République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département des Sciences Alimentaires

Filière : Sciences Biologique

Option: Bioprocédé et Technologie Alimentaire.

Spécialité: Sciences Alimentaires



DÁŧ	•
NEI	

Mémoire de Fin de Cycle En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Activités antioxydantes des écorces, feuilles, pépins et de jus de citron.

Présenté par :

HADDAD Hassiba & BOUZID Leila BTA

Soutenu le : 16 Juin 2016

Devant le jury composé de :

M.Tamendjari A. Professeur President
M. Boudries H. MCB Encadreur
Mme Fella S. MAA Examinatrice

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu le tout-puissant qui nous a procuré de la volonté, de la santé et du courage pour mener à terme ce travail ;

Nous tenons tout particulièrement à adresser nos plus vifs remerciements à notre promoteur

M^r Boudries H. d'avoir accepté de nous encadré ;

Nous adressons nos profonds remerciement au M^r Tamendjari A.

d'avoir accepté de présider le jury;

Nous remercions également M^{me} Fella S. pour l'honneur qu'elle nous a fait d'avoir acceptée d'examiner et d'évaluer notre travail ;

Et enfin, nous remercions M^{elle} Touati N. et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, qu'ils trouveront ici l'expression de nos sincères reconnaissances.

Leila et Hassiba

Dédicace:

Je dédie ce travail,

A mes chers parents,

A mon cher père:

Je retrouve dans ce simple travail la force que tu m'as transmise et récoltes aujourd'hui le fruit du gain que tu as semé hier.

A ma très chère mère:

A toi qui m'avais suivi et aidé tout au long de mes études avec ton amour et ta généreuse tendresse qui m'illuminent la vie.

Toi qui seras et resteras pour moi symbole de courage, de sincérité et d'amour. Retrouves en ce modeste travail un des fruits de ton dévouement avec l'espoir de te satisfaire encore plus.que Dieu te protège et te garde pour nous.

A mes très chers frères Boubekeur et Mr Bouzid F.

A Samira et ma chérie Lilia et toute ma famille surtout Amel.

A mes meilleures amies Siham et Lila.

Leila



Dédicace

Je dédie ce travail

Mes défunts chers parents qui ont toujours été présents dans mes pensées et qui ont contribué de l'au-delà à ma réussite,

A mes très chers frères et sœurs : Soufian, Samir, Chahinaz et Sarah.

Mes tantes Hassina, Horiya, Khokha et Fatiha a tout leurs famille

A tous mes cousins et cousines

Mes amis Koka, Sonia, Seghira, Monira, Adada, Hoda, Samo, Sousou, Fadila, Kahina, wassila, siham, Aziz et Nadir m'ont accueilli à bras ouverts, avec qui j'ai passé une année agréable.

Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail

Surtout mon binôme Leila et toute sa famille

Hassiba

Sommaire

Liste des abréviations Listes des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliograp	hique
I. Agrumes	2
I.1. Citronnier	2
I.1.1. Feuilles	2
I.1.2. Fleurs	2
I.1.3. Fruits	2
I.2. Classification de citron	2
I.3. Variété de citron	3
I.4. Structure	3
I.4.1. Ecorce ou le péricarpe	3
I.4. 2. Pulpe ou l'endocarpe	4
I.5. Composition chimique et valeur nutritionnelle	4
I.6.Production	5
I.7. Utilisation et effets thérapeutiques	5
Chapitre II : Synthèse bibliograp	hique
I. Oxydants	6
I.1 Radicaux libres	6
I.1.1. Définition	6
I.1.2. Formation des radicaux libres	6
I.2. Stress oxydatif	6
I.2.1. Conséquence de stress oxydant	7

II. Antioxydants	7
II.1. Acide ascorbique	7
II.2. Caroténoïdes	8
II.3. Composés phénoliques	9
II.4. Flavonoïdes	10
Chapitre III : Matériel et méth	odes
I. Matériel végétal	13
I.1. Collecte du matériel végétal	
I.2. Séchage	
I.3. Broyage et tamisage	14
II. Propriétés physico-chimiques	
II.1. pH de jus	15
II.2. Teneur en glucides des jus	15
II.3. Densité des jus	
III. Dosage des antioxydants	
III.1. Acide ascorbique	
III.2. Caroténoïdes	
IV. Extraction des composés phénoliques	16
IV.1. Macération	16
IV.2. Préparation des extraits	16
V. Dosage des composés phénoliques	17
V.1. Polyphénols totaux	17
V.2. Flavonoïdes	
VI. Evaluation de l'activité antioxydante	
VI.1. Pouvoir réducteur	
VI.2. Test au phosphomolybdate d'ammonium	19
VI.3. Neutralisation du radical DPPH	20

VII. Analyse statistique	20
Chapitre IV : Résultats et discussion	
I. Propriétés physicochimiques	22
I.1. pH de jus	22
I.2. Teneur en glucides de jus	22
I.3. Densité du jus	22
II. Dosage des antioxydants	23
II.1. Acide ascorbique	23
II.2. Caroténoïdes	24
III. Extraction des composés phénoliques	26
IV. Dosage des composés phénoliques	26
IV.1. Polyphénols totaux	27
IV.2 Dosage des flavonoïdes	28
V. Activité antioxydante	30
V.1. pouvoir réducteur	30
V.2. Test de phosphomolybdate d'ammonium	31
V.3. Activité antiradicalaire DPPH	33
Conclusion.	35
Référence bibliographique. Annexes	

Liste des abréviations

Abs: Absorbance.

ANOVA: Analyse de la variance (Analysis Of Variance).

C: Concentration.

DPPH: Le radical libre 1-diphényl-2-picryl hydrazyl.

EAA: équivalent d'acide ascorbique.

EAG: Equivalent d'acide gallique.

EC: Equivalent en Catéchine.

EQ: Equivalent en Quercétine.

Ha: Hectare.

LSD: Least Significant Difference.

MF: Matière Fraiche

MS: Matière Sèche.

pH: Potentiel d'Hydrogène.

PPT: polyphénols totaux.

Rpm: Rotation par minute.

ERS: Espéce réactive d'oxygéne.

Tr /min: Tour /minute.

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	variétés de citron	3
II	Classe des polyphénols	9
III	Taux d'extractions des polyphénols des parties de citronnier	26
	étudiées.	

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Coupe équatoriale d'un citron.	4
2	Photographie de la coupe transversalle du fruit de citron.	13
3	Photographie des feuilles de citron.	13
4	photographie de l'écorce de citron découpé.	14
5	Photographie du séchage dans l'étuve.	14
6	Protocole de préparation de la matière végétale	14
7	Photographie de l'extraction sous agitation.	17
8	Photographie de la filtration des extraits.	17
09	Les teneurs en acide ascorbique des feuilles, des écorces, des pépins et de jus de Citron.	23
10	Les teneurs en caroténoïdes des feuilles, des écorces, des pépins et de jus de citron	25
11	Les teneurs en polyphénols totaux des feuilles, des écorces, des pépins et de jus de citron.	27
12	Les teneurs en flavonoïdes des feuilles, des écorces et des pépins et de jus de citron	29
13	Les teneurs en pouvoir réducteur des feuilles et écorces et des pépins et de jus de citron	31
14	Le test de phosphomolybdate d'ammonium des feuilles	32

	et écorces et des pépins et du jus de citron	
15	L'activité antiradicalaire (DPPH) des feuilles, des	33
	écorces et des pépins et de jus de citron	

Introduction

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre entre l'exposition à des pro-oxydants et la capacité de détoxification des systèmes de défense antioxydante. En conséquence, des dégâts souvent irréversibles interviennent dans la cellule : modifications oxydantes au niveau des lipides (AGPI), de l'ADN et des protéines à des degrés variables, le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies cardiovasculaires, des cancers, du diabète ou encore des maladies neurodégénératives (Afonso et *al.*, 2007; Pincemail et *al.*, 2007)

Pour échapper à ces conséquences, il est nécessaire de maintenir l'équilibre entre oxydants et antioxydants, afin de préserver les performances physiologiques optimales de l'organisme ; une consommation suffisante d'antioxydants s'impose (Ghedira, 2005). Plusieurs études épidémiologiques ont démontré une relation inverse entre la consommation de fruits et légumes et l'incidence des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires (Liu *et al.*, 2000 ; Bazzano *et al.*, 2002).

Les agrumes représentent l'une des récoltes de fruits les plus importantes au monde ; ces fruits sont consommés généralement crus ou sous forme de jus en raison de leur valeur nutritive et de leur flaveur particulière (Joshipura *et al.*, 2001) ; parmi ces agrumes on trouve citrus limon qui est une plante très cultivée en Algérie et vu son utilisation comme plante médicinale, elle présente un grand intérêt pharmacologique et industriel, les effets bénéfiques de citron sont principalement attribués à la présence des composés bioactifs, tels que les caroténoïdes (Craig, 1997), l'acide ascorbique (Hampl *et al.*, 1999) et les composés phénoliques (Ross *et al.*, 2000) ; ces composés empêchent les effets néfastes des radicaux libres sur la cellule en les neutralisant (Rekha et al., 2012).

Le but de notre étude est d'évaluer les propriétés antioxydantes (activité antiradicalaire, pouvoir réducteur et le test phosphomolybdate d'ammonium) des feuilles et des fruits de citron (écorces, pépins, jus), variété Eureka de la région de Bejaïa, et de comparer leurs teneurs en substances bioactives telles que l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les composés phénoliques totaux et enfin les flavonoïdes

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Agrumes

Le terme agrumes provient du latin *acumen*, qui signifie dans l'antiquité des arbres à fruits acides, les agrumes englobent plusieurs variétés, parmi lesquelles on trouve le citron, l'orange, le pamplemousse, la lime, etc. (Ladaniya, 2008; Khan et *al.*, 2010); ils représentent l'une des récoltes des fruits les plus importantes au monde (Liying, 2008), ils sont cultivés dans plus de 100 pays situés dans les régions tropicales et subtropicales et dans les climats méditerranéens (Peña et *al*, 2007; Khan et Kender, 2007).

I.1. Citronnier

Le citronnier, un membre de la famille des Rutacées, est un petit arbre (arbuste) vert et aromatique dont la taille peut varier de 2 à 10 m de haut, porte 5-6 branches charpentières très fournies en rameaux, les racines superficielles forment un réseau dans les 80 premiers centimètres de sol (Gollouin et Tonelli, 2013).

I.1.1. Feuilles

Les feuilles des citronniers sont des feuilles vertes, alternatives et persistantes, très adorantes en raison des multiples poches à essence qu'elles contiennent, qui sont visibles à l'œil nu (Gollouin et Tonelli, 2013).

I.1.2. Fleurs

Les Fleurs ont des pétales blancs, à teinte violacée, axillaires réunies en petits groupes (Bachés, 2011).

I.1.3. Fruits

Selon les espèces, la fleur se transforme en fruit mur, de forme ovale (8-12 cm) de long sur (5-6 cm) de diamètre. La peau (l'écorce) est d'épaisseur variable, peut être jaune ou verte. La pulpe acide et juteuse avec quelques pépins. Le citron reste longtemps sur l'arbre sans que le goût s'altère (Bachés, 2011).

I.2. Classification de citron

La classification scientifique du citron, selon (Springer-Verlag, 2014), est comme suit :

Règne : Végétal **Famille :** Rutacées

Division: Embryophyta Genre : Citrus

Classe: Dicotyledoneae Espèce: Citrus limon

Ordre : Géraniales Variété : Eureka

I.3. Variété de citron

Parmi les innombrables variétés de citron que vous pouvez trouver sur les marchés voici les plus courantes :

Tableau I: Les variétés de citron (Gollouin et Tonelli, 2013).

Variété	Saison	Caractère de fruit.	
Primofiori	Octobre à décembre	Forme Ovale, peau fine, pulpe très juteuse.	
Internado	Septembre à octobre.	Fruit de grand de taille, peau très fine, pulpe juteuse et acide, pas des pépins.	
Verna	Toute l'année	Fruit de couleur jaune intense, peau rugueuse et épaisse, pas des pépins, peu acide.	
Eureka	4 saisons	Forme avoide, un zeste difficile à prélevé, juteuse très acide.	

I.4. Structure

Le fruit de citron est composé d'endocarpe et de péricarpe, ce dernier comprend l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée contenant les poches schizolysigènes réparties de façon très irrégulière (Figure 1) (Ladaniya, 2008 ; Bachés, 2011).

I.4.1. Ecorce ou le péricarpe

- ➤ Le flavédo ou épicarpe : est la partie externe colorée, elle contient les glandes à huiles essentielles.
- Albédo ou mésocarpe : est la partie intérieure blanche (Ladaniya, 2008).

I.4. 2. Pulpe ou l'endocarpe

C'est la partie comestible de fruit, elle est constituée d'environ 8 à 16 segments dans lesquels les graines et les vésicules du jus se développent (Ladaniya, 2008). Chaque segment est

entouré par une membrane endocarpique continue et ils sont séparés par des cloisons minces pectocellulosiques, entourant l'axe central (Kimball, 1999; Ladaniya, 2008).

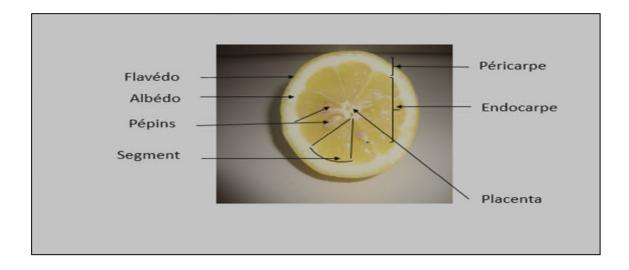


Figure 1 : Coupe équatoriale d'un citron (Ladaniya, 2008 ; Bachés, 2011).

I.5. Composition chimique et valeur nutritionnelle

Les feuilles et les fruits de citron sont des sources de composés naturels, tels que les protéines, les acides organiques, les vitamines, les polyphénols, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les minéraux, les fibres et les huiles essentielles (Boluda-Aguila et López-Gómez., 2012) (Tableau IV en Annexe I montre la composition chimique et la valeur nutritionnelle de citron).

I.6. Production

• Production mondiale

Selon l'organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture des Nations Unies (FAO), en 2015 le Mexique, l'Union Européenne et l'Argentine étaient les plus grands producteurs au monde des citrons et des limes (Figure (16) en Annexe I, montre les statistiques des huit premiers pays producteurs de citron et lime au monde selon FAO, (2015)

• Production Algérienne

L'Algérie disposait d'une superficie de 4 365 Ha pour la culture de citron, la production obtenue durant la saison 2011-2012 est de 760 823 tonnes (Ministre de l'agriculture et de développement rural, 2012).

Production de la wilaya de Bejaia

La production totale de citron au niveau de la wilaya de Bejaia est de 6 730 tonnes pour la saison 2014/2015 (Direction des services agricoles, 2015).

Les plus importantes régions productrices de citron de wilaya sont Oued Ghir, El kseur Amizour, Tazmalt, etc. (Tableau V en Annexe I, montre la production de citron de wilaya de Bejaïa.

I.7. Utilisation et effets thérapeutiques

- Le citron a été utilisé contre l'insomnie, l'asthme et le scorbut, mais également comme sédatif et un dissoudre des cristaux rénaux (Okwu and Emenik, 2006). Sont utilisation est également notée pour prévenir contre plusieurs maladies dégénératives comme les maladies cardio-vasculaires et quelques cancers, car il a été démontré que le citron et ses sous-produits sont une bonne source des composés phénoliques (Okwu et Emenik, 2006).
- Le citron présente plusieurs activités biologiques telles que, l'activité antidiabétique, anticarcinogène, antiproliférative, antioxydante, antibiotique, antifongique, anti-inflammatoire et antiasthmatique, il est utilisé également comme inhibiteur de lipoxygénase, d'amylase, d'urease, et pour le traitement rhumatismal et de la thrombose (Manish et *al.*, 2013).
- Les feuilles de citron sont utilisées conjointement avec d'autre plantes comme le thé, la menthe et le basilic, afin de préparer des infusions pour traiter les troubles d'estomac et les maladies de la peau (Whistler, 1997).
- L'écorce de citron est employée depuis l'antiquité par les industries de la parfumerie (Janati et *al.*, 2012).
- Les sous-produits de citron tels que les écorces et les graines sont employées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies dégénératives, telles que le diabète et l'hypertension (Oboh, 2012).

I. Oxydants

I.1 Radicaux libres

I.1.1. Définition

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réapparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde O2•¯, radical hydroxyl OH•, monoxyde d'azote NO•, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet ¹O2, peroxyde d'hydrogène H₂O², peroxynitrite ONOO¯ (Favier, 2003).

I.1.2. Formation des radicaux libres

Selon leur origine, on distingue deux catégories :

• Endogène

Les radicaux libres se produisent spontanément et d'une manière continue au sain de l'organisme (Hannebelle, 2006 ; Kœchlin-Ramonatxo, 2006).

• Exogène

Il existe des facteurs environnementaux pouvant favoriser l'excès des radicaux libres tels que la pollution, le tabac, les produits chimiques, le manque de sommeil, l'exercice physique et l'exposition au soleil ou bien à la radiation (Lee et *al.*, 2004).

I.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les systèmes producteurs des espèces oxydantes (anion superoxyde O_2° , radical peroxyde ROO°, radical hydroxyle OH°, etc.) et les systèmes de défense et antioxydants en faveur des premiers. En raison de leurs propriétés antioxydantes, ces espèces peuvent endommager plusieurs molécules biologiques, y compris les acides gras, les protéines, l'acide désoxyribonucléique (ADN) et les hydrates de carbone (Pincemail et *al.*, 2002).

I.2.1. Conséquence de stress oxydant

La notion des radicaux libres est basée sur les caractéristiques chimiques des radicaux libres qui sont omniprésents dans les systèmes du corps. La production excessive de ces derniers provoque une action directe sur les molécules biologiques (l'oxydation des lipides et des protéines, la modification de base et la modulation d'expression de gène d'ADN) (Lee et al., 2004; Hannebelle, 2006).

Ce phénomène provoque l'apparition de plusieurs maladies telles que les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer et Parkinson), cancers, asthme et crises cardiaques (Lee et *al.*, 2004 ; Menvielle-bourg, 2005).

II. Antioxydants

II.1. Acide ascorbique

L'acide ascorbique est un nutriment très abondant dans les légumes et les fruits tels que les agrumes (citrus limon), est le principal antioxydant hydrosoluble, il existe sous deux formes, la forme réduite (acide ascorbique) et la forme oxydée (l'acide dehydroascorbique) (Lee et *al.*, 2004).

L'acide ascorbique joue un rôle important dans la régénération de tocophérol, il ne peut pas être synthétisé par l'organisme, il doit être apporté par l'alimentation (klimczak et *al.*, 2007).

✓ Propriétés antioxydantes de l'acide ascorbique

L'activité antioxydante de l'acide ascorbique vient de la fonction 2,3 éne-diol. Cette vitamine est hautement susceptible à l'oxydation en présence des ions métalliques tels que Cu²⁺ et Fe³⁺, la température, l'exposition à la lumière, le pH, la concentration d'oxygène et l'activité de l'eau (Lee et *al.*, 2004).

a- Neutralisation des radicaux libres

L'acide ascorbique est une molécule antioxydante réductrice, elle est capable de piéger l'oxygène singulet ($^{1}O_{2}$) et les radicaux libres dont le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle (ROO°) (Klimczak et *al.*, 2007) (Figure 17 en Annexe1)

b- Régénération des tocophérols

Le mécanisme de régénération de la vitamine E par la vitamine C est connue depuis 1940 (Lee et *al.*, 2004) par interaction avec un radical R⁰ le tocophérol se transforme en un radical tocophéryl, ce dernier est régénéré en tocophérol sous l'action de l'acide ascorbique qui, à son tour, prend une forme radicalaire (radical ascorbyl). Le glutathion réduit (GSH) permet de régénérer l'acide ascorbique en se transformant en un radical (GS°) qui par réaction avec lui-même donne le glutathion oxydé (GSSG) (Figure 18 en Annexe I) (Pincmail et *al.*, 1998)

II.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels, largement répandues dans la nature (Linden et Lorient, 1994). Ils sont des constituants membranaires des chloroplastes en formant un groupe liposoluble, ce sont des précurseurs de la vitamine A et contribuent à la coloration jaune, orange ou rouge des fruits et légumes (Richer, 1993 ; Ladaniya, 2008).

Les caroténoïdes sont devisés en deux classes : les carotènes contenant seulement les atomes de carbone et d'hydrogène (α et β-carotène) et les xanthophylles (lutéine, zéaxanthine) qui portent au moins un atome d'oxygène (Figure 19 en Annexe I) (Kiokias, 2004)

✓ Propriétés antioxydantes des caroténoïdes

L'activité antioxydante des caroténoïdes survient suite à l'aptitude des doubles liaisons conjuguées à récupérer tous les électrons impaires (Valko et *al.*, 2004).

a. Neutralisation des radicaux libres

Les caroténoïdes (Car-H) neutralisent les radicaux libres (R°) par transfert d'hydrogène via la réaction suivante (Dutta et al., 2005):

$$R^{\circ} + Car-H \longrightarrow RH + Car^{\circ}$$

La propriété antiradicalaire des caroténoïdes la mieux décrite est leur capacité à inhiber le radical peroxyle (ROO°) selon la réaction:

$$Car-H + ROO^{\circ} \longrightarrow Car^{\circ} + ROOH$$

b. Piégeage de l'oxygène singulet

Les caroténoïdes sont des piégeurs très efficaces contre l'oxygène singulet en le transformant en oxygène moléculaire triplet par la réaction suivante (Beutner *et al.*, 2001)

$$^{1}O2 + Car \longrightarrow ^{3}O2 + 3Car$$

L'oxygène singulet est piégé par transfert de son énergie d'excitation vers le caroténoïde qui va revenir à son état initial par la dissipation de cette énergie sous forme de chaleur (Dutta *et al.*, 2005).

II.3. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires, ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Près de 8000 composés naturels appartiennent à cette famille; ils ont en commun un noyau benzénique portant au moins un groupement hydroxyl libre ou engagé avec un glucide. Selon le nombre d'unités phénoliques présents, on les classe en composés phénoliques simples et polyphénols. Par abus, on les appelle indifféremment composés phénoliques ou polyphénols et comprennent essentiellement les phénols simples, les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et condensés, les coumarines, les lignanes les lignines et les xanthones (Donatien, 2009).

Tableau II: Les classes des polyphénols (Sarni-Manchado et cheynier, 2006).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemple)
C6	Phénols simple	Catéchol	•
C6-C3	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïques	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamique	Acide caféique, acide	Pomme de terre,
		férulique	pomme
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	Citrus
C6-C2-C6	Silènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes	•	
	 Flavonols 	Kamphérol, quercétine	Fruits, légumes,
			fleurs
	 Anthocyanes 	Cyanidine, pélargonidine	Fleurs, fruits rouges
	 Flavanols 	Catéchine, épicatéchine	Pomme, raisin
	 Flavanones 	Naringénine	Citrus
	 Isoflavonols 	Daidzéine	Soja
(C6-C3)2	Lignanes	Pinorésino1	Pin
(C6-C3)n	Lignines	Ť	Bois, noyau de fruit
(C15)n	Tanins	•	Raisin rouge, kaki

> Acides phénoliques

Les principaux acides phénoliques :

- Les dérivés de l'acide benzoïque ou les acides hydroxybenzoiques tels que l'acide gallique, benzoïque, p-hydroxybenzoïques, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicylique, gentisique.
- Les dérivés de l'acide cinnamique ou les hydroxycinnamiques qui Comprennent le acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique qui sont des anthocyanines (Sarni-Manchado et cheynier, 2006)

✓ Propriétés antioxydants des acides phénoliques

Les acides phénoliques agissent comme donneurs de protons ou d'électrons et chélatent les métaux de transition (Blokhina *et al.*, 2003). La position et le degré d'hydroxylation, et la méthylation du cycle aromatique sont des facteurs importants qui déterminent l'activité antioxydante des acides cinnamiques et de leurs dérivés (Robards *et al.*, 1999) (Figure 20 en Annexe I).

II.4. Flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavédo, désignant la couche externe des écorces d'agrume (Donatien, 2009).

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal comme les légumes et les fruits tels que les agrumes (citrus limon) et ils sont consommés quotidiennement (Ghedira, 2005). Ils agissent principalement comme antioxydants primaires et ils dérivent du flavane, qui contient 15 atomes de carbone, rangés dans la configuration C₆-C₃-C₆; deux noyaux aromatiques A et B, liés entre eux par un hétérocycle oxygéné C (Gattuso et *al.*, 2007; Chira et *al.*, 2008) (Figure 21Annexe I).

Selon leurs structures moléculaires, les flavonoïdes sont divisées en cinq classes : Flavones, Flavanones, anthocyanines, Flavonols et Flavanols (ou catéchine) (La Guardia, Santo Giammanco et al, 2007) (Figure 22 en Annexe I).

> Flavonols

Ce sont les composés les plus efficaces de tous les flavonoïdes, grâce à leur groupe cétone et leur (OH) en position 3 du cycle C. Leur activité dépend des caractéristiques structurales, du milieu réactionnel ou du test de mesure utilisé (Sarni-Manchado et cheynier, 2006).

La quercétine, le kæmpférol, la myricétine sont les flavonols communs des agrumes (Manthey et *al.*, 2001).

> Flavanones

Les flavanones de citron sont présentes sous deux formes (Figure 23 en Annexe I):

- Forme d'aglycone : Narigénine et le hesperetin, l'ériocitrine, etc.
- Forme de glycoside : il existe deux types :
- Neohesperidosides : La naringine, néohespéridine et neoeriocitrin, qui se composent d'une flavanone avec le neohesperidose (glucose rhamnosyl-a-1,2) et ils ont un goût amer,
- Rutinosides : L'hespéridine, narirutin et didymin, qui ont une flavanone et un rutinose (glucose ramnosyl-a-1,6) et ils sont sans goût.

Les Flavanones sont habituellement présentes sous la forme de diglycoside, conférant le goût typique aux agrumes (Guardia et Santo Giammanco et *al.*, 2007).

> Flavones

Dans certaines espèces d'agrumes, les flavonoïdes se retrouvent sous forme de flavones glycosilés (rutine, isorhoifoline, diosmine, etc.) et polyméthoxylés (sinensétine, nobilétine, tangerétine, etc.) (Jayaprakasha et Patil, 2007).

La diosmine est un constituant commun de plusieurs espèces d'agrumes (Kanaze et al., 2003).

> Anthocyanines

Le terme anthocyane dérive des mots grecs Athos (fleur) et cyan (bleu). Ces composés sont responsables de la coloration rouge, bleue ou violette de nombreux fruits, légumes et fleurs (Sarni-Manchado., 2006).

> Flavanols

Les flavanols existent sous forme de monomères également appelés catéchines ainsi que sous forme de polymères, les proanthocyanidines. Ils présentent un hétérocycle C saturé auquel s'ajoute une fonction hydroxyle en C3.

La catéchine et l'épicatéchine sont les flavanols principaux présents dans de nombreux fruits (Andersen et Markham, 2006).

✓ Propriétés antioxydantes des flavonoïdes

• Capture directe de radicaux libres

La propriété antioxydante des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger les radicaux libres: radicaux hydroxyles (OH $^{\circ}$), anions superoxyde (O $_2^{\circ -}$) et radicaux peroxylipidiques selon la réaction suivante :

Flavonoïde (OH) +
$$R^{\circ}$$
 Flavonoïde (O $^{\circ}$) + RH

Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005).

• Inhibition de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, responsables de la diminution de la fluidité et de la perméabilité membranaire ainsi que de l'altération du fonctionnement des protéines membranaires (Hennebelle *et al.*, 2004).

Les flavonoïdes peuvent intervenir à différents niveaux de ce processus de peroxydation. Ils sont capables de capturer directement les composés radicalaires et ainsi d'interrompre la propagation de la réaction en chaîne radicalaire (Benavente-Garcia *et al.*, 1997 ; Robards et Antolovich, 1997 ; Havsteen, 2002).

• Chélation des cations métalliques

Les flavonoïdes inhibent la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition tels que le cuivre (Cu⁺, Cu⁺²), le fer (Fe⁺², Fe⁺³) et l'aluminium (Al⁺², Al⁺³) qui, à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production des radicaux libres (Puppo, 1992).

Partie II Partie Pratique

I. Matériel végétal

I.1. Collecte du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans la présente étude est le citronnier (les feuilles et le fruit de citron), il a été récolté au mois de février (2016) au niveau de la région d'Oued-Ghir, wilaya de Bejaia. La récolte s'est faite manuellement, au hasard, sur le même arbre, les fruits ont été sélectionnés où ils doivent être mûrs de colleur jaune, comestibles et ne présentent aucun signe de blessure ou d'infection (Figure 3 et 4).



Figure 2 : photographie de la coupe transversalle du fruit de citron.



Figure 3 : photographie des feuilles de de citron.

I.2. Séchage

Le séchage est un processus dont la chaleur joue un rôle principal pour enlever l'eau des aliments (Rahman., 2007). Le séchage en étuve est un simple moyen de déshydratation, plus rapide que le séchage au soleil, mais l'inconvénient, c'est qu'il ne peut être utilisé que pour de petites quantités.

• Mode opératoire

Environ de 10 kg des fruits et 1kg des feuilles de citron sont lavés et nettoyés pour les débarrasser de la poussière et de toutes les impuretés, ensuite, les fruits sont épluchés pour récupérer les écorces, les pulpes et les pépins, les écorces sont découpées et séchées avec les feuilles et les pépins dans l'étuve à 40 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. D'un autre coté, le jus de citron est obtenu à partir de la pulpe à l'aide d'un robot ménagé suivi d'une filtration.



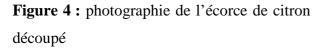




Figure 5: photographie du séchage dans l'étuve

I.3. Broyage et tamisage

Après le séchage, les feuilles, les écorces et les pépins de citrus limon sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique afin d'avoir une poudre fine, suivi par le tamisage de cette poudre avec un tamiseur dont le diamètre est inférieur à 250µm, les poudres obtenues sont conservées dans des boucaux en verre, fermés hermétiquement, étiquetés et stockés à l'abri de la lumière, pour une prochain utilisation.les différentes étapes récapitulées dans la figure suivante :

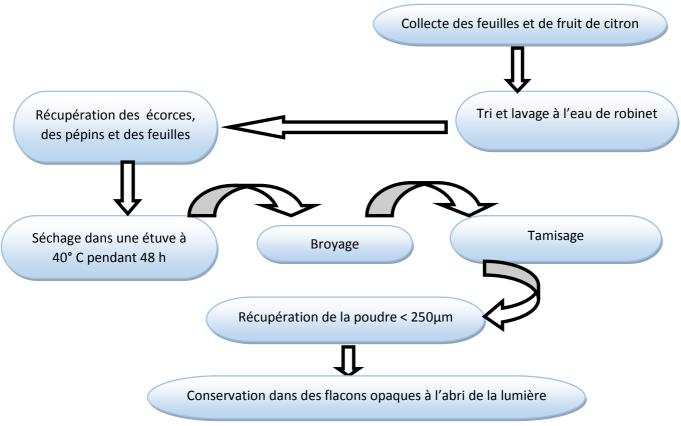


Figure 6 : Protocole de préparation de la matière végétale.

II. Propriétés physico-chimiques

II.1. pH de jus

Le pH de jus est mesuré à l'aide d'un pH mètre (HANNA instruments).

II.2. Teneur en glucides des jus

Le pourcentage de Brix est défini comme étant le taux de glucides exprimé en (g/100ml) de jus ; il est déterminé par lecture directe sur un réfractomètre (ZUZI).

II.3. Densité des jus

La densité des jus est mesurée en utilisant un pycnomètre.

III. Dosage des antioxydants

III.1. Acide ascorbique

Principe

Le dosage est basé sur l'oxydation de l'acide ascorbique qui conduit à la réduction de 2,6- dichlorophénolindophenol (DCPIP) de couleur initiale bleu (forme oxydée) vers la couleur rose (forme réduite).

• 1Mode opératoire

La teneur en acide ascorbique est déterminée selon la méthode de (Mau et al., 2005).

L'acide ascorbique est extrait à partir de 1g de la poudre (1ml de jus) avec 30 ml d'acide oxalique (1%). Ensuite, l'extrait est centrifugé pendant 5 min à 6500 tr/min.

 $300\,\mu\mathrm{l}$ de surnageant ou l'extrait de jus sont mélangés avec 2,7 ml de 2,6-dichlorophénolindophenol.

L'absorbance est mesurée à 515 nm; les concentrations en l'acide ascorbique sont déterminées en se référant à la courbe standard de l'acide ascorbique et les résultats sont exprimés en (mg équivalent d'acide ascorbique/100g de MS) ou par mg EAA / 100ml de jus, (Figure 29 en Annexe III).

III.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes contiennent dans leur structure plusieurs doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de l'absorption de la lumière par excitation des électrons des liaisons π (Rodriguez-a maya, 2001)

• Mode opératoire

L'extraction des caroténoïdes a été réalisée selon la méthode de (Soto-Zamora *et al.*, 2005) avec quelques modifications.

1g de la poudre (ou 1ml de jus) sont écrasés avec un pilon dans 20 ml de solvant d'extraction (hexane/acétone/éthanol, 5, 5/2, 5/2), ce dernier est récupéré dans une ampoule à décanter, on ajoute quelque gouttes d'eau (une solution de KOH (1%) pour les feuilles), après agitation, on laisse se reposer et lors de la séparation des deux phases, la phase hexanique supérieure est récupérée et protégée de la lumière par du papier aluminium.

- L'opération est répétée jusqu'à l'épuisement total de la couleur jaune des échantillons.

La teneur en caroténoïdes est déterminée par la mesure de l'absorbance de la phase hexanique à 450 nm et les résultats sont exprimés en mg équivalent de β-carotène/100 g MS en se référant à une courbe d'étalonnage (Figure 26 en Annexe II).

IV. Extraction des composés phénoliques

La rupture des tissus végétaux et la diffusion a pour but de libérer les polyphénols de la matrice végétale (principe d'extraction).

IV.2. Préparation des extraits

3g de la poudre sont extraits au moyen de 50 ml de méthanol sous agitation magnétique pendant 12 heures à température ambiante (25°C) et à l'abri de la lumière puis filtrés avec du papier filtre (Figure 7 et 8) (Guimaràes et *al.*, 2010).

Les filtrats sont mis dans des béchers, ensuite, séchés à l'aide d'une étuve à 40°C jusqu'à l'obtention d'un poids stable. Les extraits sont pesés après l'évaporation pour estimer le rendement d'extraction comme suit :

Taux de la matiére extaite (%) =
$$((p_1 - p_0) / E) \times 100$$

Où:

P₁: poids de bécher vide(g).

P₀: poids de bécher après l'évaporation (g).

E: poids d'échantillon (g).

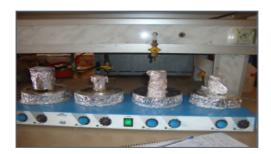


Figure 7: Photographie de l'extraction sous agitation.



Figure 8: Photographie de la filtration des extraits.

V. Dosage des composés phénoliques

V.1. Polyphénols totaux

• Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (singleton et Rossi, 1965). La teneur en composés phénoliques est déterminée selon la méthode décrite par (Singleton et Rossi, 1965) avec quelques modifications.

• Mode opératoire

Pour réaliser ce dosage $100~\mu l$ de jus ou des extraits sont mélangés avec $500~\mu l$ du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 1/10) et incubées à température ambiante dans l'obscurité après 2min, 1,5~m l de carbonate de sodium (20%) sont ajoutés. Le mélange final subit une agitation.

Un blanc, contenant tous les réactifs, excepté l'échantillon qui est remplacé par le méthanol, est préparé dans les mêmes conditions.

Après 2 heures d'incubation à l'obscurité, la lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm (Kafkas *et al.*, 2009). 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) ou par 100ml du jus, par référence à une courbe d'étalonnage (Figure 24 en Annexe II).

V.2. Flavonoïdes

• Principe

Le dosage des flavonoïdes est basé sur la formation de complexes suite à la chélation de métaux (Al³⁺), utilisés sous forme de chlorure d'aluminium (AlCl₃), par les groupements OH (Ribereau-Gayon., 1968).

Mode opératoire

2 ml de jus ou des extraits méthanoliques sont mélangés avec 2 ml de solution de chlorure d'aluminium (Al Cl₃, 6 H₂O) (2%). Puis homogénéiser et laisser au repos pendant 15 min à température ambiante à l'obscurité. Le blanc est préparé dans les mêmes conditions. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent de catéchine par 100g de MS, à l'aide une courbe d'étalonnage (Figure 25 en Annexe II).

VI. Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes d'analyses ont été développées mais celles adoptées dans ce travail sont :

VI.1. Pouvoir réducteur

• Principe

Le pouvoir réducteur se base sur la réaction d'oxydoréduction. C'est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) de complexe ferricyanure réduite qui donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Ribeiro et *al.*, 2008).

• Mode opératoire

Le pouvoir réducteur est estimé par la méthode de Yildirim et al. (2001).

1ml de jus ou d'extrait méthanoliques sont ajouté à 2,5 ml du tampon phosphate (pH6.6 à 0.2M) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1%). Après agitation, le mélange est soumis à l'incubation dans un bain marie à 50°C/20 min ; 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) sont additionnés au mélange avant d'être centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min.

Un volume de 2,5 ml de surnageant sont mélangés dans un tube à essai, avec 2,5 ml d'eau distillée, puis, 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1%) sont ajoutés au mélange. Le mélange homogénéisé préalablement, et incubé pendant 10 min à l'abri de la lumière. L'absorbance est lue à 700 nm.

Le pouvoir réducteur est déterminé en se référant à la courbe d'étalonnage et exprimé en quantité d'antioxydants équivalents en quercétine (Figure 27 en Annexe II).

VI.2. Test au phosphomolybdate d'ammonium

• Principe

Ce test est employé pour déterminer la capacité antioxydante totale, qui est basée sur la réduction de l'ion M⁰⁺⁶ en ion M⁰⁺⁵ par les antioxydants contenus dans l'extrait. Par conséquent, il y a formation d'un complexe phosphate-M⁰⁺⁵ de couleur verdâtre, en milieu acide, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en antioxydants (Prieto *et al.*, 1999; Sathish-Kumar *et al.*, 2007).

• Mode opératoire

Le protocole expérimental est celui décrit par Meot-Duros et al., (2008).

2 ml de réactif de molybdate (préparé à partir de molybdate d'ammonium à 4 mM, du phosphate de sodium à 26 mM et de l'acide sulfurique à 0,6 mM) sont ajoutés à 200 μ L de jus et des différents extraits. Après incubation à 90 °C pendant 90 minutes, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 695 nm.

Test au phosphomolybdate d'ammonium est déterminé en se référant à la courbe d'étalonnage et exprimé en quantité d'antioxydants équivalents en acide gallique (EAG/100 g MS ou / 100ml de jus) (Figure 28 en Annexe II).

VI.3. Neutralisation du radical DPPH

• Principe

Le radical libre 1,1-diphényl-2-picryl hydrazyl (DPPH*) est utilisé pour déterminer l'activité antiradicalaire des extraits.

L'activité antiradicalaire des extraits est déterminée par une méthode basée sur la réduction du radical diphényl picryl-hydrazyl (DPPH*), suite à un transfert d'hydrogène qui provient des

différents antioxydants qui se trouve dans le milieu réactionnel. La réaction de réduction du DPPH provoque la diminution de l'intensité de la couleur violette qui est mesurée par un spectrophotomètre à 515 nm, le mécanisme est récapitulé dans la réaction suivante (Guimarães et *al.*, 2009).

Dont : AH : donneur de l'hydrogène.

• Mode opératoire

2,9 ml de la solution DPPH (6 x 10⁻⁵) est mélangé avec 0,1 ml de jus ou de chaque extrait, la mesure de la réaction de réduction de la solution du DPPH a été faite à 515 nm après une incubation pendant 30 min. (Milardovic et *al.*, 2006).

Le pourcentage de neutralisation du radical de DPPH est calculé selon la formule suivante :

$$\%$$
 de réduction du DPPH = $(Abs_{contr} - Abs_{\acute{e}ch}/Abs_{contr}) imes 100$

Dont:

Abs_{contr}: Absorbance du contrôle à 515nm.

Abséch : Absorbance de l'échantillon à 515 nm.

VII. Analyse statistique

Une analyse descriptive des résultats de trois essais a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2007.

Une étude statistique a été faite par l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur pour les différents dosages pour les écorces, feuilles, pépins sauf le jus et les résultats des activités antioxydants avec le logiciel (STATISTICA 5.5), et cela pour la comparaison de ces résultats et la mise en évidence ses différences significatives entre les échantillons.

I. Propriétés physicochimiques

I.1. pH de jus

Le pH de jus de citron de la variété Eureka étudiée donne une valeur de 1.98 ± 0.01 .

Selon l'étude de Rekha et *al.*, (2012) le pH de jus de citron (dilué 1/10) est de 4,00. Alors que Roussos et *al.*, (2011) ont trouvé un pH, un peu, plus acide pour le citrus limon qui varie entre 2,89 à 3,5 pour la variété interdonato, les deux résultats susmentionnés sont plus élevés (moins acides) que le résultat obtenu dans la présente étude.

Par ailleurs, les dernières études réalisées par Boudries et *al.*, (2012) sur les jus de mandarine et clémentines, montrent des pH oscillant entre $3,68 \pm 0,02$ et $3,91\pm 0,02$, ce qui est supérieur à nos résultats.

Les agrumes sont classés comme des fruits acides, car leur matière soluble est essentiellement constituée de sucres et d'acides organiques (Karadeniz, 2004) dont les acides citriques, maliques, oxaliques, tartriques, galacturoniques, quiniques, ect.

La différence dans les résultats de pH avec les autres études est due a plusieurs facteurs tels que la variété, la position de fruit sur l'arbre et leur degré de maturité, variation saisonnières et annuelle du l'ensoleillement, et de l'humidité (Nagy, 1980).

.I.2. Teneur en glucides de jus

La teneur en glucides contenue dans le jus de citron analysé de la variété Eureka est de 8 % ou (g/100ml) de jus.

I.3. Densité du jus

Le jus de citron de la variété Eureka présente une densité de $1,02 \pm 0,01$

II. Dosage des antioxydants

II.1. Acide ascorbique

L'acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble, son rôle est essentiel dans les compartiments intra- et extracellulaire, est mal connu. Il fait intervenir dans son mécanisme d'action, des réactions d'oxydoréduction entre la forme réduite de l'acide ascorbique et sa forme oxydée (dehydroascorbate) (Pastre, 2005).

Les résultats de dosage de l'acide ascorbique obtenus pour le jus de citron frais et les parties de citronnier séchées (les feuilles, les écorces et les pépins), à l'aide d'une étuve à 40°C de la variété Eureka, exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique (mg EAA/100 g MS pour les parties séchées et en mg EAA/100ml pour le jus de citron frais), sont présentés dans la figure (09).

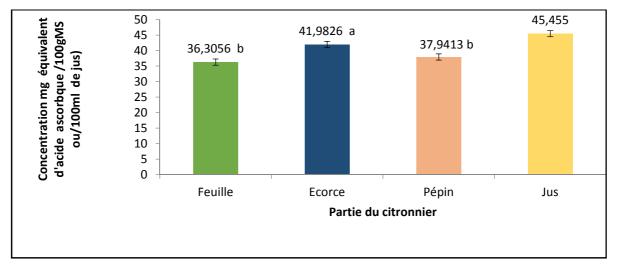


Figure 09 : Les teneurs en acide ascorbique des feuilles, des écorces, des pépins et de jus de Citron

. Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3). Les valeurs désignées par les lettres differentes présentent des différences significatives (p<0.05). Les résultats sont classés par l'ordre croissant; a>b. Les barres verticales représentent les écarts-types.

L'étude statistique (p<0,05) indique que la teneur en acide ascorbique est plus importante dans les écorces (41,982±0,54mg/100g MS), elle est suivie par les pépins et les feuilles qui présentent des valeurs de 37,941±2,1 mg/100g MS et de 36,306±0,41 mg/100g MS, respectivement.

Selon la méthode volumétrique de dosage, la teneur en acide ascorbique obtenue par Rekha et *al.*, (2012) dans le jus de citron varie entre 10,6 et 12,7 g/100ml selon le facteur de maturité mûr, non mûr, respectivement, qui est plus élevée que la teneur obtenue dans le jus de citron de la présente étude (45,455±0,3 mg/ 100ml) estimée par un dosage spéctrophotométrique. Alors que, d'après les résultats de l'étude faite sur les jus de la mandarine et clémentines, les teneurs en acide ascorbique varient de 47,97±0,44 à 66,35±0,88 mg/100ml (Boudries et *al.*, 2012).

La différence de la teneur en acide ascorbique de notre échantillon de jus avec celui analysé par Rekha *et al.*, (2012) est probablement due à la méthode du dosage. La variabilité des teneurs en acide ascorbique des agrumes est influencée par les variations saisonnières et annuelles de l'ensoleillement, l'humidité, la variété du fruit, position des fruits sur l'arbre et leur degré de maturité (Nagy, 1980). D'autres facteurs peuvent également être impliqués, notamment la sensibilité de l'acide ascorbique à l'air et au milieu aqueux (Lee et Kader, 2000 ; Silva, 2005).

II.2. Caroténoïdes

Les agrumes est une bonne source de caroténoïdes, ces pigments sont responsables de la couleur jaune, orange, et rouge des fruits et des légumes. Ils ont un impact significatif sur la qualité commerciale et alimentaire des produits. Par ailleurs, les caroténoïdes peuvent agir en tant qu'antioxydant selon plusieurs mécanismes (Pastre, 2005).

Au cours de leur extraction deux phases bien distinctes se forment : une phase apolaire lipophile à partir de laquelle ont été isolées les caroténoïdes et une phase polaire qui renferme des molécules hydrophiles telles que les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes.

Les teneurs en caroténoïdes des différents parties de citron sont présentées dans la figure (10), la teneur la plus élevées est notés pour les feuilles (18,9 \pm 4,75 mg équivalent de β -carotène /100g MS) suivie des écorces et des pépins avec des concentrations de 11,93 \pm 2,28 et de 9,41 \pm 1,99 mg équivalent β -carotène/100g MS respectivement. Alors que la teneur en caroténoïde de jus de citron analysé est 0,626 \pm 0,02 mg équivalent β -carotène /100ml.

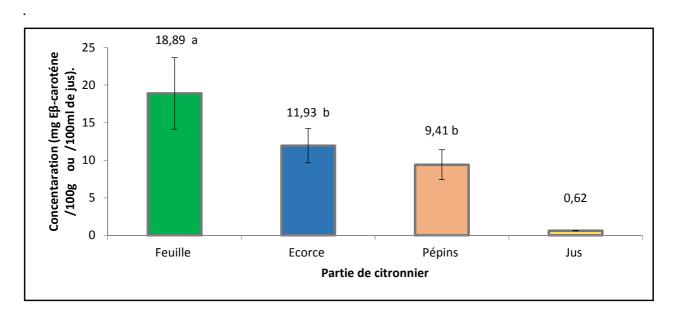


Figure 10: Les teneurs en caroténoïdes des feuilles, des écorces, des pépins et de jus de citron.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)Les valeurs désignées par les lettres différentes présentent des différences significatives (p < 0.05)Les résultats sont classés par l'ordre croissant ; a > bLes barres verticales représentent les écarts-types

L'étude statistique montre une différence significative (p<0,05) concernant la teneur en caroténoïdes entre les feuilles d'une part et les écorces avec pépins de l'autre part, tandis que il n'existe pas de différences significative entre les écorces et les pépins.

L'étude de Boudries et al., (2012), dans des écorces et des clémentines et de mandarines a montré des concentrations en caroténoïdes qui varient de 51,9±1,1 à 76±0,7 mg E β -carotène/100g MS. Ces valeurs sont largement supérieures à nos résultats, cette différence est due, entre autre, à l'espèce d'agrume étudiée et à d'autres facteurs incontrôlables tels que la maturation, l'ensoleillement, les précipitations, la température et l'origine géographique (Boudries et al., 2012).

D'un autre coté, les teneurs de jus de pamplemousse (rouge) et (blanc) de 0.340 ± 0.1 à 1.730 ± 0.5 µg équivalent β -carotène /ml de jus. ces valeurs sont largement inférieures à nos résultats 0.62mg équivalent β -carotène /100ml de jus (Tsai et *al.*, 2007).

III. Extraction des composés phénoliques

La méthode d'extraction par macération en utilisant le méthanol pur (99%) comme solvant d'extraction, a permis d'obtenir des taux d'extractions présentés dans le tableau suivant :

Tableau III: Taux d'extractions des polyphénols des parties de citronnier étudiées.

Partie de citronnier	Feuilles	Ecorces	Pépins
Taux (%)	34,66	21,66	7

Le taux d'extraction le plus élevée est noté pour les feuilles (34,66%) suivie par les écorces avec un taux de (21,66%), tandis que le taux le plus faible est observé pour les pépins (7%).

L'utilisation de méthanol comme solvant d'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange par Guimarães *et al.*, (2010) a donné un taux d'extraction de 37,27%, ce qui est légèrement supérieur à nos résultats.

L'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale est influencée par leur nature chimique, la variété, la méthode d'extraction et les dimensions des particules de l'échantillon. La solubilité des composés phénoliques est dépendante du type de solvant utilisé (polarité), du degré de polymérisation et de la formation des complexes insolubles (Naczk et Shahidi, 2004).

En revanche, l'étude de Li *et al.*, (2006) sur les différents paramètres affectant l'extraction des polyphénols à partir des écorces d'agrumes a montré que l'extraction à partir des écorces fraiches est meilleure que les écorces séchées; et cela est peut être due aux raisons suivantes: le processus de séchage (la température et/ou une longue durée de séchage) peut détruire certains phénols; l'eau présent dans les cellules d'écorces fraiches peut aider l'extraction des phénols; par contre, dans l'écorce sèche, tous les composants (membranes et organites) dans les cellules s'adhèrent ensemble en absence d'eau, et rend éventuellement l'extraction plus difficile.

IV. Dosage des composés phénoliques

Les polyphénols sont actuellement l'objet de nombreuses études à cause de leur action bénéfique sur la santé (Richard *et al.*, 2001).

IV.1. Polyphénols totaux

Les polyphénols sont des composés ubiquistes, ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes, en effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux obtenus pour les extraits méthanoliques de différentes parties citronnier et du jus frais, sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (mg EAG/100g MS), sont présentés dans la figure (11).

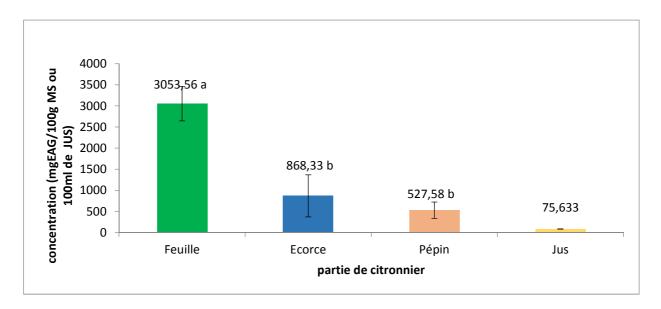


Figure 11 : Les teneurs en polyphénols totaux des feuilles, des écorces, des pépins et de jus de citron.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)

Les valeurs désignées par les lettres différentes présentent des différences significatives (p< 0.05).

Les résultats sont classés par l'ordre croissant ; a > b.

Les barres verticales représentent les écarts-types

L'étude statistique montre une différence significative (p<0,05) concernant la teneur en polyphénols entre les feuilles et les écorces alors qu'elle ne montre aucune différence significative entre les écorces et les pépins.

Le dosage des composés phénoliques des poudres issues du séchage conventionnel à l'étuve

Ventilée montre que la teneur en polyphénols totaux pour les feuilles est de (3053±409,22 mg EAG/100g MS), suivie par les écorces (868,33±497,85 mg EAG/100g MS) et les pépins (527,58±192,3 mg EAG/100 g MS). Par ailleurs une teneur de 75,633±0.35 mg EAG/100ml est déterminé dans le jus de citron.

D'après l'étude de Lagha-Benamrouche et Madani , (2013) la concentration des écorces de bigarade en polyphénols totaux est de 31.62±0,88 mg EQ/g MS, alors que celle des feuilles est de 44,41±0,49 mg EAG/g MS.

La teneur en polyphénols totaux des jus de pamplemousse (rouge) et (blanc) est de 8,26±1,2 et 5,62±0,5 mg EAG/ml respectivement (Tsai et *al.*, 2007), sont largement supérieures à nos résultats (0,756 mg EAG/ml MF ou bien 75,633 mg EAG/ 100 ml).

De plus, l'étude réalisée par Gorinstein *et al.*, (2001) et (2004) montre que l'écorce d'orange a une teneur de 179±10,5 mg équivalent en acide chlorogénique /100g MF en utilisant méthanol comme solvant d'extraction. Alors que les teneurs en polyphénols des écorces et des feuilles de quelque variété d'agrumes obtenues par Muthiah et *al.*, (2012) varient entre 739 à 3305 mg équivalent de pyrocatéchole /100 g MS.

La teneur en PPT des extraits des pépins de cédrat (citrus medica) sont varient entre 26,19 et $188,71 \,\mu g$ EAG/ml d'extrait, tandis que celle de la pamplemousse est de $72,02 \,\mu g$ EAG/ml d'extrait (Kim et Shin, 2013).

Les différences observées entre les résultats des différents travaux et ceux obtenus dans la présente étude peuvent être liées selon Balasundram *et al.*, (2005) et Li *et al.*, (2006) à la méthode d'extraction, le degré de maturation des fruits et les conditions de l'environnement, en plus de réactif adopté pour le dosage ou également au standard. Les composés phénoliques subissent une réaction redox complexe avec le réactif de Folin-Ciocalteu, Cependant, il devrait être noté également que quelques groupes chimiques comme les acides ascorbiques, acides organiques, sucres, les amines aromatiques peuvent réagir aussi avec ce réactif causant ainsi une surestimation des polyphénols (Ghafar *et al.*, 2010).

IV.2 Flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes obtenues à partir des extraits des feuilles, des écorces et des pépins et de jus frais sont présentées dans la figure (12).

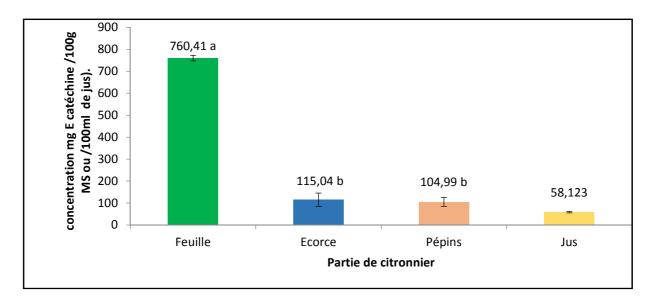


Figure 12: les teneurs en flavonoïdes des feuilles, des écorces et des pépins et de jus de Citron.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives (p < 0.05). Les résultats sont classés par l'ordre croissant ; a > bLes barres verticales représentent les écarts-types

L'analyse statistique montre une différence significative (p< 0,05) entre les feuilles et les écorces tandis que ce dernier ne presente aucune différence significative avec les pépins en pour les tenneurs en flavonoides. Nous constatons que les feuilles montrent la plus grande concentration en flavonoïdes (760,41±13,01 mg EC /100 g MS) suivies des écorces et des pépins avec des concentrations de 115,04±30,68 et de 104,9±19,75 mg EC /100g MS) respectivement. Alors que le jus présente une teneur de 58,123±2,72 mg EC/100 ml.

D'après l'étude de Lagha-Benamrouche et Madani , (2013) la concentration des écorces de bigarade en flavonoïdes est de 1,17±0,01 mg EQ/g MS, alors que celle des feuilles, elle est de 3,25±0,07 mg EQ/g MS, ce qui est légèrement différent aux concentrations en flavonoïdes des écorces et des feuilles de citron analysés au cours de cette étude.

La teneur en flavonoïdes de jus de pamplemousse (rouge) et (blanc) est de 1,240±0,2 et 1,29±0,2 µg EQ/ml MF, respectivement (Tsai et *al.*, 2007), qui légèrement déférents à la concentration en flavonoïdes de jus de citron de notre étude.

D'après Lu *et al.*, (2006) et Vanamala *et al.*, (2006), et Klimczak *et al.*, (2007) la variabilité des teneurs en flavonoïdes des oranges est influencée par plusieurs facteurs dont l'origine génétique, le degré de maturation, le mode de conservation et les différentes parties du fruit analysées.

V. Activité antioxydante

Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer toute l'activité antioxydante des fruits ou d'autres tissus de plante car il y a différents antioxydants et radicaux libres.

L'activité antioxydante des extraits méthanolique des feuilles et des écorces et des pépins et de jus de citron a été déterminée par les méthodes suivantes.

V.1. pouvoir réducteur

Cette méthode mesure l'aptitude des antioxydante de réduire le fer ferrique (Fe⁺³) en fer ferreux (Fe⁺²) à faible pH.

Cette réduction est suivie en mesurant la variation des absorbance à 700 nm , les substance ayant un potentiel de réduction , réagissant avec de ferricyanure de potassium K_3 (Fe [(CN)₆]₃) pour former le ferrocyanure de potassium K_4 (Fe [(CN)₆]₂), qui réagit ensuite avec de chlorure ferrique, pour former un complexe ferreux ferrique (Fe₄[Fe(CN-)₆]₃), qui présente un maximum d'absorption à 700 nm. Une élévation d'absorbance du mélange réactionnel indiquerait une augmentation de la réduction, en raison de l'augmentation de la formation de complexe (Chandell et *al.*, 2011).

L'étude statistique (P<0,05) indique l'existence d'une différence significative entre les parties de citronnier et permet de les classer selon l'ordre décroissant suivant Feuille > Pépin > Ecorce.

Les résultats du pouvoir réducteur sont présentés dans la Figure (13).

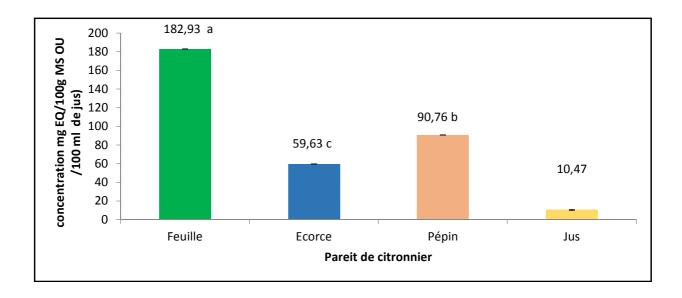


Figure 13: Les teneurs en pouvoir réducteur des feuilles et écorces et des pépins et de jus de citron.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)

Les valeurs désignées par les lettres différentes présentent des différences significatives (p< 0.05).

Les résultats sont classés par l'ordre croissant ; a > b > c.

Les barres verticales représentent les écarts-types

Le pouvoir réducteur varie d'une partie de citronnier à l'autre, d'après la présentation graphique, le pouvoir réducteur plus élevé est constaté pour les feuilles suivi des pépins et des écorces de (182,93±0,07 et 90,76±0,11 et 59,63±0,59 mg EQ/100 g MS), respectivement.

Cette différence peut être due à l'espèce analysé, la variété, le degré de la maturation le sol, le climat et les méthodes analytiques (Xu et *al.*, 2008).

V.2. Test de phosphomolybdate d'ammonium

Après avoir mélangé chaque extrait et le jus avec la solution de phosphomolybdate d'ammonium et après incubation du mélange pendant 90 min, une coloration verte est apparue dans déférents mélanges, cette coloration est due à la réduction de l'ion M^{o+6} en ion M^{o+5} et la formation d'un complexe phosphate- M^{o+5} , les absorbances sont lues à 695 nm.

Les résultats des extraits sont représentés dans la figure suivante.

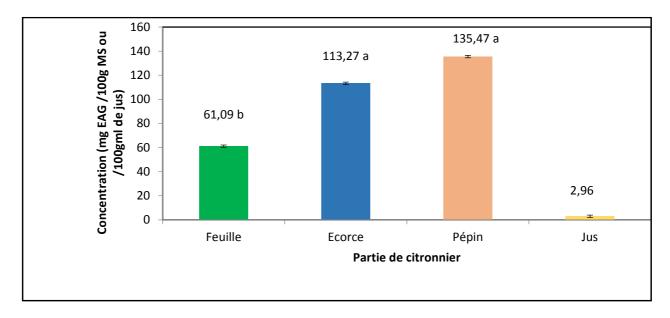


Figure 14 : Le test de phosphomolybdate d'ammonium des feuilles et écorces et des pépins et du jus de citron.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)

Les valeurs désignées par les lettres différentes présentent des différences significatives (p< 0.05).

Les résultats sont classés par l'ordre croissant ; a > b.

Les barres verticales représentent les écarts-types

L'analyse statistique (p<0,05) montre qu'il n'ya pas de déférence significative entre les pépins et les écorces tandis que il existe une déférence significative entre ces deux dernier et les feuilles.

Nous remarquons que cette activité est déférente d'un extrait à un autre, la grande activité est constaté dans le cas des pépins (135,47± 4,37 mg EAG/100g MS) suivie par les écorces (113,27±52,68mg EAG/100g MS) tandis que les valeurs les plus basses ont été enregistré dans des feuilles (61,09±10,11 mg EAG/100g MS), alors que celle de jus, elle est de 2,96±1,2 mg EAG/100ml.

Les résultats enregistrés pour ce test révèlent clairement que les extraits des écorces, feuilles et pépins possèdent une capacité antioxydante que permet de réduire de l'ion M^{o+6} en ion M^{o+5} et de formation d'un complexe phosphate- M^{o+5} .

VI. 3. Activité antiradicalaire DPPH

La mesure de l'activité par le radical libre (DPPH) est basée sur la réduction de la solution DPPH en présence de la substance antioxydante (RH), par la formation de la forme non radicalaire (DPPH-H) (Rohman et *al.*, 2010).

Le DPPH est un radical libre qui produit une solution violette en présence des composés antioxydants, ensuite il est réduit en produisant une solution décoloré.

La figure (15) montre les résultats des mesures de l'activité antiradicalaire des extraits méthanolique et de jus de citron.

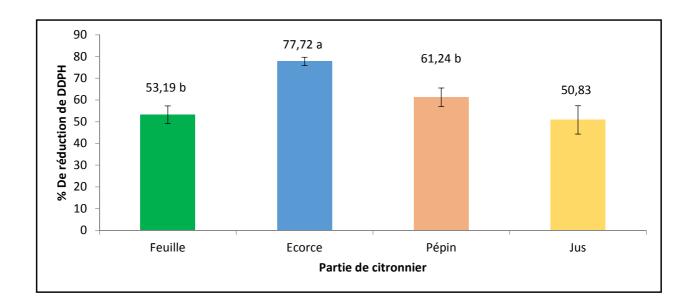


Figure 15 : L'activité antiradicalaire (DPPH) des feuilles, des écorces et des pépins et de jus de citron.

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)

Les valeurs désignées par les lettres différentes présentent des différences significatives (p< 0.05).

Les résultats sont classés par l'ordre croissant ; a > b.

Les barres verticales représentent les écarts-types

L'étude statistique (P< 0,05) révèle des différences significatives entre l'écorce et autres parties de citronnier alors que les pépins et les feuilles présentent un pouvoir antiradicalaire significativement similaire

Ces résultats montrent que les différentes parties du citronnier présentent une capacité de piéger le radical DPPH. Les résultats des pourcentages d'inhibition du radical (DPPH') des

échantillons séchés à l'étuve montrent que la valeur d'inhibition la plus importante notée pour les écorces (77,72%), suivie des pépins et des feuilles avec des valeurs de 61,24% et 53,19%, respectivement. Alors que le jus présente un pourcentage d'inhibition 50,83%.

L'activité antiradicalaire (DPPH) des extraits des pépins de cédrat varie entre 56,61-63,56%, tandis que celle de pamplemousse est de 93,04 % (Kim et Shin, 2013).

L'activité antioxydante peut être affectée par de nombreux facteurs tels que, la polarité des solvant et la procédure d'extraction, la variation des espèces utilisées (Wang et *al.*, 1996; Ismail et *al.*, 2004).

Conclusion

Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressées à l'étude des activités antioxydantes (pouvoir réducteur, test de phosphomolybdate d'ammonium, activité antiradicalaire DPPH), et au dosage des antioxydants (acide ascorbique, caroténoïdes, composés phénoliques, flavonoïdes) contenus dans les feuilles, les écorces, les pépins et le jus de citron variété Eureka.

Les résultats du dosage des antioxydants indiquent que la teneur en acide ascorbique varie de 36,306±0,41 (Feuille) à 41.982±0,54 (Ecorce) mg EAA /100 g MS, alors que ces résultats révèlent que l'écorce de citron est le plus riche en acide ascorbique, tandis que la teneur de jus de citron est de 45,455±0,3 mg EAA/100 ml jus.

Concernant la teneur en caroténoïdes, les valeurs varient de $9,41\pm1,99$ (Pépin) à $18,09\pm4,75$ (Feuille) mg E β -carotène/100g MS, alors que ces résultats montrent que les feuilles sont les plus riche en caroténoïdes. La concentration en caroténoïdes du jus de citron est de $0,62\pm0,02$ mg E β -carotène/100ml de jus.

Les teneurs en composés phénoliques sont différentes d'une partie de citronnier à une autre ; les concentrations varient entre 527,58±192,3 (Pépin) et 3053±409,22 (Feuille) mg EAG/100g MS, alors que la teneur en composés phénoliques de jus est de 75,633±0,35 mg EAG/100ml de jus.

Les teneurs en flavonoïdes oscillent entre $104,99\pm19,75$ (Pépin) et $760,41\pm13,01$ mg (feuille) EQ/100g MS. La concentration en flavonoïdes de jus de citron est de $58,123\pm2,72$ mg EC/100ml de jus.

On a constaté que les concentrations en composés phénoliques et en flavonoïdes des feuilles sont significativement supérieures à celles des écorces et des pépins.

.

L'activité antioxydante est estimée en déterminant le pouvoir réducteur, le test de phosphomolybdate d'ammonium et l'activité antiradicalaire (DPPH). Cependant les écorces présente la meilleure activité antiradicalaire avec un pourcentage de réduction de 77,72 %, alors que le meilleur pouvoir réducteur est noté pour les feuilles (182,93±0,07 mg EQ/100g MS), tandis que les pépins possèdent la capacité antioxydante la plus élevée (135,47±1,2 mg EAG/100g MS) qui permet de réduire de l'ion M^{o+6} en ion M^{o+5}.

Au terme de cette étude, il serait nécessaire de signaler que les écorces, les feuilles, les pépins et le jus de citrus limon constituent une source de composés phénoliques avec des activités antioxydantes appréciables.

En perspective, et pour une meilleure évaluation des déférentes parties du citronnier, il est intéressant de pousser et d'approfondir ce travail par :

- L'étude d'autres variétés de citron et d'autres espèces de genre citrus ;
- L'élargissement l'échantillonnage à l'ensemble du territoire nationale afin d'analyser l'effet de l'origine géographique ;
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits ;
- La réalisation d'autres études pour évaluer le potentiel antioxydant in vivo et pour s'assurer de la non toxicité de ces écorces, feuilles et pépins, pour qu'ils soient utilisés dans le cadre d'un programme de lutte contre le stress oxydatif.

.

Références Bibliographiques

Références bibliographique

A

Ghafar MF, Prasad KN, Weng KK, Ismail A.2010 Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species, African Journal of Biotechnology,9

Andersen M., Markham K.R. 2005. Flavonoïds: chemistry, biochemistry and applications Taylor and Francis Group. PP. 125-256.

Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. 2007. Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutases μ rôle dans les maladies rhumatismales. Revue du Rhumatisme, 74 : 636–643.

 \mathcal{B}

Bachés B.M. 2011. Agrumes comment les choisir et les cultiver facilement. Editions Eugen Ulmer, 8 rue blanche, 75009 Paris. PP. 6-8-9-11-63.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2005. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, journal of Food Chemistry. PP. 1.

Bazzano L.A., He J., Ogden L.G., Loria C.M., Vupputuri S., Myers L. 2002. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: The first national health and nutrition examination survey epidemiologic follow-up study. American Journal of Clinical Nutrition, 76, 93-99.

Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin R.F., Ortuno A., Del Rio A.J. 1997. Uses and Properties of *Citrus* Flavonoïds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 4505-1515.

Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Blanco I.H., Hoffmann T., Martin H.D., Mayer B., Noack P., Ruck C., Schmidt M., Schülke I., Sell S., Ernst H., Haremza S., Seybold G., Sies H., Stahl W., Walsh R. 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: Carotenoids, flavonoïds, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81 (6): 543-603.

Blokhina O., Virolainen E., Fagersted K.V. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a review. Annals of Botany, 91: 179-194.

Boluda-Aguilar M., Lòpez-Gòmez A. 2012. Production of bioethanol by fermentation of lemon (Citrus limon L.) peel wastes pretreated with steam explosion. journal of Industrial crops and products 41: 188-197.

Boudries H., Madani M., Touati N., Souagui S., Medouni S., chibane M. 2012. Pulp antioxidant activites, mineral contents and juice nutritional properties of Algerian Clementine Cultivars and Mandarin Six cultivars of Clementine fruits including. Journal of biotechnology, 11 (18): 4258-4267.

 \mathbf{C}

Chandel M., Kaur S., Kumar S. 2011. Studies on the genoprotective/antioxidant potential of methanol extract of nthocephalus Cadamba. Miq journal of Medicinal Plants Research, 5: 4764-4770.

Chira K., Such J.H., Sancier C., Teissedre L. 2008. Les polyphénols du raisin. Journal of Phytothérapie, 6: 78-82.

Guo C., Yang J., Li J., Xu., Jiang Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay: 1719-1726.

Craig W.J. 1997. Phytochemicals: Guardians of our health. Journal of the American Dietetic Association, 97: S199-S204.

 \mathcal{D}

Dacosta Y. 2003. Les phytonutriments bioactifs .Ed. Yves Dacosta, Paris. PP. 317. Direction des services agricoles. (2015).

Del Caro A., Piga A., Vacca V., Agabbio M. 2004. Changes of flavonoïds, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. PP. 99-105.

Donatien K. (2009). Enquéte Ethonobotanique de six plantes Médicinales Maliennes-Extraction, identification d'alcaloïdes-Garactérisation, quantification de polyphénols: Etude leur activité antioxydante. Thèse en cotutelle avec l'Université Paul Verlaine de Metz-UPV-M(France), 188P.

Dutta D., Chaudhuri U.R., Chakraborty R. 2005. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. African Journal of Biotechnology, 4 (13): 1510-1520.

FAO. (2015). Food Agriculture Organisation. Database results; FAO ST:http://www.faostat Fao.org.

Favier A . 2003. Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* : 108-117.

G

Gattuso G., Barreca D., Gargiulli C., Leuzzi., Garsti C. 2007. Flavonoïdes composition of citrus juices. Molecule, review Dipartimento di Chimica Organica e Biologica, Università di Messina, Salita Sperone 31, I-98166 Messina, Italy ,12: 1641-1673.

Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologique, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Journal of Phytothérapie, N° 4: 162-169.

Gollouin F., Tonelli N. 2013. Des fruit et des graines comestible du monde entier. Edition Brigitte Peyrot Poos, Paris Lavoisier SAS.PP. 186-195.

Gorinstein S., Martin-Belloso O., Park Y.S., Haruenkit R., Lojek A., Ciz M., Caspi A., Libman I., Trakhtenberg S. 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. Journal of Food Chemistry, 74: 309–315.

Gorinstein S., Cvikrova M., Machackovab I., Haruenkit R., Park Y.S., Jung S.T., Yamamoto K., Martinez Ayala A.L., Katrich E., Trakhtenberg S. 2004. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweetiesand white grapefruits. Journal of Food Chemistry, 84: 503–510.

Guardia., Giammanco S., Di Majo D., Giammancode Mourizio M. 2007. Flavonoïdes de citron: structure moléculaire activité biologique et propriétés alimentaire : 467-468.

Guimarães R., Barros L., 2010. Targeting excessive radical with peels and juice of citrus fruits grapefruit, lemon and orange. Journal of Food Chemistry, 48: 99-106.

 \mathcal{H}

Hampl J.S., Christopher A.T., Johnston C.S. 1999. Intakes of Vitamin C, Vegetables and Fruits: Which Schoolchildren Are at Risk. Journal of the American College of Nutrition, 18 (6): 582-590.

Hannebelle T. (2006). Chimie organique et macromoléculaire, investigation chimique, chimio taxonomique et pharmacologique de limailles productrices d'antioxydants. Thèse de Doctorat Sciences de la matière, du rayonnement et de l'environnement, 144P

Havsteen B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoïds. Pharmacology & Therapeutics, 96 : 67-202.

Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Journal of Phytothérapie, 1 : 3-6.

Ţ

Ismail A., Marjan Z.M., Foong C.W. 2004. Total antioxidant activity and phenolics content in in selected vegetables. journal of Food Chemistry, 87: 581-586.

J

Janati S.S.F., Beheshti H.R., Feizy J., Fahim N.K. 2012. Chemical composition of lemon (citrus lemon) and peel its considered as animal food. Journal of food Gida, 5: 267-271.

Jayaprakasha G.K., Patil B.S. 2007. *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. Journal of Food Chemistry, 101: 410-418.

Joshipura K.J., Hu F.B., Manson J.E., Stampfer M.J., Rimm E.B., Speizer F.E. 2001. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. Journal of Internal Medicine, 134: 1106-1114.

\mathcal{K}

Kafkas E., Ercisli S., Kemal K., Baydar K., Yilmaz H. 2009. Chemical composition of bloodorangevarietiesfromTurkey:Acomparativestudy. Journal of *Pharmacognocy Magazine*, 5(20): 329-339.

Kanaze F.I., Gabrieli C., Kokkalou E., Georgarakis M., Niopas I. 2003. Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 33: 243-249.

Karadeniz F. 2004. Main Organic Acid Distribution of Authentic Citrus Juices in Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 28: 267-271.

Khan I.A., Kender W.J. 2007. Citrus Breeding.In: «Citrus: Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology». Edition, UK, London. PP. 1-8.

Khan I., Alishan Z., Saeed M., Shan H.U. 2010. Physicochemical analysis of citrus sinensis, citrus Reticulate and citrus journal of physicochemical, 32, (6). 254-354.

Kimball A.D. 1999. Description of Citrus fruit. In « Citrus processing: A Complete Guide» Springer US edition (2) Aspen Publisher, Inc. pp. 450.

Kim S.Y., Shin K.S. 2013. Evaluation of physiological activities of the citron (citrus junos sieb ex TANAKA) seed Extracts.

Kiokias S., Gordod H.M. 2004. Antioxidant properties of caroténoids in vitro and in vivo. Food Reviews International, 20, (2): 99-121.

Klimczak I., Malecka M., Szlachta M., Gliszczynska-Swiglo A. 2007. Effect of storage on the covtent of polyphenols; vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis, 20: 313-322.

Koechlin-Ramonatxo C. 2006. Oxygéne, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. Nutrition Clinique et Métabolisme. Journal médical, 20: 165-177.

Kumar R.S., Sivakumar T., Sunderam R.S., Gupta M., Mazumdar U.K., Gomathi P., Ajeshwar Y., Saravanan S., Kumar M.S., Murugesh K., Kumar K.A. 2005. Antioxidant and antimicrobial activities of Bauhinia racemosaL. Stem bark. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38: 1015-1024.

 \mathcal{L}

Ladaniya S.M. 2008. Citrus fruit biology, technology, and evaluation. Ed: Elsevier: 13-26

Lagha-Benamrouche S., Madani K. 2012. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties(Citrus sinensis L. and Citrus aurantium L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves: journal of biotechnologies, 723-730.

Lee S.K., Kader A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest Biology and Technology, 20: 207-220.

Lee J., Koo N., Min D.B. 2004. Reactive oxygen species, aging; and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety: 21-32.

Li B.B., Smith B., Hossain M.d.M. 2006. Extraction of phenolics from citrus peels: Solvent extraction method. Separation and Purification Technology, 48: 182–188.

Linden G., Lorient D. 1994. Biochimie agro-industrielle: Valorisation alimentaire de la production agricole. Edition Masson(paris).

Liu S., Manson J.E., Lee I., Cole S.R., Hennekens C.H., Willett W.C., Buring J.E. 2000. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. American Journal of Clial Nutrition, 72: 922-8.

Liying N., Ji-hong W., Xiao-jun.,Fang C., Zheng-Fu W., Guang-hua Z., Xiaosong H. 2008. Physicochemical Characteristics of orange juice samples from seven cultivars. Journal of Agricultural Sciences in China,7: 41-47.

Lu Y., Zhang C., Bucheli P., Wei D. 2006. *Citrus* Flavonoïds in Fruit and Traditional Chinese Medicinal Food Ingredients in China. Journal of Plant Foods for Human Nutrition 61: 57-6

Male-Éev D.É., Kunti-V. 2007. Investigation of metal--flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal--flavonoid complexing reactions. dusan malesev and vesna kuntic institute of physical chemistry, 72: 921-939

Manish K., Mahesh A.R., M Somashekhar. 2013. Evaluation of Antitubercular Activity of Methanolic Extract of *Citrus* Sinensis: 18-22.

Manthey J.A., Guthrie N., Grohmann K. 2001. Biological Properties of Citrus Flavonoids Pertaining to Cancer and Inflammation. Current Medicinal Chemistry.8(2): 135-153.

Mau J.L., Tsai S.Y., Tseng Y.H., Huang S.J. 2005. Antioxidant properties of methanolic extracts from Ganoderma tsugae. Food Chemistry. 93: 641-649.

Menvielle-bourg F.J. 2005. La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. Phytothérapie: 118-121.

Meot Duros L., Gaetan G.L., Magné C. 2008. Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 258-262.

Milardovic S., Ivekovic D., Bozidar S.G. 2006. Anovelamperomet**ric** method for antioxydant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68: 175-180.

Ministére de l'agriculture et de développement rural algériEN. 2012.

Muthiah P.L., Umamaheswari M., Asokkumar K. (2012). In vitro antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of citrus. International Journal of Phytopharmacy 2: 13-20.

$\mathcal M$

Naczk M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A, 1054: 95-111.

Nathalie Boizot., Jean-Paul Charpentier. 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, BP 20619 Ardon : 79-80

Nagy S. 1980. Vitamine C contents of citrus fruit and their products: A review-journal of agricultéral and Food chemistry: 8-18.

Oboh G.A., Ademosun O. 2012. Characterization of the antioxidant properties of phenolicextracts from some citrus peels: 729–736.

Okwn D.E., Emenike, I.N. 2006. Evaluation of phytonutrients and vitamins contents of Citrus fruits. International journal of Molecular Medecine and Advance Science 1: 1-6.

Oyaizu M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.

\mathcal{P}

Pastre. (2005). Intérét de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Ecole nationale vétérinaire (Toulouse).

Peña L., Cervera M., Fagoaga C., Romero J., Juàrez J.A., Navarrol L. 2007. Citrus. Biotechnology in Agriculture and Forestry: 35.

Peter A., Roussos., Chrisa Paziodimou and Mina Kafkaletou. 2011. Assessment of Twenty Two citrus cultivas(Orange,Mandarins and lemons) for quality characteristices and phytochemical's concentration.

Pietta P.G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products. 63: 1035-1042.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. 1998. Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. Medi-Sphere, 73:1-4.

Pincemail J., Bongin K., Cayeux K., Defraigne J.O. 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Nutrition Clinique et Métabolisme, 16: 233-239.

Pincemail J., Degrune J., Voussure S., Malherbe C., Paquot N., Defraigne J.O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolique*,21: 66-75.

Prieto P., Pineda M., Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex, Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*.269: 337-341.

Puppo A. 1992. Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type Reactions; Influence of the Iron Chelator. Phytochemistry, 31 (1): 85-88.

\mathcal{R}

Rahman S.M. 2007. Handbook of food preservation. CRC press Taylor & Francis Group.

Rafaela Guimarães., Lillian Barros., João C.M., Barreira., Ma João Sousa., Ana Maria Carvalho., Isabel C.F.R. Ferreira. 2009. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange.

Rekha C., Poornima G., Mansa M., Abhipsa V., Pavithra Devi J., Vijay Kumar H.T., Prashith Kekuda T.R. 2012. Ascorbic Acid, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Fresh Juices of Four Ripe and Unripe Citrus Fruits: 303-310.

Ribeiro S.M.R., Barbosa L.C.A., Queiroz J.H., Knodler M., Schieber A. 2008. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (Mangiferaindica L.) varieties. *Food Chemistry*, 110: 620-626.

Ribereau-Gayon P. 1968. Notion générale sur les composés phénoliques. *In*: Les composés phénoliques des végétaux. *Ed. Dunod* : 1-40.

Richard T., Vergé S., Vercauteren J., Monti J.P. 2001. Étude de l'interaction tanin-protéine par RMN et modélisation moléculaire. Deuxième journée scientifique de l'UFR des sciences pharmaceutiques. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 140 : 127-166.

Richter G. 1993. Composés phénoligues.In : «Métabolisme des végétaux :physiologie et biochimie», Ed. presses polytechniques et Universitaires Romandes : 317-339.

Robards K., Antolovich M. 1997. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids. Analyst. 122:11R-34R.

Robards K., Prenzler D.P., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. 1999. Phenolics compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry, 66: 401-436.

Rodriguez-Amaya B.D. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. International Life Sciences Institute Press: 1-71.

Rohman A., Riyanto S., Yuniarti N., Saputra R., Wutami R., Mulatsi W. 2010. Antioxidant activity, total phenolics, and total flavaonoid of extrats and fractions of red fruit (Pandanus Conoideus Lam). International Food Research Journal 17: 97-106.

Rose R.C., Bode A.M. 1993. Biology of free radical scavengers: Evaluation of ascorbate. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 7: 1135-1142.

Ross S.A., Ziska D.S., Ke Zhao., ElSohly M.A. 2000. Variance of common flavonoids by brand of grapefruit juice. Fitoterapia, 71: 154-161.

Royer M., Houde R., Stevanovic T. 2010. Technologies de conversion. In potentiel de développement aux extractibles : Etat des connaissances et revue des marchés : 118.

S

Sarni-Manchado P., cheynier V. 2006. Les polyphénols en agroalimentaire 17, rue Auguste Frot 77590 Bois le roi impression : France quercy-46090 Mercués N°805(I).PP. 2-3.

Sathish-Kumar T., Shanmugam S., Palvannan T., Bharathi Kumar V.M. 2007. Evaluation of antioxidant properties of *Elaeocarpusganitrus*Rox Leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (3): 211-215.

Sharma R.R., Singh R., Saxena S.K. 2006. Characteristics of citrus fruits in relation to granulation. Scientia Horticulturae, 111: 91-96.

Shela Gorinsteina., Olga Martı'n-Belloso b., Yong-Seo Park C., Ratiporn Haruenkit D., Antonin Lojek.,cMilan., Abraham Caspi., Imanuel Libman., Simon Trakhtenberg. 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits: 309-315.

Shela Gorinsteina.,Milena Cvikrova., Ivana Machackovab., Ratiporn Haruenkitc., Yong-Seo Parkd., Soon-Teck Junge., Kazutaka Yamamotof., Alma Leticia Martinez Ayalag., Elena Katricha., Simon Trakhtenbergh. 2004. Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and white grapefruits: 503-510.

Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdie - phosphotinguestics acids reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.

Silva F.O. 2005. Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. Food Control, 16: 55-58.

Springer-verlag France. 2014. Citrus limon(L) Burm. F(Rutacées) citronniers. Enseignement de phytothérapie. Paris-9017 Bobigny cedex : 01

Soto -Zamora G., Yahia E.M., Brecht J.K., Gardia A. 2005. Effect of postharvest hot air treatment on the quality and antioxidant level in tomato fruit LWT, 38: 183-202.

 \mathcal{T}

Tsai H.L., San K.C., Chag S.J. 2007. Antioxidant content and free radical scaven ging Ability of freerh Red pummelo (citrus grandis (L) Osbeck) juice and freeze-dried products, 55 (8): 2867-2872.

Vanamala J., Reddivari L., Yoo K.S., Pike L.M., Patil B.S. 2006. Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. Journal of Food Composition and Analysis, 19: 157-166.

Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes J.C., Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and Cellular Biochemistry, 266: 37-56.

 \mathcal{W}

Whistler W.A. (1996). Samoan Herbal Medicine. Isle Botanical. Honolulu.

 χ

Xu G., Liu D., Chen J., Ye X., Ma Y., Shi J. 2008. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in china. Food Chemistry, 106: 545-551.

y

Yildirim A., Oktay M. et Bilaloglu V. 2001. The Antioxidant Activity of the Leaves of *Cydonia vulgaris*. Turkish Journal of Medical Sciences, 31: 23-27.

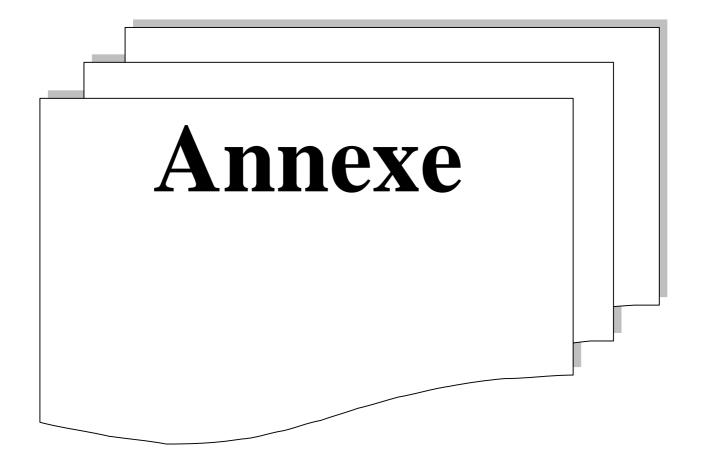


Tableau IV: Composition biochimique moyenne du citron (pour 100g de fruit frais) (Gollouin et Tonelli, 2013).

Composition	Citron
Eau(g)	90,20
Glucides (g)	3,16
Protéines(g)	0,70
Lipides (g)	0,60
Acides organiques (g)	4,88
Fibres alimentaires(g)	0,50
Les vitamines (mg)	51,26
Les minéraux (mg)	211,95
Apports énergétiques (k Calories)	36,48

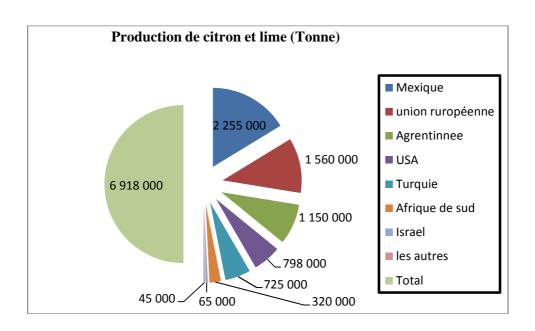


Figure 16: Les huit pays premier producteurs de citron et lime au monde (FAO 2015).

Tableau V: Production totale de citron au niveau de la wilaya de Bejaia et de Oued-Ghir Pour la saison 2014/2015. (Direction des services agricole, 2015).

Lieu	Complante	En Rapport	Production	Rendement
Oued Ghir	12	12	1440	120
Bejaia	53	49	6730	138

Figure 17: Action de l'acide ascorbique sur un radical libre et les voies de sa régénération (Rose et Bode., 1993).

Figure 18 : Régénération des tocophérols via l'action de l'acide ascorbique (Pincemail *et al*, 1998).

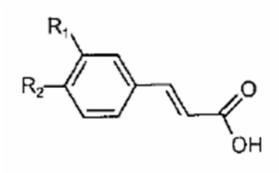
Annexe I

Figure 19: Structures chimiques des caroténoïdes (Rodreguès-Amaya, 2001).

Acide hydroxybenzoique

 $R_1 = R_2 = OH$; $R_3 = H$: Acide protocatéchique.

R₁=R₂=R₃=OH : Acide gallique.



Acide hydroxycinnamique

R₁=OH : Acide coumarique. R₁=R₂=OH : Acide caféique.

R₁=OCH₃; R₂=OH: Acide férulique

Figure 20: Structures chimiques des polyphénols (Sarni-Manchado et cheynier, 2006).

Annexe I

Figure 21 : Structure de base des flavonoïdes (Der bel et Ghedira, 2005).

Flavonols R₁ R₂ HO OH OH

 $R_1=R_2=R_3=H$ Myricétine

R₁=R₂=OH ;R₃=H quercétine

 $R_2=OH$, $R_1=R_3=H$ kaempférol

 R_1 = OH Génistéine. R_1 = H Daidzéine.

R₁= H; R₂=OH Narigénin

R₁= OH; R₂=OCH₃ Hesperitine

 $R_1=R_2=OH$ Eriodictyol

 $R_1=H$; $R_2=OH$ Apigénine $R_1=R_2=OH$ Lutéoline

 $R_1=R_2=H$ pelargonidine

 $R_1 = OH$; $R_2 = H$ Cyanidine

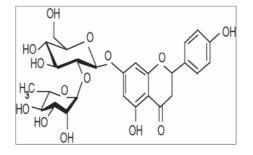
 $R_1=R_2=OH; R_3=H$ Catéchines

R₁=R₂=R₃=OH Gallocatéchine

Figure 22: Structure chimique des différentes classes des flavonoïdes (Ghedira., 2005)

Forme glycoside:

Néohespéridine Néoériocitrine



HO OH OH OH

Naringine

HO OH OH OCH₃

Poncirine Narirutine Hespéridine

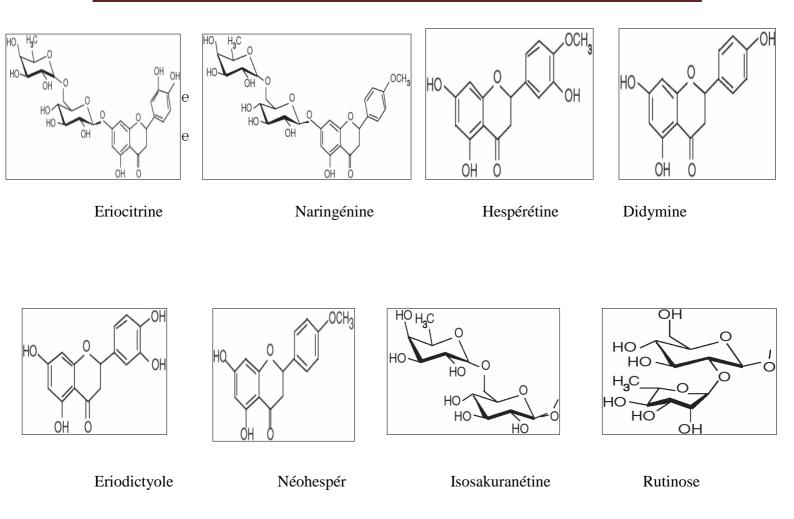


Figure 23: Structure chimique des Flavanones des agrumes (Sarni-Manchado et cheynier, 2006).

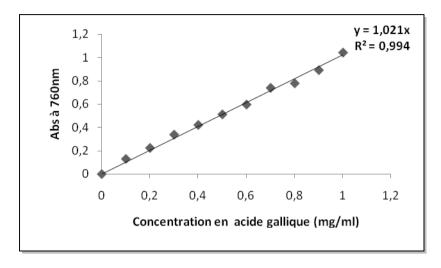


Figure 24 : Courbe étalon pour le dosage des polyphénols totaux

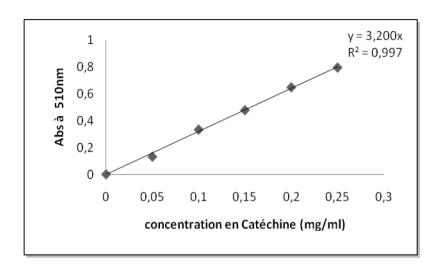


Figure 25: Courbe étalon pour le dosage des flavonoïdes

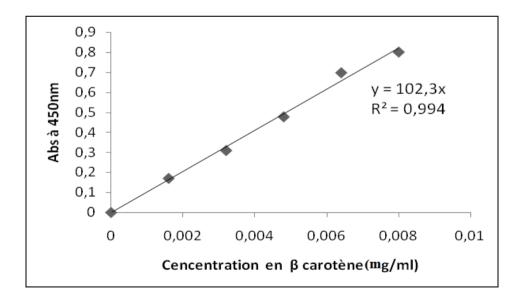


Figure 26: Courbe étalon pour le dosage des caroténoïdes

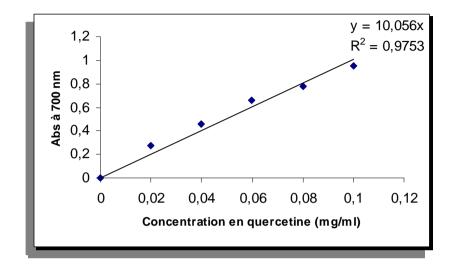


Figure 27: Pouvoir réducteur en fonction de la concentration de la quercétine.

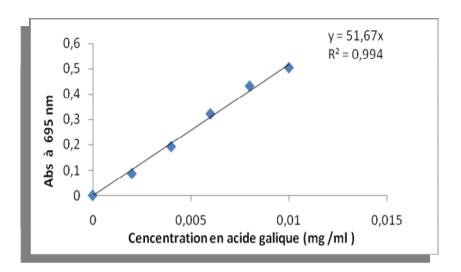


Figure 28: Test de phosphomolybdate en fonction de la concentration d'AG

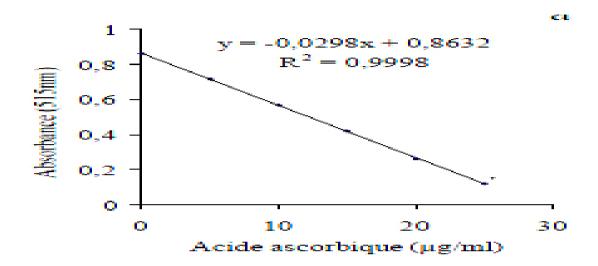


Figure 29: Courbe d'étalon de dosage de l'acide ascorbique.

Annexe III

Tableau IV: Préparation des réactifs.

Manipulations	Réactifs	Préparations
Dosage d'acide ascorbique	-L'acide oxalique (1%)	-1g d'acide oxalique + 100ml d'eau distillée.
Dosage des polyphénols	-Folin-Ciocalteu (1 /2)	-1ml de Folin +9ml d'eau distillée
totaux	-Carbonate de sodium (20%)	-20g de NaCo ₃ +100 ml d'eau distillée
Flavonoïdes	-Nitrite de sodium (5%) -Chlorure d'aluminium (10%) -Hydroxyde de sodium (1N)	-5g de nitrite +100 ml d'eau distillée -10g de chlorure +100 ml d'eau distillée -0,4g de NaOH +10 ml d'eau
Pouvoir réducteur	-Tampon phosphate (pH 6,6; 0,2M)	distillée -2,7218g de KH ₂ PO ₄ + 100 ml d'eau distillée -3,4818g de K ₂ HPO ₄ +100 ml d'eau distillée, le pH de KH ₂ PO ₄ est ajusté à 6,6 avec sa
	-Ferricyanure de potassium K_3 Fe(CN) ₆ , (1%) -Acide trichloracétique TCA (10%) -Chlorure ferrique Fecl ₃ (0,1%)	~
Phosphomolybdate	-Réactif de molybdate	- 0.4056 g de NaH ₂ PO ₄
d'ammonium	(100 ml)	- 0.4943 g de molybdate - 3,33 ml de H ₂ SO ₄

Résumé : Les effets néfastes des radicaux libres sur notre organisme peuvent être inhibés par plusieurs molécules antioxydantes (polyphénols, acide ascorbique et caroténoïdes) se trouvant dans les fruits tels que les agrumes. Dans la présente étude, la teneur en antioxydants ainsi que le pouvoir antioxydant des feuilles, des écorces, des pépins et de jus d'une variété de citron (citrus limon) ont été évalués. Les résultats montrent que les écorces sont plus riches en acide ascorbique que les pépins et les feuilles. Le dosage des caroténoïdes a révélé des concentrations considérables dans les feuilles et les écorces que les pépins. Les feuilles ont des teneurs plus élevées en composés phénoliques et en flavonoïdes que les écorces et les pépins. L'activité antiradicalaire et le pouvoir réducteur mesurés dans les écorces et les feuilles sont plus élevés que ceux dans les pépins. Cependant le test de phosphomolybdate révèle une capacité à réduire de l'ion M⁰⁺⁶ en ion M⁰⁺⁵ et la formation d'un complexe phosphate-M⁰⁺⁵ plus élevée en pépins que les autres parties du citronnier analysés.

Le jus de citron est riche en acide ascorbique tandis qu'il est pauvre en caroténoïdes et en composés phénoliques.

Les résultats de la présente étude nous permettent de conclure que le citron et en particulier leurs écorces et les feuilles constituent une bonne source de divers antioxydants.

Mots clés : antioxydants, citron, acide ascorbique, caroténoïdes, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydante.

Abstract: The harmful effects of free radicals on our body may be inhibited by several antioxidant molecules (polyphenols, ascorbic acid and carotenoids) found in fruits such as citrus. In this study, the antioxidant content and antioxidant power of the leaves, peels, seeds and juice of a variety of lemon (Citrus Limon) were evaluated. The results showed that the peels are richer in ascorbic acid than seeds and leaves. The carotenoids content revealed considerable concentrations in the leaves and peels than seeds. The leaves have higher levels of phenolics and flavonoïds than peels and seeds. The radical scavenging and reducing power measured in peels and leaves are higher than those in the seeds. However the phosphomolybdate test revealed the high ability of seeds to reduce the Mo+6 ion to M^{o+5} and formation of phosphate-M^{o+5} complex than other parts of lemon analyzed. Lemon juice is rich in ascorbic acid while it is low in carotenoids and phenolics. The results of this study allow us to conclude that lemon and especially their peels and leaves are a good source of various antioxidants.

Keywords: antioxidants, lemon, ascorbic acid, carotenoids, phenolic compounds, flavonoïds, antioxidant activity.