (**Barouki, 2006 ; Moussard, 2006**). Ce déséquilibre provient soit d'une surproduction d'agent oxydant, soit d'une altération de mécanisme de défense (**Morena *et al.*, 2002 ; Favier, 2003**). A l'état naturel, les radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité par divers mécanismes physiologiques tels que les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, la balance antioxydant/pro-oxydant est dite qu'elle est en équilibre. Toutefois, dans le cas inverse, la production peut devenir excessive résultant de phénomènes toxiques exogène, soit par déficit en antioxydants, soit par une surproduction très importante des radicaux libres, cet excès est appelé « **stress oxydant** » (**Favier, 2003 ; Huet et Duranteau, 2008**).

I.3.1.1.LES RADICAUX LIBRES

➤ Définition

Un radical libre est un atome ou molécule chimique extrêmement réactive qui contient un ou plusieurs électrons non appariés. Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé.

Les principaux radicaux libres dérivent de la molécule d'oxygène par addition successive d'un électron comme suit :



➤ **Mécanisme d'action des radicaux libres :**

Les radicaux libres ont une action nocive sur de nombreuses molécules de l'organisme, ils s'attaquent directement aux phospholipides membranaires. Dont les acides gras polyinsaturés sont dénaturés, ils agressent également les protéines, les micro-fibrilles de collagène, l'acide hyaluronique, les acides nucléiques des chromosomes et l'ADN lui-même est transformés entraînant l'apparition d'une série d'anomalies dont le risque de cancérisation. Lorsque les radicaux libres lèsent les acides gras insaturés on parle de lipidoperoxydation des membranes cellulaires. Cela déclenche alors une réaction en chaîne sur les divers acides gras du voisinage jusqu'à ce qu'ils soient neutralisés.

I.3.1.2. CONSEQUENCES DU STRESS OXYDANT

Les radicaux libres font partie intégrante du fonctionnement de l'organisme et jouent un rôle dans la reproduction, la nidation de l'œuf fécondé, le développement de l'embryon et ils peuvent être nécessaire dans le processus tel que la transmission de message intracellulaire, la défense contre les microorganismes etc (**Aurousseau et al., 2004**).

I.3.1.3. MECANISME D'ACTION D'UN ANTIOXYDANT

De façon générale, un antioxydant peut être défini comme étant une substance qui est présente, dans un milieu à des faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable capable de retarder ou d'inhiber l'oxydation de ce dernier en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydant. L'antioxydant peut agir de trois différentes manières :

- Le piégeage direct des radicaux libres.
- L'inhibition des enzymes impliqués dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des radicaux libres.
- La protection des systèmes de défense antioxydants.

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction car leur structure est relativement stable. La toxicité des antioxydants synthétiques

et la demande élevée des consommateurs pour les produits naturels ont attiré l'attention vers les produits végétaux comme source d'antioxydants plus sains et plus efficaces.

I.3.2. REACTION INFLAMMATOIRE

I.3.2.1. DEFINITION

L'inflammation est une réponse physiopathologique constituée d'un système immunitaire inné cellulaire et humoral qui se déclenche après des lésions tissulaires. Elle est caractérisée par la chaleur, rougeur, douleur, gonflement et des fonctions perturbées. Les médicaments les plus utilisés généralement pour le traitement des pathologies inflammatoires sont les médicaments non stéroïdiens qui ont plusieurs effets secondaires particulièrement l'irritation gastrique menant à la formation des ulcères gastriques (**Charles *et al.*, 2003**).

I.3.2.2. LES CAUSES DE L'INFLAMMATION

Selon **Canaud *et al.* (2003)**, les causes les plus courantes de développement d'une réaction inflammatoire sont :

➤ **Agent d'origine exogène**

- Infection : Contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons),
- Agents physiques : traumatisme (plaie), chaleur, froid, radiation,
- Agents chimiques : toxine, venins, acides et les bases.

➤ **Agent d'origine endogène**

- Défaut de vascularisation : réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par Ischémie.
- Agressions dysimmunitaire : anomalie de la réponse immunitaire, allergie, auto-immunité.

I.3.2.3. LES TYPES D'INFLAMMATION

➤ **Inflammation aigue :**

L'inflammation aigue est définie comme une série de réponses tissulaires qui se produisent dans les premières heures qui suivent la lésion tissulaire. C'est une orchestration complexe d'événements comportant une fuite d'eau, de sels et protéines du compartiment vasculaire vers le site d'inflammation : activation des cellules endothéliales, activation des macrophages tissulaires, activation des plaquettes et de leur agrégation, activation des compléments (Charles *et al.*, 2003).

➤ **Inflammation chronique :**

Elle est définie morphologiquement par la présence des lymphocytes, des macrophages et des cellules de plasma dans les tissus. Le terme chronique n'est par conséquent pas lié à la durée de la réponse inflammatoire. Dans beaucoup de cas la réponse inflammatoire chronique peut persister pour de longues périodes (mois ou années) (Charles *et al.*, 2003).

➤ **Inflammation subaigüe**

Ce type de processus inflammatoire présente une évolution très brève et souvent fatale. On le rencontre notamment lors de sepsis graves du a des infections par des bactéries gram négatif (notamment *Escherichia coli*, responsable de coli septicémies). Il s'agit d'une réponse inflammatoire systémique au cours de laquelle se produisent des réactions cellulaires et vasculaires comparables à celles des autres types d'inflammation, mais elles sont généralisées et associées à une défaillance pluri-viscérale. Celle-ci est consécutive aux modifications de la perfusion, qui provoquent une hypovolémie et une hypoxie tissulaire, ainsi qu'aux effets toxiques de l'agent infectieux et de certains des médiateurs produits au cours de la réaction Inflammatoire (Charles *et al.*, 2003).

*Matériel et
méthodes*

II.1.MATERIEL VEGETAL**II.1.1.RECOLTE DE L'ECHANTILLION**

Le matériel qui a fait l'objet de ce travail est constitué par la pulpe et l'écorce du fruit de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*, que nous avons récoltés durant le mois de janvier 2016 au niveau de l'INRA sise au village d'Oued-ghir wilaya de Bejaia.

La récolte a été réalisée d'une manière aléatoire à partir de différents arbres et dans un endroit propre. Les échantillons ont été donc emballés dans des sacs, étiquetés, puis transportés au laboratoire en vue de réaliser l'extraction et le dosage des différentes classes des composés phénoliques ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire.

II.1.2.SECHAGE ET BROYAGE

La pulpe et les écorces des deux espèces a testés sont bien lavés et débarrasser de la poussières et d'autres particules puis soumises à un séchage à l'air libre pendant 10 jours puis mises à l'étuve à 40°C durant 24heurs. Après séchage les échantillons sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique afin d'avoir une poudre fine.

II.2. METHODES**II.2.1.EXTRACTION DES POLYPHENOLS**

L'obtention d'un principe actif à partir des végétaux nécessite souvent une extraction de type solide / liquide (par macération) (**Ladoh et al ., 1997**). Dans notre cas, nous avons utilisé une extraction à l'éthanol absolu et les étapes de l'extraction sont résumées comme suit :

II.2.1.1.MACERATION**➤ Principe**

La macération consiste à laisser tremper la matière végétale dans l'eau ou dans un autre solvant organique à température ambiante sous agitation continue.

L'extraction a lieu par pénétration du solvant dans la cellule végétale provoquant leur gonflement et la rupture des liaisons moléculaires de faible énergie. Les extractibles sont alors dissous et diffusent des cellules vers le solvant (Royer *et al.*, 2010).



Figure N°5 : Photo de la méthode d'extraction des polyphénols à partir des écorces et des pulpes de citrus limon et citrus sinensis

➤ **Mode opératoire :**

5g de chaque échantillon ont été mélangés à 100ml de l'éthanol pure. Puis laisser macérer sous agitation magnétique pendant 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation, chaque macérat a été récupéré puis filtré à l'aide d'un papier Wattman N°3. Le filtrat ainsi obtenu a été mesuré puis évaporé à l'aide d'un rote à vapor jusqu'à l'évaporation totale du solvant d'extraction (éthanol).

Le taux d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction \%} = \left(\frac{P1 - P0}{P_i} \right) \times 100$$

P0 : poids du bicher vide en gramme

P1 : poids du bicher avec l'extrait sec

Pi : poids de la poudre initial

II.2.1.2.DELIPIDATION

➤ **Principe :**

La dèlipidation consiste à décanter l'extrait avec un solvant apolaire (hexane) à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation (voir photo).

La pénétration de l'hexane dans la cellule végétale provoque la déstabilisation de la membrane cellulaire et la dissolution des lipides.



Figure N° 6 : Photo prise au cours de la décantation des extraits de citrus en présence d'hexane

➤ **Mode opératoire :**

Dans des ampoules à décanter un volume de chaque extrait à été ajouté au même volume de l'hexane. Les ampoules ont été reposés sur des supports, laisser décanter pendant 3 heures et récupérer la phase aqueuse.

II.1.2.3. FRACTIONNEMENT DES POLYPHENOLS

L'extrait éthanolique obtenu est soumis à une deuxième extraction de type liquide/liquide afin de pouvoir séparer les fractions de polyphénols. Dans ce cas nous avons utilisé l'acétate d'éthyle comme solvant.

II.3. DOSAGES DES COMPOSES PHENOLIQUES

II.3.1.DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX

La détermination quantitative des polyphénols totaux contenus dans les quatre échantillons : le fruit et l'écorce du citrus limon et sinensis est réalisé par spectrophotométrie , selon la méthode de (**Ladoh et al .,2014**) qui repose sur l'utilisation du réactif de Folin-Ciocalteu.

➤ Principe :

Cette méthode est basée sur la réaction d'oxydoréduction, le réactif de folin ciocalteu est utilisé comme oxydant, il est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation des polyphénols, le folin est réduit en un mélange bleu d'oxyde de tungstène(W_8O_{23}) et de molybdène(Mo_8O_{23}) et ça en présence de carbonate de sodium. L'intensité de la coloration est proportionnelle aux taux des polyphénols présents dans les extraits (**Gayon, 1968**).

➤ Mode opératoire :

0,2 ml de chaque extrait a été mélangé avec 1,5ml de Folin-ciocalteu (10%). Après 5 minutes, 1,5ml de la solution bicarbonate de sodium(Na_2CO_3) à 6% ont été ajoutés. Le mélange a été incubés a l'obscurité et a température ambiante et a l'abrie de la lumière pendant 1heur, et l'absorbance est lue à 725nm au spectrophotomètre UV-visible (**Ladoh et al.,2014**).

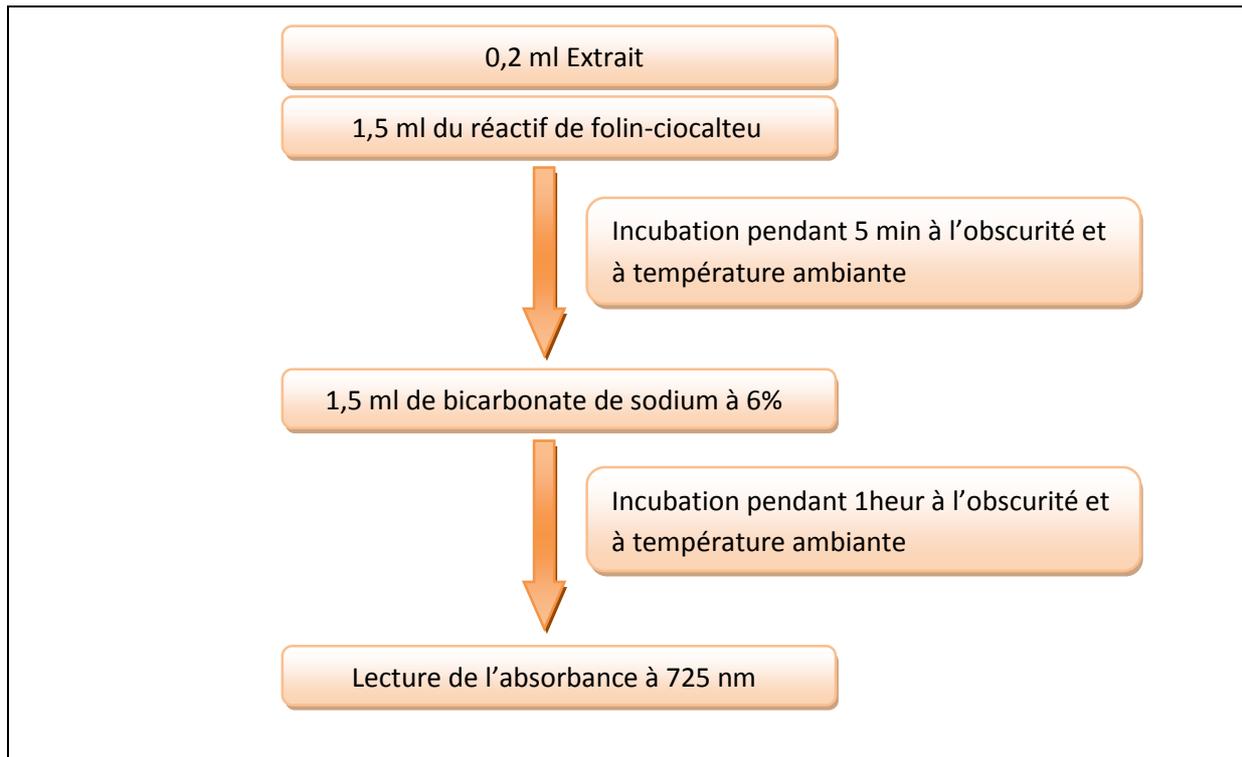


Figure N°7: Protocol de dosage des polyphénols totaux (**Ladoh et al., 2014**)

- La concentration en composés phénoliques a été déterminée on se référant à la courbe d'étalonnage obtenue par l'acide gallique comme un standard.(**Annexe**)

II.3.2.DOSAGE DES FLAVONOÏDES

➤ Principe :

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyles OH libre en position 5 susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par chélation de l'ion AL^{3+} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans les extraits (**Ribereau-Gayon, 1968**).

➤ Mode opératoire :

La teneur des flavonoïdes contenue dans les quatre extrais est déterminé selon la méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium réalisé par (**Ibrahium et Hegazy , 2012**)

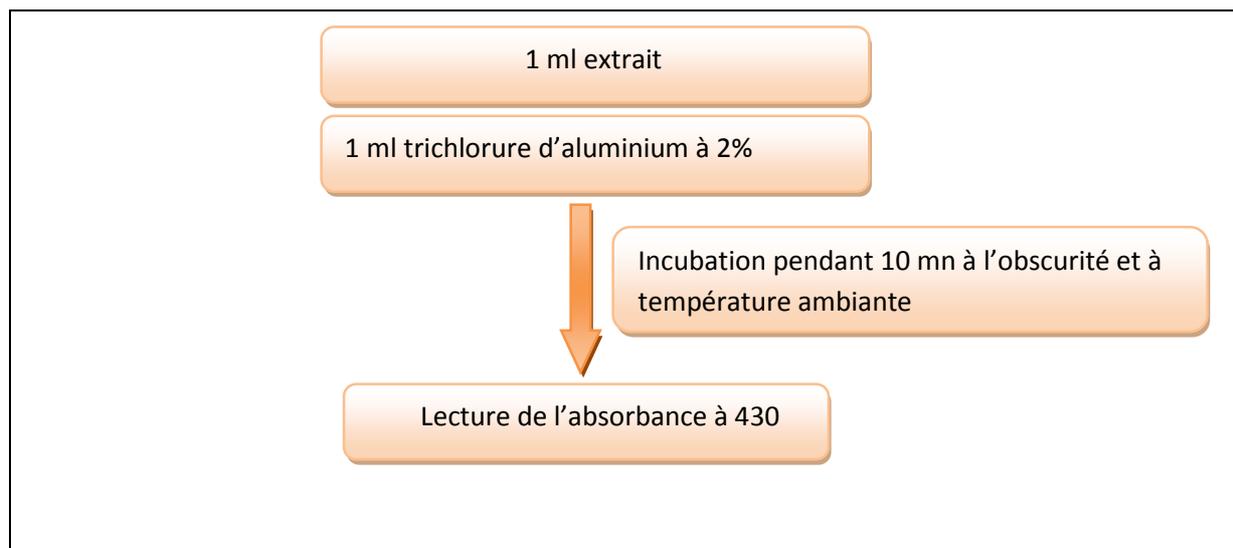


Figure N°8 : Protocole de dosage des flavonoïdes (*Ibrahim et Hegazy ,2012*)

- La quantité des flavonoïdes contenue dans les extraits est calculée par référence à une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0,2mg /ml) (**annexe I.2**)

II.4.EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTS

II.4.1.REDUCTION DE RADICAL LIBRE DPPH

➤ Principe

Ce test est basé sur la mesure de l'aptitude d'un antioxydant à exercer un effet scavenger sur le radical libre DPPH .Le radical DPPH est réduit en son hydrazine correspondant lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune, l'absorbance est mesuré par spectrophotométrie uv-visible à 517nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité anti radicalaire (*Milardovic et al, 2014*).

➤ Mode opératoire

Une solution éthanolique de DPPH à 0,1 mM est mélangée avec différentes concentrations des extraits ou avec des standards,

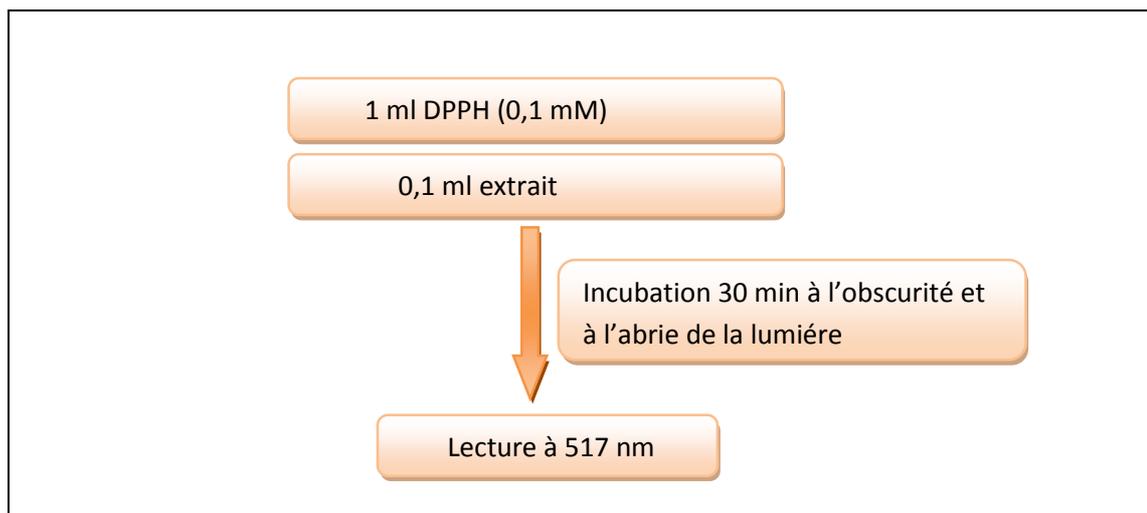


Figure N°9 : Protocole de réduction du radical DPPH (Seung- Cheol Lee *et al.* , 2004)

➤ **Expression des résultats :**

L'activité scavenger du radical DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition de ce dernier selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \left(\frac{\text{AbsC} - \text{AbsT}}{\text{AbsC}} \right) \times 100$$

AbsC : Absorbance du contrôle.

AbsT : Absorbance de test.

NB : Le contrôle négatif contient d'éthanol à la place de l'extrait.

II.4.2. ACTIVITE SCAVENGER DU RADICAL ABTS⁺

➤ **Principe :**

Ce test est basé sur la mesure de la réduction du radical ABTS⁺ qui est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydant des échantillons. Ce radical cationique est facilement formé par l'oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleu. (Marc *et al.*, 2004)

L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cationique entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance. Cette diminution dépend de l'activité antioxydant des composés testés, du temps et de la concentration.

➤ **Mode opératoire :**

L'activité scavenger du radical ABTS est mesuré selon le protocole décrit par (*Ramful et al., 2010*)

A-Préparation de la solution anti radicalaire d'ABTS⁺ :

72mg d'ABTS solubilisé dans l'eau distillé à 7mM ont été mélangés à 13,24mg de persulfate de potassium (2,5mM). Le mélange ainsi obtenu est conservé à l'abri de la lumière et a température ambiante durant 16heurs. Avant l'usage, la solution d'ABTS a été dilué avec de l'eau distillée pour obtenir une absorbance à 734nm.

B- Mesure de l'activité :

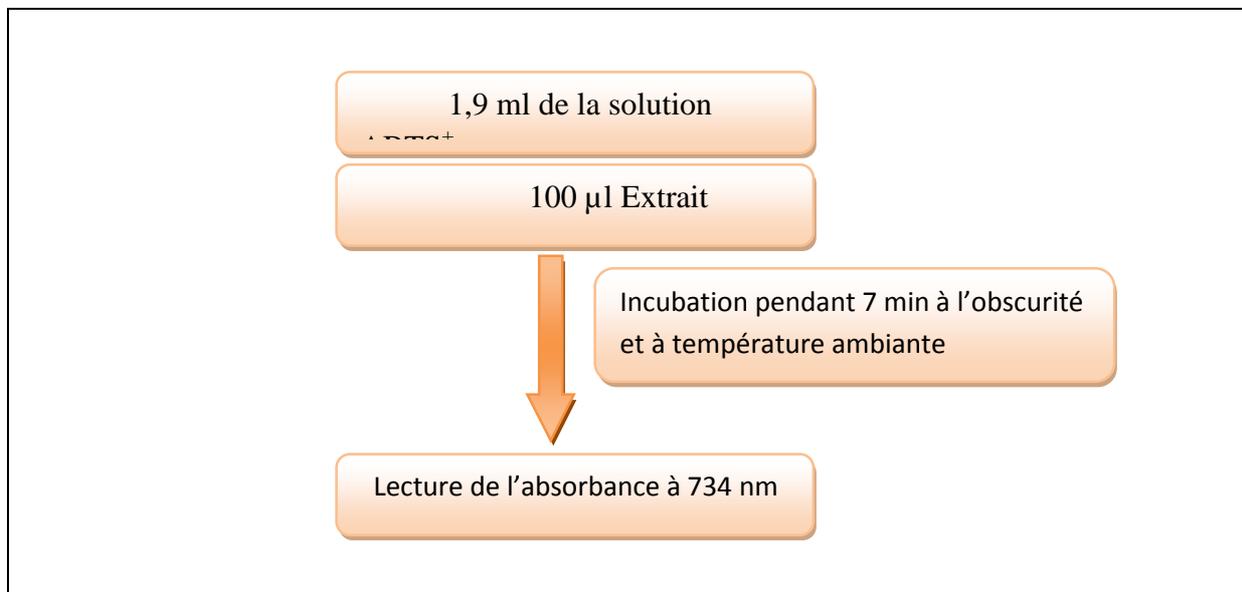


Figure N°10 : Protocole de réduction du radical Abts ((*Ramful et al.,2010*))

➤ **Expression des résultats :**

Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺ :

$$\% \text{ d'Inhibition} = \left(\frac{\text{AbsC} - \text{AbsT}}{\text{AbsC}} \right) \times 100$$

AbsC : Absorbance du contrôle

AbsT : Absorbance du test

- La capacité antioxydant équivalente au trolox TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage réalisé avec le trolox.

II.5. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE

II.5.1. STABILISATION MEMBRANAIRE (HEMOLYSE HYPOTONIQUE)

➤ **Principe :**

La capacité de nos extraits à stabiliser la membrane des globules rouges humains est évaluée par la méthode d'hémolyse hypotonique décrite par Les globules rouges qui constituent un bon modèle pour suivre les mouvements d'eau. Placés dans une solution hypotonique, leur éclatement (hémolyse) laisse seulement un fantôme membranaire et de l'hémoglobine en solution, transformant la suspension opaque de cellules en une solution rouge translucide d'hémoglobine. L'hémolyse est estimée en suivant le taux d'hémoglobine libérée à 450nm. Le diclofenac est utilisé comme standard (Seeman et Weinstein, 1966).

➤ **Préparation des globules rouges**

Les globules rouges sont prélevés d'un volontaire sain qui n'a pas pris d'anti-inflammatoire pendant 15 jours avant le prélèvement. L'obtention des globules rouges du sang total a été effectué comme suit :

- Centrifugation du sang à 3000rpm pendant 20 mn.
- Lavage des érythrocytes 3fois par une solution iso-saline.
- Les globules rouges sont reconstitués sous forme de suspension à 10% toujours dans la solution iso-saline, la solution est conservée à 4°C et utilisée au maximum dans les 6heurs suivant sa préparation

➤ **Mode opératoire :**

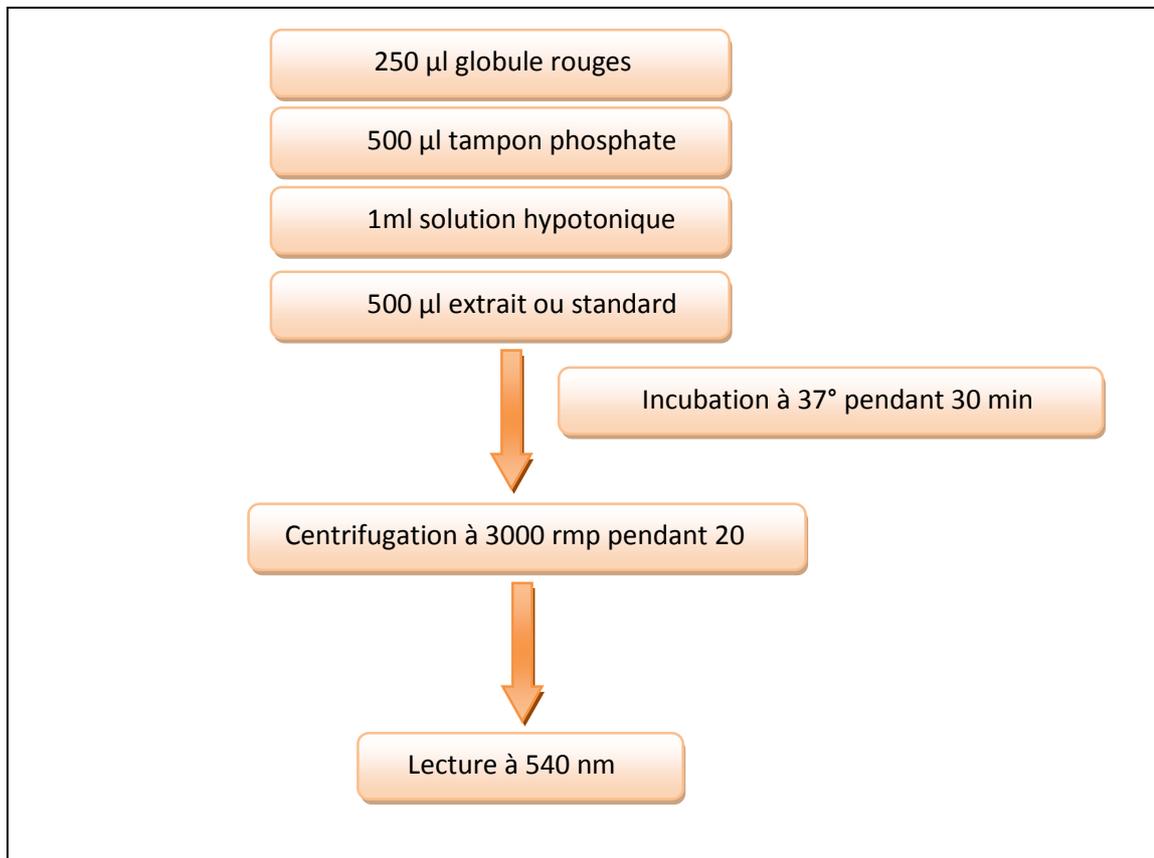


Figure N°11 : Stabilisation membranaire-hémolyse hypotonique (Seenman et Wainstein, 1966)

➤ **Expression des résultats :**

$$\% \text{ d'Inhibition} = \left(\frac{\text{AbsC} - \text{AbsT}}{\text{AbsC}} \right) \times 100$$

ABS C : Absorbance du contrôle

ABS T : Absorbance du test

NB : Le contrôle contient une solution saline hypotonique à la place des extraits et des standards.

II.5.2. INHIBITION ET LA DENATURATION PROTEIQUE (ALBUMINE HUMAIN)

➤ Principe de la méthode :

L'inhibition de la dénaturation de l'albumine humaine est évaluée par la méthode de **(Mizushima et Kobayach , 1968)** L'albumine est mise en contact avec les extraits dans un milieu légèrement acide, la dénaturation est suivie en observant la turbidité de la solution d'albumine à 660 nm. Le diclofénac est utilisé comme standard.

➤ Mode opératoire :

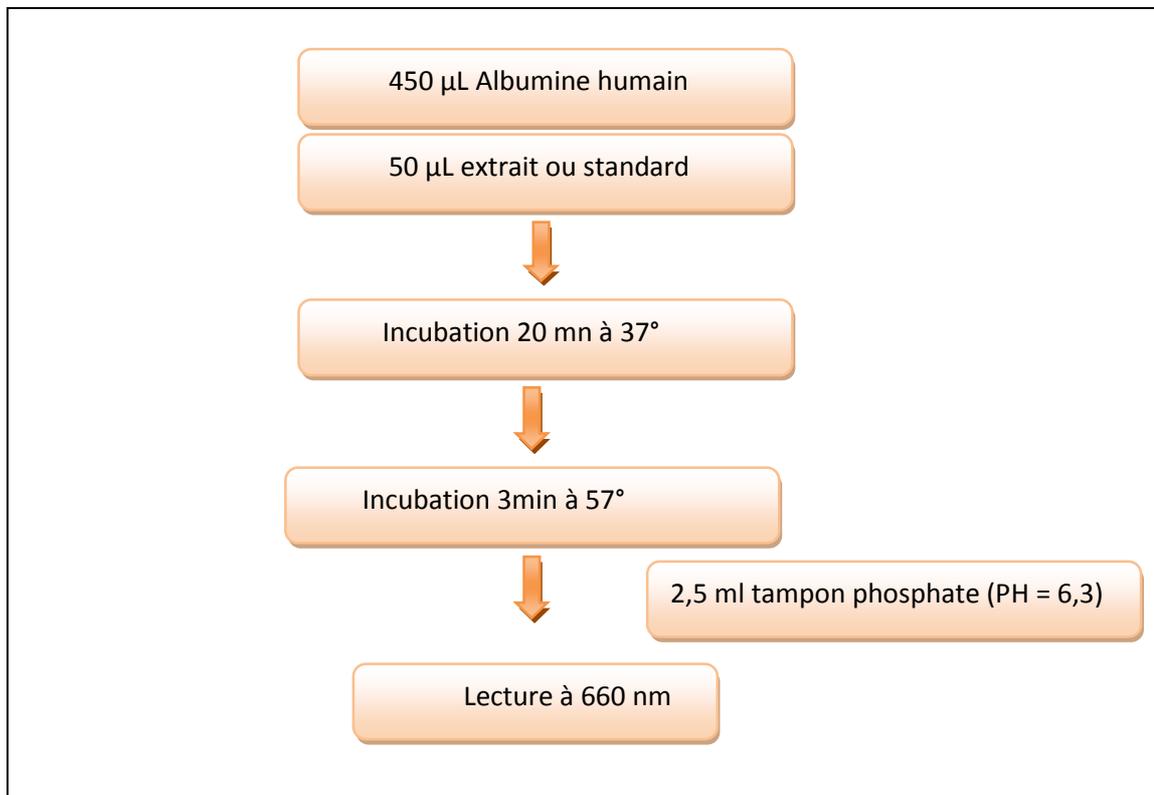


Figure N°12 : Protocole d'inhibition de la dénaturation de l'albumine (**Mizushima et Kobayachi, 1968**)

Le contrôle représente 100% de dénaturation

➤ Expression des résultats :

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = 100 - \left[\left(\frac{\text{AbsC} - \text{AbsT}}{\text{AbsC}} \right) \times 100 \right]$$

Abs C : Absorbance du contrôle,

Abs T : Absorbance du test – Absorbance du blanc du test.

II.6. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD et analysés par le test Anova univarié ,et pour la détermination des taux signification ,les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

Résultats et discussions

III.1.TAUX D'EXTRACTION

L'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale dépend de plusieurs facteurs qui contribuent à son efficacité, la méthode d'extraction, la granulométrie des particules, la quantité de la matière sèche utilisée, la durée d'extraction, la nature et le volume du solvant utilisée.

La méthode d'extraction par macération en utilisant l'éthanol comme un solvant d'extraction, a permis d'obtenir les résultats qui sont représentés dans la figure N°14

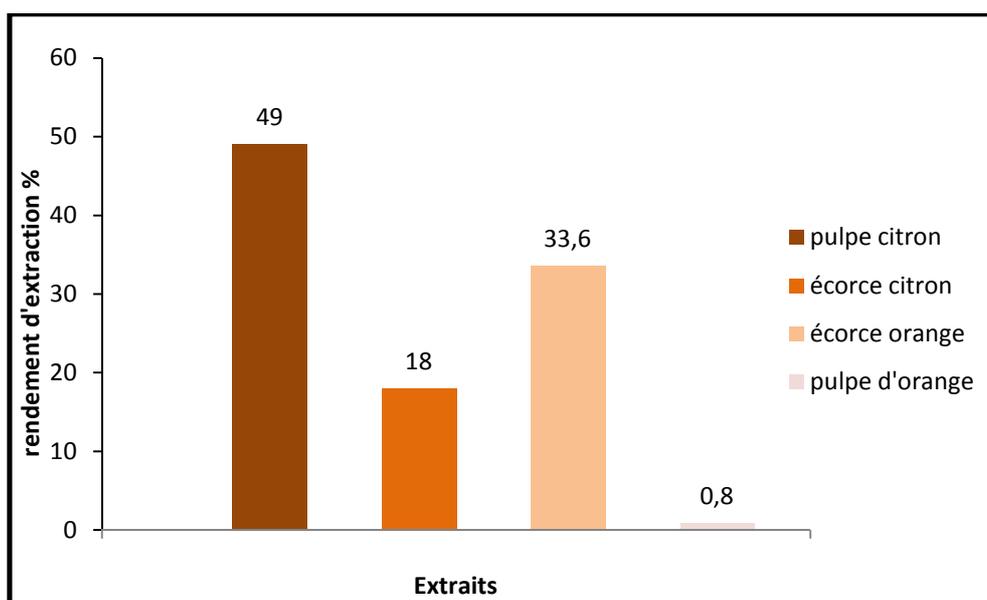


Figure N°13: Taux d'extraction des polyphénols de l'écorce et la pulpe de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*.

Bien que le solvant d'extraction est le même, une variabilité des rendements d'extraction entre les quatre échantillons a été constatée. Ainsi, la pulpe de citron a donné le rendement le plus élevé (49%) suivie de celui de l'écorce d'orange (33.6%) puis de l'écorce de citron (18%) et enfin la pulpe d'orange avec le plus faible rendement (0.8%).

D'après une étude réalisée par **Ibrahim *et al.*(2012)** sur l'écorce d'orange, l'utilisation d'éthanol comme un solvant d'extraction a donné un taux d'extraction de 27.96%, ce qui est inférieur au résultat trouvé lors de cette étude. Selon **Attard *et al.*(2002)**, cette différence de rendement est peut être due à la différence du solvant mais également à la méthode d'extraction.

III.2.DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES

III.2.1.DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX

Au cours du dosage des polyphénols totaux, une coloration bleu est apparue après 60 min de l'ajout de réactif de Folin-ciocalteu et carbonate de sodium, ceci témoigne la présence d'une quantité significative de polyphénols totaux dans les extraits.

La teneur en polyphénols totaux pour chaque extrait est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide Gallique à des concentrations (25...100µg/ml).

La teneur des polyphénols totaux obtenue est exprimée en µg EAG/g ES et présentées dans la figure N°15

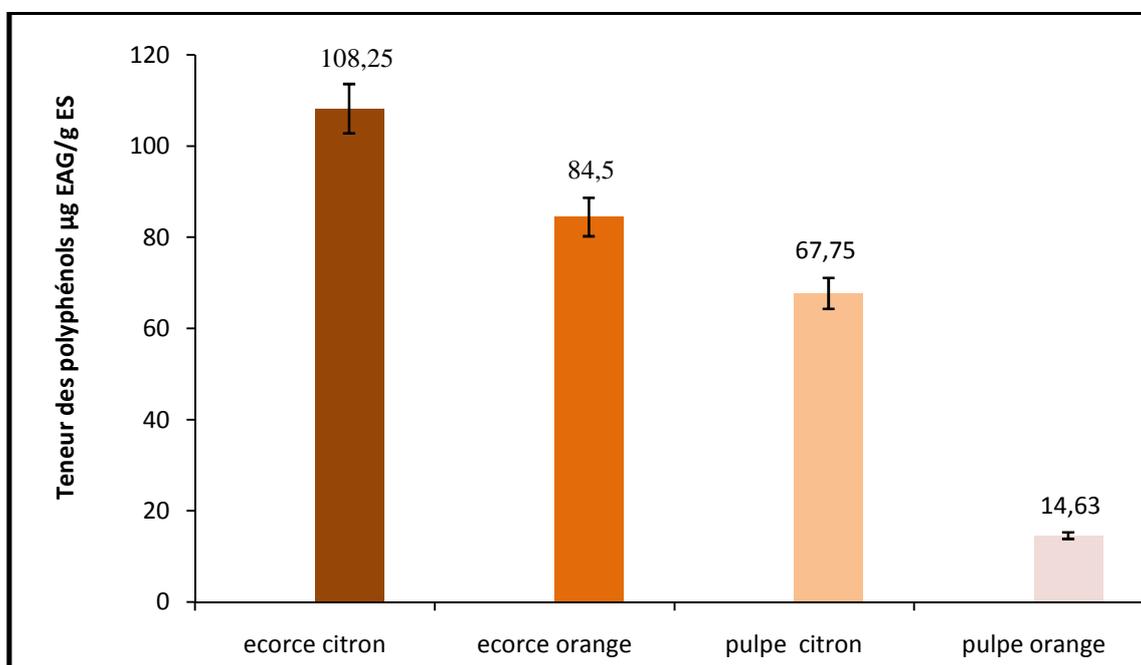


Figure N°14: Teneur en polyphénols de l'écorce et la pulpe de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*

Les extraits éthanolique de citron et d'orange ont montrés des résultats différentes selon l'échantillon analysé et qui sont de (108,25±0.37µg EAG/mg ES); (67,75±2.75 µg EAG/mg ES); (84,5±2.75 µg EAG/mg ES); (14,63±0.813 µg EAG/mg ES), correspondants aux extraits suivant respectivement : écorce de citron, pulpe de citron, écorce d'orange, pulpe d'orange.

Selon les résultats obtenus, la teneur en polyphénols totaux est significativement ($P \leq 0.05$) différente De plus, il est à noter que les écorces de Citrus sont beaucoup plus riches en polyphénols que dans leur pulpe. Ces résultats sont en accord avec ceux démontré par d'autres travaux antérieurs sur la teneur totale de polyphénols de citrus (**Gorinstein et al.,**

2001). Toutefois, d'autres études ont montré que les teneurs en polyphénols totaux des extraits d'écorce et de la pulpe de citron et d'orange sont variables et non conformes avec nos résultats (Ghasemi *et al.*, 2009). Cette variation est peut-être due à la différence de lieu, à la période de récolte et aussi à la température. Une étude réalisée par Attard (2002) confirme que la teneur en composées phénoliques est faible pendant la période de floraison.

III.2.2. DOSAGE DES FLAVONOÏDE

Une couleur jaunâtre est formée dans tous les extraits des deux espèces après l'addition de la solution de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), cette coloration révèle la présence des flavonoïdes dans les extraits analysés.

La teneur en flavonoïde a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la Quercitine (25...100 $\mu g/ml$). La teneur des flavonoïdes obtenus à partir des quatre extraits sont présentées dans la figure 16

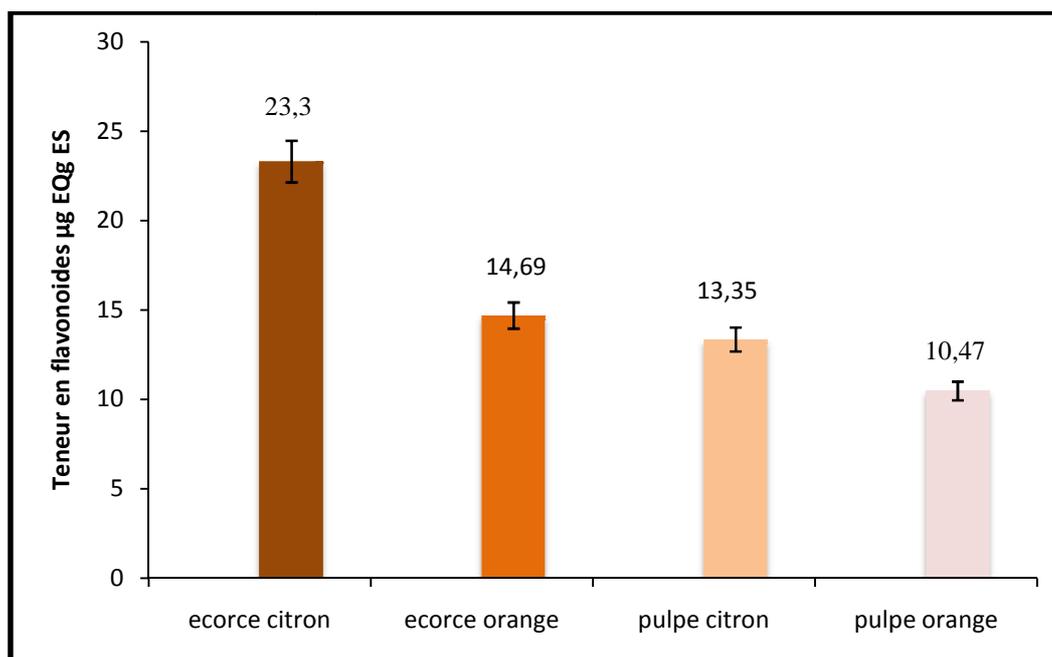


Figure N°15 : Teneur en flavonoïdes des écorces et des pulpes prélevée à partir du citron et l'orange.

Ces résultats ont montrés une nette différence de la teneur en flavonoïdes selon la partie de la plante étudiée. Ainsi, il est à noter que les écorces des deux espèces étudiées ont révélés une teneur significativement ($P \leq 0.05$) importante par rapport à la pulpe. De plus, la valeur

maximale de la teneur en flavonoïdes a été surtout rencontrée dans l'écorce de citron ($23,3 \pm 0.61 \mu\text{g EQ /mg ES}$), suivi de l'écorce d'orange avec ($14,69 \pm 0.23 \mu\text{g EQ/mgES}$). Dans la pulpe, la teneur est presque identique chez les deux espèces avec ($13,35 \pm 0.66 \mu\text{g EQ/mgES}$ et ($10,47 \pm 0.273 \mu\text{g EQ/mgES}$) respectivement chez le citron et l'orange.

Selon ce résultat, on peut constater une répartition inégale des flavonoïdes dans les différentes parties de la plante. Cette variabilité de la teneur en flavonoïdes chez le citron et l'orange a également été signalée par d'autres auteurs (**Ghasemi *et al.*, 2009 ; Ramful *et al.*, 2010**). Ceci peut être expliqué par l'influence de certains facteurs extrinsèques tels que la méthode d'extraction et la nature du solvant utilisé.

III.3. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANT

III.3.1.EVALUATION DU POUVOIR ANTI-RADICALAIRE PAR DPPH

Après 30min d'incubation de la solution DPPH-Extrait (à différente concentration), la coloration violette vire à une coloration jaune dans les quatre extraits analysés, ce changement de couleur est le résultat de la réduction de DPPH, ce qui montre que les quatre extraits de Citrus ont un effet scavenger du radical DPPH.

Les résultats de l'activité anti radicalaire de l'écorce et la pulpe de citron et de l'orange sont exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH, par rapport aux différentes concentrations des extraits.

L'évaluation de l'activité scavenger des quatre extraits est représentée dans la figure N°17

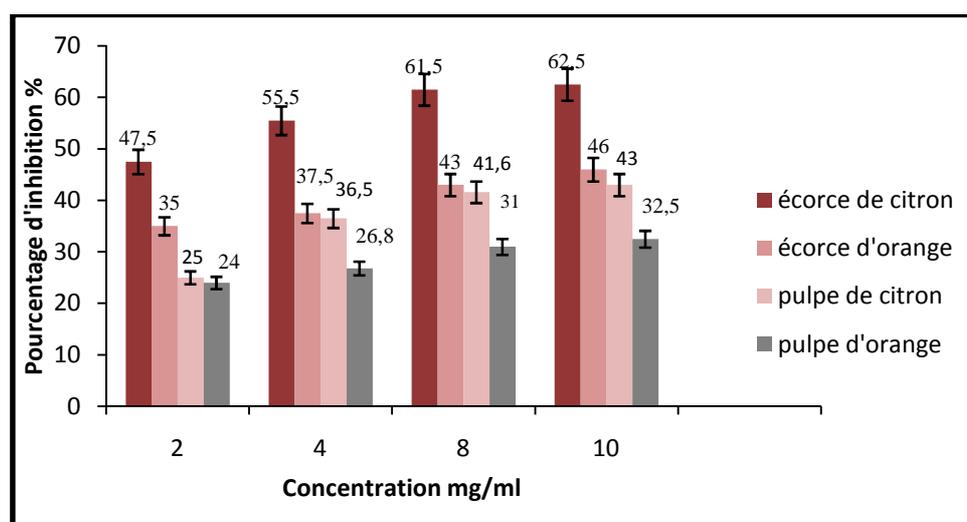


Figure N°16 : Evaluation du pouvoir anti radicalaire des extraits d'écorce et de la pulpe de citron et d'orange

L'activité antioxydante évaluée pour les différents extraits de Citrus ainsi que les standards (contrôle positif) utilisés est exprimée en IC₅₀ (concentration inhibitrice 50) ; c'est la concentration d'extrait qui neutralise (réduit) 50% de radical libre(DPPH), plus l'IC₅₀ est faible et plus l'extrait est avec un potentiel antioxydant puissant. L'ensemble des résultats de l'activité antioxydante exprimée en IC₅₀ est représenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau N°4: Les valeurs d'IC₅₀ des différents extraits de citron et d'orange

	IC ₅₀ mg/ml
Ecorce de citron	5,72
Pulpe de citron	10,35
Ecorce d'orange	9,69
Pulpe d'orange	15,2
BHA	0.095
Acide ascorbique	0.076

Selon ces résultats, il est à constater que quel que soit l'espèce, la partie écorce est celle qui a révélé une IC₅₀ la plus faible. Ceci a justifié que les écorces de citron et d'orange sont significativement ($P \leq 0.05$) plus actives que les pulpes des deux espèces. D'autre part, l'écorce de citron est plus active que l'écorce d'orange. Toutefois, cette activité antioxydante est significativement ($P \leq 0.05$) moins importante par rapport aux standards utilisés qui ont donné des IC₅₀ plus faible égales à 76.27µg/ml et 95.61µg/ml pour l'acide ascorbique et le BHA respectivement.

La différence dans l'activité anti-radicalaire au DPPH entre les extraits des deux citrus analysés est probablement due à leur composition en différents composés phénoliques. La réduction du DPPH n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais aux interactions entre plusieurs composés, ces interaction peuvent exister dans un extrait pas dans un autre, conduisant ainsi à cette différence d'activité entre les extraits.

Nos résultats sont en accord avec ceux déjà publiés qui ont montrés que les écorces de citrus représentent la fraction la plus riche en polyphénols, laquelle a révélé un potentiel antioxydant puissant (Bocco *et al.*, 1998 ;Gorinstein *et al.*, 2001). Cependant, Ghasemi *et al.* (2009) ont montré que l'activité anti-radicalaire des écorces de citron et d'orange représentaient des

valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 1,4mg/ml et 1,1 mg/ml respectivement, qui sont significativement inférieures comparant à nos résultats étudiés.

III.3.2.ACTIVITE SCAVENGER ABTS

Afin de valider les résultats de l'efficacité antioxydants des extraits de citrus obtenus précédemment par le test anti-radicalaire du DPPH, nous avons utilisés un 2^{ème} test basé sur la capacité de piégeage du proton du radical cationique ABTS^{o+}. Les pourcentages d'inhibition des extraits sont représentés dans la figure N°18

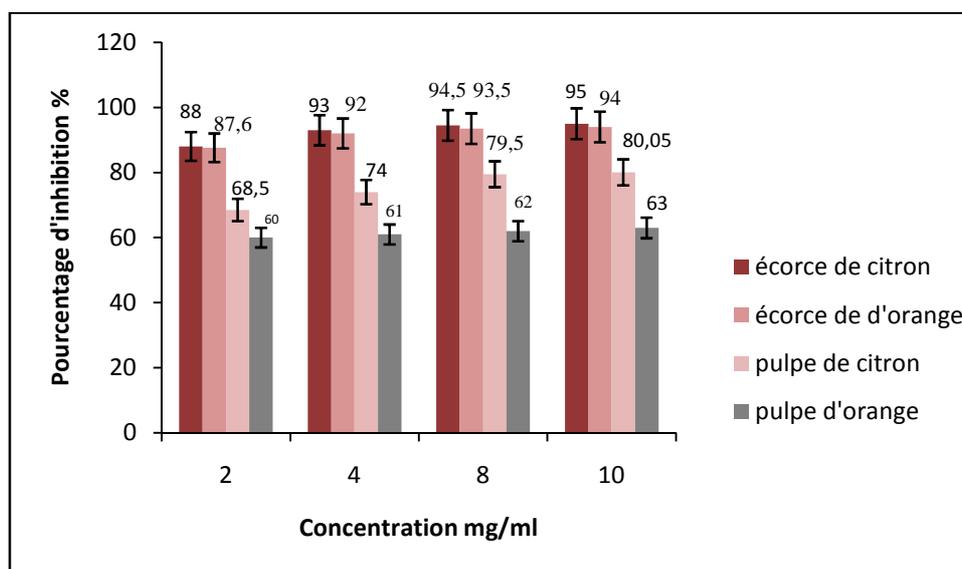


Figure N°17 : Activité scavenging du radical ABTS des extraits de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*

Il en ressort que l'activité anti-radicalaire de l'ABTS est d'autant plus supérieure que la concentration est élevée. D'autre part, ces résultats indiquent que pour toutes les concentrations, l'écorce présente le plus grand effet inhibiteur que la pulpe. Pour une concentration minimale de 2 mg/ml l'écorce a révélé une inhibition équivalente à 88%±0.28 et 87,6%±1.14 respectivement pour le citron et l'orange. La pulpe a par contre montré une inhibition significativement inférieure ($P \leq 0.05$), (68.6%±1.16 ; 60%±0.72) pour le citron et l'orange respectivement.

La capacité antioxydant pour ce test a été exprimée en équivalent Tolox (TEAC), qui correspond à la concentration du Trolox en µg/ml donnant la même activité qu'un milligramme de la substance testée, plus le TEAC est élevée plus l'extrait est efficace.

Pour pouvoir calculer le TEAC, une courbe d'étalonnage est réalisée avec le Trolox et les résultats obtenus sont donnés en équivalent $\mu\text{g/ml}$ Trolox/mg d'extrait.

Tableau N°5 : les valeurs de TEAC des extraits

	Concentration $\mu\text{g/ml}$ trolox/mg E
Ecorce de citron	0.213
Pulpe de citron	0.17
Ecorce d'orange	0.21
Pulpe d'orange	0.121

Pour les deux espèces de citrus, l'écorce présente le TEAC le plus élevé (0,213 $\mu\text{g/ml}$ trolox par mg d'extrait de citron) ; (0,21 $\mu\text{g/ml}$ trolox par mg d'extrait d'orange), il est donc considéré comme étant le plus efficace pour l'inhibition cationique ABTS. Suivie de la pulpe avec un TEAC plus inférieure (0,170 $\mu\text{g/ml}$ trolox par mg d'extrait ; 0,121 $\mu\text{g/ml}$ trolox par mg d'extrait) respectivement pour le citron et l'orange. L'extrait de l'écorce des deux espèces de citrus serait donc plus actif que celui de la pulpe. Ce résultat serait compatible avec la composition chimique déterminée pour les polyphénols où une prédominance de ces composés a été clairement identifiée dans l'écorce que dans la pulpe, lequel expliquerait son pouvoir anti-radicalaire relativement élevé dans l'extrait d'écorce par rapport à celui de la pulpe. Ces travaux sont en accord avec des résultats déjà publiés (**Ortuno *et al.*, 2006** ; **Halliwell, 2007**) selon lesquels les polyphénols constitueraient une bonne source d'antioxydants naturels. De plus, les travaux de **Gorinstein *et al.* (2001)** confirment nos résultats et ont montrés que le potentiel antioxydant totale par piégeage du radical ABTS a été plus élevé dans les écorces de citrons que dans leur pulpe.

III.4.ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIR

III.4.1.STABILISATION MEMBRANAIRE (HEMOLYSE HYPOTONIQUE)

Les deux parties testées pour les deux espèces de citrus (écorce, pulpe) ont assuré aux globules rouges humains une protection contre l'hémolyse hypotonique qui augmente en fonction de la concentration utilisée. Les pourcentages obtenus sont présentés dans la figure 5

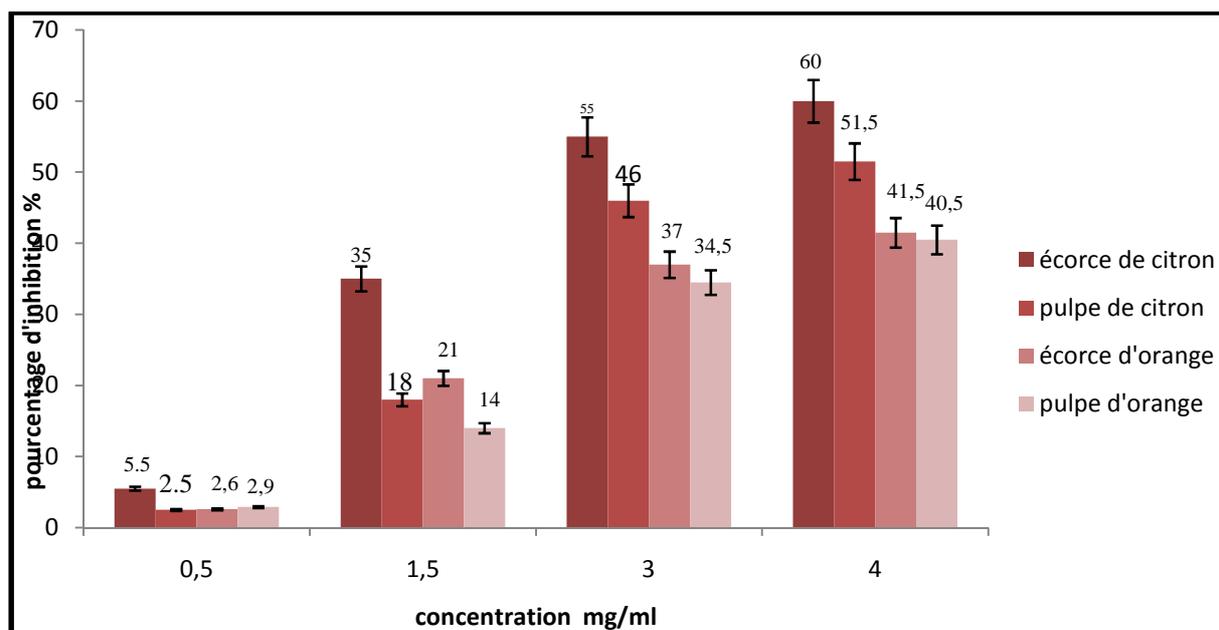


Figure N°18 : Stabilisation membranaire par les différentes parties de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*.

Pour une concentration de 4 mg/ml, le citron a procuré aux globules rouges la plus grande protection contre l’hémolyse hypotonique avec un pourcentage d’inhibition de (55,5% ; 36,5) pour l’écorce et la pulpe respectivement suivie de celui de l’écorce d’orange 33% ; et enfin la pulpe d’orange 26,8%.

L’activité anti-hémolytique des quatre extraits ainsi que de standard utilisé (Diclofenac) est exprimé en IC₅₀ (Tableau N°7).

Tableau N°6 : Les valeurs d’IC₅₀ pour les différents extraits de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*

	IC ₅₀ (mg/ml)
Ecorce de citron	2,98
Pulpe de citron	3,67
Ecorce d’orange	4,43
Pulpe d’orange	4,72
Diclofenac	0.82

Le citron a présenté la plus faible IC₅₀ correspondant à 2,98mg/ml pour l’écorce et de 3,67mg /ml pour la pulpe, par rapport à celle de l’orange qui a indiqué des IC₅₀ égales à

4,43mg/ml dans l'écorce ; 4,72mg/ml dans la pulpe. Par conséquent, il en ressort que le citron possède une activité anti-hémolytique significativement ($P \leq 0.05$) la plus importante. Mais cette activité reste faible comparée au Diclofenac ; un anti-inflammatoire non stéroïdien, lequel a assuré une protection de 68,28% à 250 $\mu\text{g/ml}$ et avec une IC_{50} de 0,162mg/ml. Cette protection au Diclofenac est supérieure à celle des quatre échantillons analysés. Cette stabilisation de la membrane est assurée d'une manière dépendante de la dose (**Manthey et al., 2001**). L'activité anti-inflammatoire des polyphénols a été rapporté à être associé à leur propriété de piégeage des radicaux libres.

III.4.2.DENATURATION D PROTIQUE (ALBUMINE HUMAIN)

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et secondaire par application d'une contrainte externe ou d'un composé, tel que un acide fort ou une base, d'un sel inorganique concentré, un solvant organique ou à la chaleur. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique une fois dénaturé. La dénaturation des protéines est une parmi les causes majeures de l'apparition de l'inflammation et la polyarthrite rhumatoïde. Plusieurs molécules actives anti-inflammatoires ont démontrés leur capacité dose-dépendante à inhiber la dénaturation des protéines induite par voie thermique (**Grant et al., 1970**).

Les résultats obtenus pour les différents extraits de citrus testés sont montrés dans la figure N°19

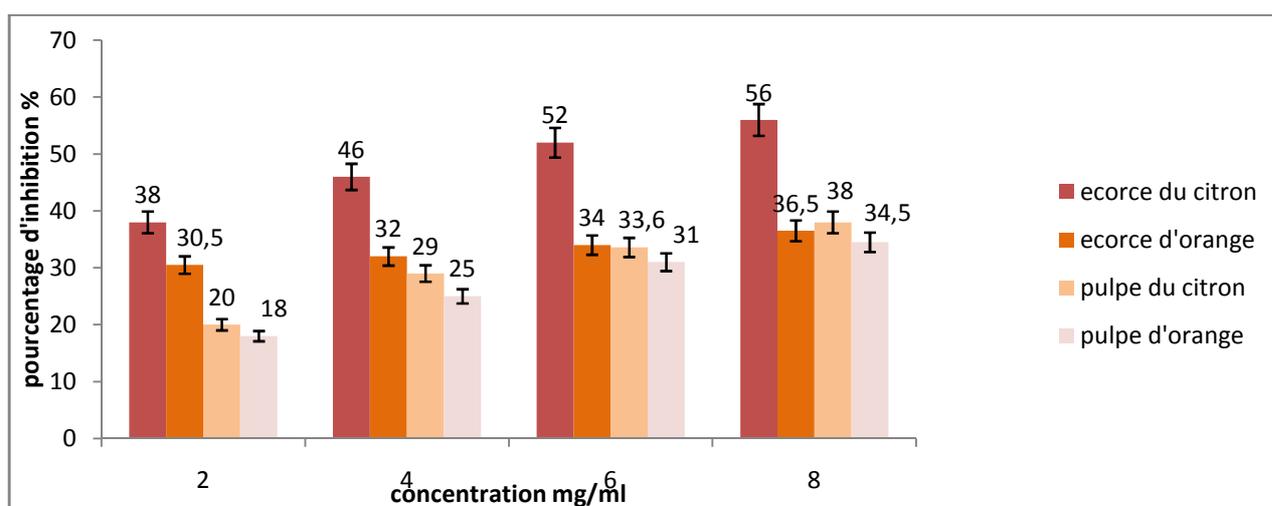


Figure N°19 : Inhibition de la dénaturation d'albumine humaine par les différents extraits de citrus

A une concentration de 6 mg/ml, les extraits d'écorce et de pulpe de Citrus limon ont montré une capacité d'inhibition de la dénaturation de l'albumine humaine de 52 % ; 33,6 % respectivement. Par contre, les extraits d'écorce et de pulpe de Citrus sinensis ont révélé des effets inhibiteurs moins prononcés comparés aux extraits de citron, et les pourcentages d'inhibition de dénaturation de l'albumine sont de l'ordre de 34,5 % et 33 % respectivement pour l'écorce et la pulpe d'orange. Le diclofenac utilisé comme contrôle positif, a montré un taux d'inhibition de 80.68 % à une concentration de 250 µg/ml.

L'activité antiarthritique des quatre extraits ainsi que le standard utilisé est exprimé en IC_{50} , et les valeurs d' IC_{50} sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau N°7 : Les valeurs d' IC_{50} de l'activité d'inhibition de la dénaturation de l'albumine humaine pour les quatre extraits de citrus

	IC_{50} (mg/ml)
Ecorce de citron	6,56
Pulpe de citron	9,85
Ecorce d'orange	10,21
Pulpe de citron	10,66
Diclofenac	0.082

Selon ce résultat, il s'est avéré que l'extrait d'écorce de citron est significativement le plus actif avec une IC_{50} très inférieure aux autres extraits. Les extraits (pulpe de citron, écorce et pulpe d'orange) sont marqués par une activité d'inhibition faible et quasiment identique et avec des IC_{50} non significativement différentes. Le diclofénac a présenté une inhibition significativement maximale de 80.68 % à une concentration de 250 µg/ml avec une IC_{50} plus faible 0.082 mg/ml.

Par ailleurs, l'activité anti-inflammatoire des composés naturels a souvent été associée à leur activité antioxydante. De plus, elle a également révélé être d'une grande importance sur l'inhibition de la production de l'acide nitrique (NO) dans les macrophages et, par conséquent, sur l'inhibition de l'inflammation (Wang et Mazza, 2002).

CONCLUSION

La présente étude avait pour objectif le dosage des différentes classes de composés phénoliques extraits à partir de l'écorce et la pulpe de citrus limon et citrus sinensis ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydants et anti-inflammatoire.

Dans cet objectif, cette étude s'est basée sur une extraction par macération en utilisant un seul solvant éthanol à 96%, ceci a montré que chaque fraction analysée a présenté un rendement différent.

Les résultats des différents dosages ont permis de mettre en évidence la richesse des extraits (écorce, pulpe) en différents composés phénolique (polyphénols totaux, flavonoïde), les teneurs en ces composés se différent d'un extrait à un autre, ce qui révèle l'effet d'extrait sur le taux d'extraction.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire (antioxydant) contre le radical ABTS et DPPH à des concentrations différentes a prouvé que l'écorce possède une bonne activité scavenging supérieure à celle de la pulpe, ceci justifie que ces fractions ont un meilleur effet dans l'inhibition du radical DPPH que dans l'inhibition du radical ABTS.

Concernant l'activité anti-inflammatoire, les écorces sont les plus actifs que ça soit dans le test, de stabilisation membranaire ou dans le test d'inhibition de la dénaturation l'albumine humaine, cet extrait a donné d'excellentes capacités anti-inflammatoires. La pulpe a par contre présenté une faible activité anti-inflammatoire.

Dans les perspectives souhaités, et dans le but de compléter cette étude, il serait nécessaire de signaler les écorces de citrus limon et Citrus sinensis comme étant une bonne source de composés phénoliques que la pulpe, cet extrait a montré efficacement son potentiel antioxydant ou encore se protéger contre les radicaux libres qui sont liés à l'origine de l'apparition de nombreuses maladies.

Il serait alors intéressant de réaliser d'autres études pour évaluer le potentiel antioxydant in vivo et pour s'assurer du non toxicité des écorces et des pulpes.

Des études sur la biodisponibilité et mode d'utilisation de ces métabolites secondaires mérite d'être bien menées afin d'envisager la formulation d'un métabolite bioactif provenant d'extrait de plantes doué d'une activité antioxydant qui peut être une alternative aux médicaments synthétiques et peuvent faire face aux maladies liés au stress oxydatif.

A

- **Arias, B.A., et Ramon, L. (2005).** Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Ethnopharmacology*, 97: 89-9523.
- **Attard, E. (2002).** Rapid Detection of Cucurbitacins in Tissues and in vitro Cultures of *Ecballium elaterium* (L). A. Rich. *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, 25: 71-75.
- **Aurousseau, B., Durand, D. et Gruffat, D. (2004).** Contrôle des phénomènes Oxydatifs pendant la destation chez les monagastriques et les ruminants. *INRA Prod Anim*, 17(5) : 339-354.

B

- **Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Science*, 22(3) : 266-72.
- **Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U. et Gattuso, G. (2011).** Distribution of C- and O-glucosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl) glycosyl flavonones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. Juice. *Food Chemistry*, 124: 576-582.
- **Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1998).** Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *J. Agric. Food Chem*, 46(6): 2123-29.
- **Bruneton, J. (1999).** Les tanins. *Editions médicales internationales*, p.369-404.

C

- **Canaud, B., Sénécal, L., Leray-Moragués, H., Picard-Gontiers, A., Terrier, N., Morena, M. et Cristol, J.P. (2003).** L'accès vasculaire, une cause d'inflammation sous-estimée chez l'hémodialysé. *Néphrologie*, 7: 353-358.
- **Charle, N., Nan, C. et Thamas, K. (2009).** Resolving inflammation : dual inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol. Author manuscript*, 85(5): 349-361.
- **Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M.G., Sarma, T.C. et Boruah, P. (2009).** Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT – Food Science and technology*, 42 : 777-780.
- **Cronquist, A. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants.

Références Bibliographiques

- **Cuplan, F. (2011).** Guide nutritionnel des plantes sauvages et cultivées. *Sophie Doguin Delachaux et Nestlé SA, paris*, p.248.

D

- **Del-Rio, J.A., Fuster, M.D., Gomez, P., Porrás, I., Garcia-Lidon, A. et Ortuno, A. (2004).** Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food chemistry*, 84: 457-461.
- **Donatuse, E.O. (2008).** *Citrus fruits: A rich source of phytochemicals and their Roles in Human Health*, Departement of chemistry Micheal okpara university of agriculture umudike, P.M7276, 451-471.

E

- **Etebu, E., Nwazoma, A.B. (2014).** A Review on sweet orange (citrus sinensis). *Diseases and management*, 2: 33-7.

F

- **Fadel, F., Fattouch, S., Tahrouch, F., Lahmar, R., Benddou, A., Hatimi. (2011).** The phenolic compounds of Ceratonia siliqua pulps and seeds (Les composés phénoliques des pulpes et des graines de Ceratonia siliqua), 2 (3): 285-292.
- **FAO. (2008).** Food agriculture organization .FAO state statistics database agriculture ,Rome,Italy.P.52-58.
- **FAO. (2010).** Annual statistique :citrus ,www.fao.org.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. In : *Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique : L'actualité chimique*. P. 108-115.
- **Fuchs, J. et packer, L. (2005).** Environmental Stressors in Health and Disease. *Tryler et francice library*.

G

- **Ghasemi , k., Yosef, G., E.A.M. (2009).** Antioxidant activity, phenol and flavonoids content of 13 citrus species and tissues. *Pakistan journal of biological science*, 22(2): 277-281.
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques,rôle prophylactique et emplois en thérapeutique, (4): 162-169.

Références Bibliographiques

- **Gmitter, G., Chunxian, Jr., Nageswara, M. et Jaya, R. (2007).** Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. *Fruits and Nuts.C. Kole*. Florida. 4:CHA14.
- **Goetz, P. (2014).** Citrus limon burm of Rutacées citronnier. *Matière médical pratique*, 12 :116-121.
- **Gonzalez-Molina, E., Domiguez-perles, R., Moreno, D.A., et Garcia –viquerura, C. (2010).** Natural Bioactive Compounds of Citrus limon for Food and Héalth. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51: 327-345.
- **Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, YS. (2001).** Comparison of Some Biochemical Characteristics of Different Citrus Fruits. *Food Chem*, 74(3): 309-315.
- **Goudeau, D., Uratsu, S.L., Inoue, k., Dasiln, A., Cook, D., Reagan, L., et Dandekar, A .M. (2008).** Tuning the orchestra:selective gene regulation and orange fruit quality. *Plant science*, 174: 310-320.
- **Grant, N.H., Alburn, H.E., Kryzanasuskas, C. (1970).** Stabilization of serum albumin by anti-inflammatory drugs. *BiochemPharmacol*, 19(3): 715-722.

H

- **Halliwell, B. (2007).** Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovasc Res*, 73(2): 341-347.
- **Heller, W., Forkmann, G. (1993).** The flavonoids. Advances in research since 1986. In: *Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology*.London: Chapman et Hall. pp: 399-425.
- **Hopkins, W.G. (2003).** Physiologie végétale. Edition Debock et lancier, pp : 276.
- **Hequet, V., Le Corre, M., Rigault, F. et Blanfort, V. (2009).** Les espèces Exotiques Envahissantes de Nouvelle-Calédonie.IRD , AMAP , Nouméa. 87.
- **Huet, O. et Duranteau, J. (2008).** Dysfonction endothéliale : role des radicaux libres endothelial dysfunction : Involvement of reactive oxygen species. *Réanimation*, 17: 387-392.

I

- **Ibrahium, M.I. et hegazy, A.E. (2012).** Antioxidant activities of orange peel extract. *Department of food science and technology*, 18(5): 684-688.

J

- **Jiang, Y. Jiangrong, L. (2007).** Litchi flavonoids: Isolation, Identification and biological Activity. 12: 745-758.

k

- **Kamal, GM., Anwar, F., Hussain, AI., Sarri, N. et Ashraf, M.A., (2011).** Le rendement et la composition chimique des huiles essentielles d'agrumes tel que modifié par prétraitement de séchage des écorces. *International food Research Journal* , 18 (4) : 1275-1282.

L

- **Ladoh, C.F., Dibong S.D., Nyegue, M.A., Djembissi Talla, R.P., Lenta Ndjakou, B., Mpondo, E., Yinyang, J., et Wansi, J.D. (1997).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*, 84: 7636– 7643.
- **Leclerc, H. (1984).** *Le citron, les fruits de France*. Masson 9^{ème} Ed. p : 274.
- **Lemk, T.L. et Williams, D.A. (2013).** Foyes Principles of Medicinal Chemistry: Lippincott Williams et wilkins.
- **Lien, E., Sellati, T.J., Yoshimura, A., Flo, T.H., Rawadi, G., Finberg, R.W., Carroll, J.D., Espevik, T., Ingalls, R.R., et Radof, J.D. (1999).** Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem*, 274: 33419-33425.

M

- **Macheix, J.J., Fleurie A., et Sarni-Manchado, P. (2005).** Composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition et roles. In : *Les polyphénols en Agroalimentaire*. Tec and Doc Edition. Pp: 133-141.
- **Manthey, J.A., Guthrie, N., Grohmann, K. (2001).** Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 8 : 135-153.
- **Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M. et Fritsch,P.(2004).**Méthode d'évaluation de potential antioxydant dans les aliments.M/S,4(20):458-463

Références Bibliographiques

- **Marouf, A., Raynaud, J. (2007).** La botanique. Du Nod. Paris, p.7.
- **Milind,P and chaturvedi,V.(2012).**orange of Benefits .International Research journal of pharmacy ,3(7):2230-8407.
- **Mirardovic, S., Ivekovic, D., et Bozidar, S.G. (2006).** Anovelamperometric method for antioxydant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68: 175-180.
- **Mizushima, Y., et Kodayashi, M. (1968).** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20: 169-173.
- **Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J.P. et Canaud, B. (2002).** Stress oxydant, hémo-incompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, 5 : 201-208.
- **Moreno, D.A. et Garcia-viguera, C. (2010).** Natural Bioactive Compounds of Citrus limon for Food and Health. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51: 327-345.
- **Moussard, C. (2006).** Radicaux libres oxygénés et antioxydant. In : *Biochimie structurale et métabolique*. P. 355-341.
- **Ma, Y.Q., Chen, J.C., Liu, D.H. et Ye, X.Q. (2009).** Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16: 57-62.

O

- **Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S. et Chowwanapoonpohn, S. (2007).** Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103: 839-846.
- **Ortuno, A.A., Baidez, P., Gomez, M.C. (2006).** Arcas I, Porras AG, Del Rio JA. Citrus paradise and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem*, 98(2): 351-358.

P

- **Pierre, M., Jean, K., Ducelier, D., François, D., Paul, H., Chantal, M., Jeun, M., (2001).** Composition Chimique et Activité antifongique in vitro des huiles essentielles de Citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*, 57(2) : 95-104.

R

- **Ramful, D., Bahrin, T., Bourdon, E., Tarnus, E., Aruoma, O.I. (2010).** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of mauritain citrus fruits potentiel prophylactic ingredient of functional foods application toxicology, 278:75-87.
- **Re , R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Thpannala, M., et Rice-evans, C. (1999).** Antioxydant activity applying an improved abts radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology et Medicine*, 26:1231-1237.
- **Ribereau-Gayan, P. (1968).** Propriétés chimiques des phénols. In : *Les composés phénoliques des végétaux*. Edition Dunod Paris. pp : 29-57.
- **Roy, S., Bagchi, D. et Raychaudhuri, S. P. (2013).** Chronic inflammation: Molecular Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions: *CRC PRESS*.
- **Royer, M., Houde, R., et Stevanovic, T. (2010).** Technologies de conversion. In potentiel de développement lié aux extractibles : état des connaissances et revue des marchés. P: 118.

S

- **Seeman, P., et Weintin, J. (1966).** Erythrocyte membrane stabilisation by tranquilisers and anti histamines. *Biochemical Pharmacology*, 15: 1737-1752.
- **Seung-Cheol, L., Seok-Moo, J., So-Young, K., Dong-Ryul, K., Seong-Chun, J., Nam, K.C., et Ahn, D.U. (2004).** Effect of Heat Treatment on the Antioxydant Activity of Extracts from Citrus Peels. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 52: 3389-339.
- **Singleton, V., et Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticulture*, 16: 144-158.

T

Références Bibliographiques

- **Takuo, O., Takashi, Y., Ling, C., Tetsuro, S. (1988).** Tannin and related polyphenols of Euphorbiaceous plants. Euphorbins A and B, novel dimeric dehydroellagitannins from *Euphorbia hirta* L. *Chem. Pharm. Bull.* 36 (8), 2940-2949.
- **Tripoli, E., Guardia, M., Giammanco, S., Di-Majo, D., et Giammanco, M. (2007).** Citrus flavonoids: moléculaire structure, biological activity and nutritional properties. *Food chemistry*, 104: 466-479.
- **Tsao, R. (2010).** Chemistry and biochemistry of Dietary Polyphenols, *Journal list "Nutrient"*, 2(12): 1231-1246.

V

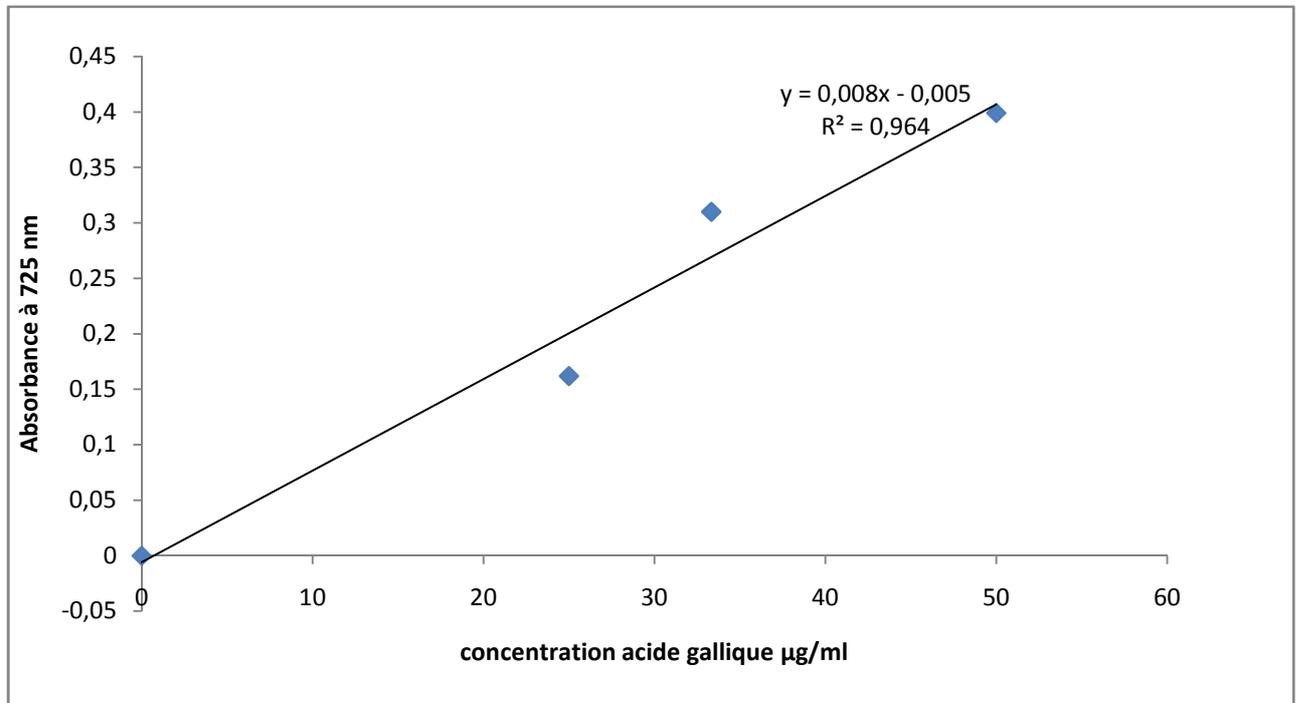
- **Valnamala, K.P., SunYou, K., Reddivari, L., Patil, B.S. (2006).** Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grape fruit juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2): 157-166.
- **Valnet, J. (2001).** *La santé par les fruit, légumes et les céréales*. Ed vigot France. P:411.
- **Virbel-Alonso, C. (2011).** Citron et autres argumes. *Un concentré d'astuces pour votre maison ,votre santé ,votre beauté .Edition eyrolles*.

W

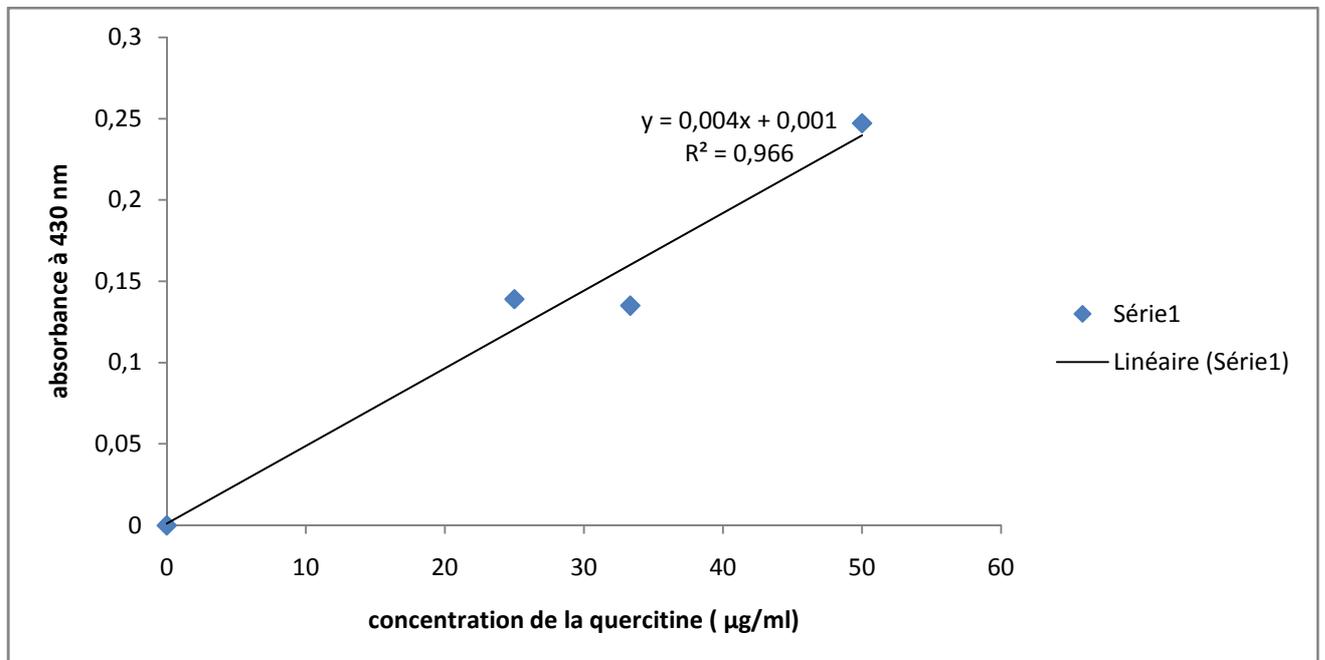
- **Wang, J., Mazza, G. (2002).** Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, 50: 850-857.

Références Bibliographiques

Annexes

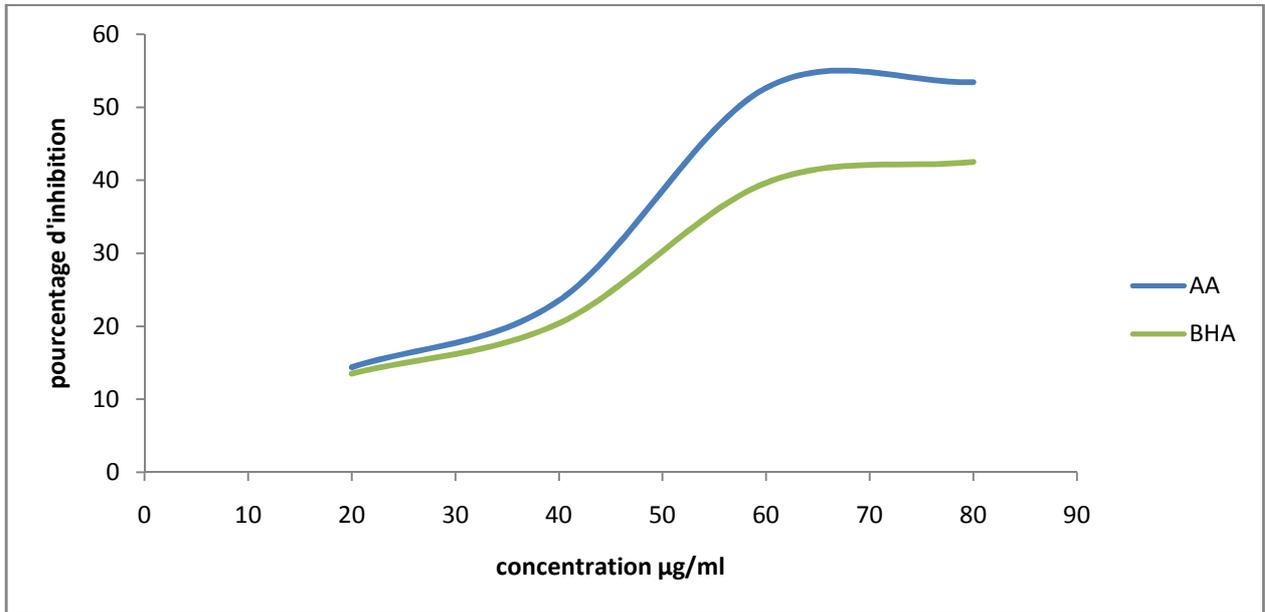


Annexe 1 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux

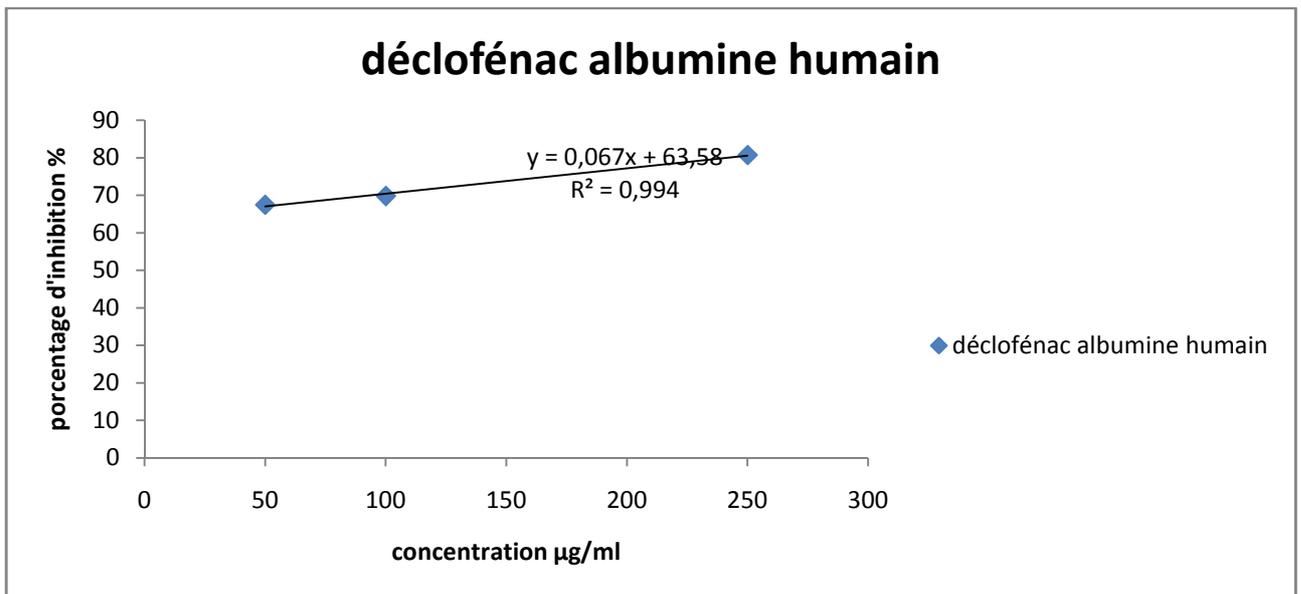


Annexe2 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

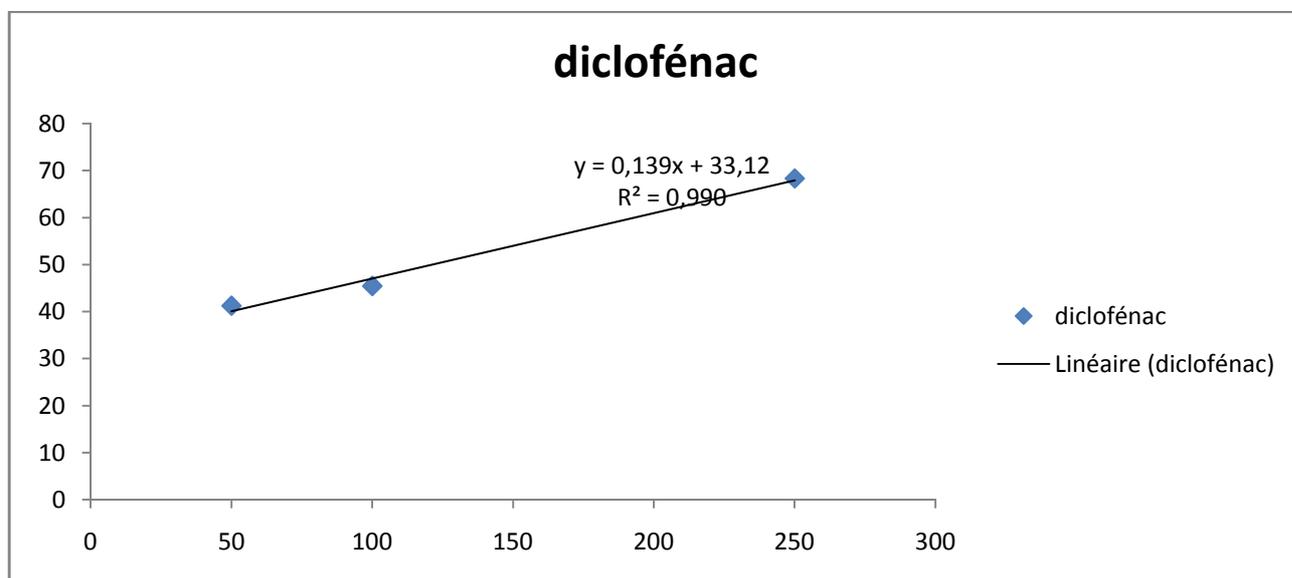
Annexes



Annexe 3 : Evaluation de pouvoir antiradicalaire en fonction des concentrations des standard



Annexe 4: Inhibition de la dénaturation d'albumine humaine par les différents extraits de Citrus.



Annexe 5 :Stabilisation membranaire par les différentes parties de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*.

Résumé :

Durant ces dernières décennies, un intérêt majeur est accordé aux plantes médicinales en vu de leurs propriétés thérapeutiques démontrées. Dans ce travail, des extraits éthanoliques de l'écorce et de la pulpe de citrus (*Citrus limon*, *Citrus sinensis*) ont été analysés pour leurs multiples propriétés pharmacologiques et leur richesse en substances bioactives. L'étude quantitative réalisée par le dosage spectral des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) des extraits d'écorce et de pulpe des deux espèces de citrus indique que les extraits d'écorce sont les plus riches en polyphénols accompagnés par des teneurs très élevés en flavonoïdes pour les deux espèces de citrus. Les résultats de l'activité antioxydant (effet scavenger DPPH et ABTS) indiquent que le pouvoir antioxydant le plus élevé est manifesté par les extraits d'écorce. Enfin, l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire indique que les extraits du citron que se soit l'écorce ou la pulpe ont données le meilleur effet stabilisateur de membrane des hématies contre l'hémolyse hypotonique et une meilleure protection de l'Albumine humaine contre la dénaturation thermique.

Mots clés : Polyphénols, Antioxydant, Anti-inflammatoire, *Citrus limon*, *Citrus sinensis*.

Abstract :

During the last decades, major interest is granted to medicinal plants in view of their proven therapeutic properties. In this work, the ethanol extracts of peel and pulp of Citrus (*Citrus limon*, *Citrus sinensis*) were analyzed for their multiple pharmacological properties and their rich bioactive substances. The quantitative study by the spectral determination of phenolic compounds (total polyphenols and flavonoids) of peel and pulp extracts citrus of both species indicates that peel extract is rich in polyphenols accompanied by very high levels flavonoids for two species of Citrus. Results of the antioxidant activity (scavenger effect DPPH and ABTS) indicate that the highest antioxidant power is shown by peel extract. Finally, the evaluation of the anti-inflammatory activity indicates that extract of lemon whatsoever peel or pulp have given the best membrane stabilizing effect against the erythrocyte hemolysis hypotonic and best protection of albumin human against thermal denaturation.

Key words: Polyphenols, antioxidant, anti-inflammatory, *Citrus limon*, *Citrus sinensis*.

ملخص:

خلال العقود الماضية، منحت أهمية كبرى للنباتات الطبية في ضوء خصائص علاجية ثبت لها. في هذا العمل تم تحليل مستخلصات ايثانولية من لحاء ولب الحمضيات (حمضيات ليمون، حمضيات صينية) نظرا لثرائها بالمواد النشطة بيولوجيا وتميزها بخصائص دوائية متعددة. تبين الدراسة الكمية للتقرير الطيفي لمركبات الفينول (مجموع البولي فينول و الفلافونويد) لمقتطفات اللحاء ولب الحمضيات من كلا النوعين أن مقتطفات اللحاء هي الأغنى في مادة البولي فينول يرافقه مستويات عالية جدا من مركبات الفلافونويد بالنسبة لكلي النوعي. نتائج النشاط المضاد للأكسدة (تأثير زيال) تشير إلى أن اللحاء يمثل اعلي مضاد للأكسدة، وأخيرا تقييم النشاط المضاد يبين أن مقتطفات الليمون على الإطلاق اللحاء أو اللب أعطت أفضل تأثير استقرار غشاء خلايا الدم الحمراء ضد انحلال الدم ناقص التوتر و أفضل حماية لزال الانسان ضد تمسخ الحراري

الكلمات الرئيسية: البولي فينول ، مضاد الأكسدة ،مضاد الالتهابات ،حمضيات ليمون، حمضيات الصينية