

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Sciences Alimentaires**  
**Filière : Sciences Biologiques**  
**Option : Bioprocédés et Technologie Alimentaire**



**Réf :.....**

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

## **MASTER**

### *Thème*

**Activités antioxydantes et  
antimicrobiennes des différentes  
parties de la bigarade**

Présenté par :

**MEZIANI Lamia & SAIDOUNE Sabrina**

Soutenu le : **18 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M <sup>me</sup>	CHOUGUI Nadia	MCA	Présidente
M <sup>r</sup>	BOUDRIES Hafid	MCA	Encadreur
M <sup>r</sup>	NABET Nacim	MCB	Examineur

**Année universitaire : 2016 / 2017**

# *Remerciement*

*En tout premier lieu, nous remercions le bon dieu tout puissant de nous avoir donné courage, volonté et patience pour accomplir ce modeste travail.*

*Nous voudrions remercier particulièrement le docteur **BOUDRIES Hafid**, pour l'honneur qu'il nous a fait en nous encadrant. On vous exprime, monsieur, toutes nos gratitude pour tous vos efforts, compréhension, disponibilité et vos précieux conseils qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

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

***M<sup>me</sup> Chougui. N** : qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

***Mr Nabet. N** : d'avoir accepter d'examiner notre travail.*

*Notre gratitude va également à **M<sup>me</sup> Boudries** qui nous a aidé à effectuer la partie microbiologique, aussi à **M<sup>lle</sup> Touati. N** qui nous a donnée de son temps pour analyser notre travail.*

*On tient à remercier chaleureusement **M<sup>me</sup> Boulekbache. L** responsable de laboratoire de technologie alimentaire.*

*A travers ce modeste travail, on tient à remercier l'ensemble des enseignants qui ont contribué de près ou de loin à notre formation, qu'ils retrouvent à travers ces lignes l'expression notre grande reconnaissance.*

*Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

***LAMIA et SABRINA***

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*En premier lieu à la mémoire de ma chère mère, que dieu l'accueille dans son vaste paradis ;*

*A mon chère père pour son soutien, ses sacrifices et sa présence, que dieu le protège pour nous ;*

*A mes chers frères **Tahar, Mustapha** pour leurs soutiens et encouragements, et mon adorable **Samir** pour ses sacrifices, ses encouragements, son soutien, qui ma guider durant toutes mes années d'étude vers le chemin de la réussite ; ainsi qu'à mes chères sœurs que j'adore énormément **Nacira** et **Hassina** (Dieu merci pour votre présence) ;*

*A mes nièces et neveux du plus grand au plus petit ;*

*A toute la famille **Meziani** ;*

*A ma copine **Sabo** avec qui j'ai passé des beaux souvenirs ainsi qu'à toute sa famille ;*

*A toutes mes amies avec qui j'ai passé des moments agréables et inoubliables : **Nesrine, Sonia, Hanane, Lynda, Dibia,...***

*A tous (tes) mes amis (es) de la promotion **Bioprocédés et Technologie Alimentaire 2016/2017** ;*

*Et tous les êtres chers à mes yeux que je n'ai pas évoqués.*

**LAMIA**

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A la mémoire de mon chère père **Abd elmadjid** et mon chère oncle **Mouloud** que dieu les accueille en son vaste paradis.*

*A ma chère mère qui m'a toujours encouragée au cours de mes études et à qui je dois offrir ma réussite, je t'aime maman.*

*A mes chères frère **Walid** et sœur **Massilia** que j'adore et je leur souhaite la réussite dans leur vie.*

*A mes grands parents **Abdrahmane**, **Fatma** et **Zoulikha**, longue vie à eux.*

*A mes oncles et tantes et leurs familles, spécialement à mon adorable **Safia** et son mari **Benali Djazouri**, je leur souhaite que du bonheur.*

*A mon futur mari **Racim**, qui m'a toujours soutenu, et m'a donné le courage d'achever mes études.*

*Chaleureusement, je dédie ce travail à ma copine **Lamouche**, avec qui j'ai passé des moments inoubliables ainsi qu'à sa famille.*

*A toutes mes amies **Fairouz**, **Katia**, **Hanane**, **Dihia**, **Lynda**, **minoucha**...*

*A toutes les personnes chères à mes yeux, **Dida**, **Célia**, **Céline**, **Lala**, **Dina**, **Riham**, **Amazigh**, **Fawzi**, **Lyes**, **Sofiane**, **Yanis**, **Bacem**, **Fouad**, **Manis**, **Sidou**, **Aymen**, **Qais**,... je vous adore.*

*A toute la famille **Saidoune** et ses proches petits et grands.*

*Enfin, avec un immense plaisir, je dédie ce travail à toute la promotion **Bioprocédés et Technologie Alimentaire 2016/2017**.*

**SABRINA**

---

## Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

### Partie théorique

#### Chapitre I : Généralités

1. Historique.....	2
2. Généralités sur la bigarade.....	2
2.1. Description.....	3
2.2. Classification botanique.....	4
2.3. Morphologie.....	5
2.3.1. Epicarpe ou flavido.....	5
2.3.2. Mésocarpe ou albedo.....	5
2.3.3. Endocarpe ou pulpe.....	5
3. Composition chimique et biochimique de la bigarade.....	6
4. Utilisation et effets thérapeutiques de la bigarade.....	7

#### Chapitre II : Les antioxydants de la bigarade

1. Les oxydants.....	9
1.1. Les radicaux libres.....	9
1.1.1. Sources des radicaux libres.....	9
1.2. Le stress oxydatif.....	10
2. Les antioxydants.....	10
3. Les antioxydants de la bigarade.....	10
3.1. La vitamine C.....	11
3.1.1. Propriétés antioxydantes de la vitamine C.....	12
3.1.1.1. Neutralisation des radicaux libres.....	12
3.1.1.2. Régénération des tocophérols.....	12

---

3.2. Les caroténoïdes.....	13
3.2.1. Propriétés antioxydantes des caroténoïdes.....	13
3.2.1.1. Neutralisation des radicaux libres.....	13
3.2.1.2. Piégeage de l'oxygène singuet.....	14
3.3. Les composés phénoliques.....	14
3.3.1. Acides phénoliques.....	14
3.3.1.1. Propriétés antioxydantes des acides phénoliques.....	16
3.3.2. Flavonoïdes.....	16
3.3.2.1. Flavanone.....	17
3.3.2.2. Flavones.....	18
3.3.2.3. Flavonols.....	18
3.3.2.1. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes.....	18
4. Activité antimicrobienne.....	19
4.1. Micro-organismes utilisés dans les testes antimicrobiennes.....	19
4.1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	19
4.1.2. <i>Vibrio cholerae</i> .....	20
4.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
4.1.4. <i>Listeria innocua</i> .....	20
4.1.5. <i>Candida albicans</i> .....	21

## Partie pratique

### Chapitre III : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	22
1.1. Echantillonnage.....	22
1.2. Traitement des échantillons.....	22
1.2.1. L'écorces et les feuilles.....	22
1.2.2. Les pépins.....	22
1.2.3. Le jus.....	22

2. Dosage des antioxydants.....	23
2.1. Composés phénoliques totaux.....	23
2.1.1. Préparation des extraits.....	23
2.1.2. Dosage des polyphénols totaux.....	23
2.1.3. Dosage des flavonoïdes.....	24
2.1.4. Dosage des caroténoïdes.....	24
2.1.5. Dosage de la vitamine C dans le jus.....	25
3. Evaluation de l'activité antioxydante .....	25
3.1. Pouvoir réducteur.....	25
3.2. Test au phosphomolybdate d'ammonium.....	26
3.3. Neutralisation du radical DPPH.....	26
4. Propriétés physico-chimiques.....	27
4.1. pH du jus.....	27
4.2. Densité du jus.....	28
4.3. Acidité du jus.....	28
5. Activité antimicrobienne.....	29

### Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction.....	31
2. Dosage des antioxydants.....	33
2.1. Les composés phénoliques.....	33
2.1.1. Teneur en composés phénoliques totaux .....	33
2.1.2. Teneur en flavonoïdes .....	34
2.1.3. Teneur en caroténoïdes.....	35
2.1.4. Teneur en vitamine C du jus.....	37
3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	37
3.1. Pouvoir réducteur.....	37

3.2. Test de phosphomolybdate d'ammonium.....	38
3.3. Neutralisation du radical DPPH.....	39
4. Propriétés physico-chimiques.....	41
4.1. pH.....	41
4.2. Densité du jus.....	41
4.3. Acidité de jus.....	41
5. Activité antimicrobienne.....	41
Conclusion.....	45

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

## Liste des abréviations

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : Oxygène singulet.

**<sup>3</sup>O<sub>2</sub>** : Oxygène triplet.

**Abs** : Absorbance.

**ADHA** : Acide déshydroascorbique.

**Asc** : Acide ascorbique.

**Car** : Caroténoïde.

**EAA** : Equivalent d'acide ascorbique.

**EAG** : Equivalent d'acide gallique.

**EQ** : Equivalent de la quercétine.

**FL** : Flavonoïde.

**GSH** : Glutathion réduit.

**GSSG** : Radical thyl oxydé.

**MS** : Matière sèche.

**pH** : Potentiel d'hydrogène.

**R°** : Radical libre.

**RLA** : Radical libre ascorbyl.

**ROS** : Reactive oxygen species.

**rpm** : Rotation par minute.

**Vit C** : Vitamine C.

**Vit C°** : Radical ascorbyl.

**Vit E** : Vitamine E = tocophérol.

**Vit E°** : Radical tocophéryl.

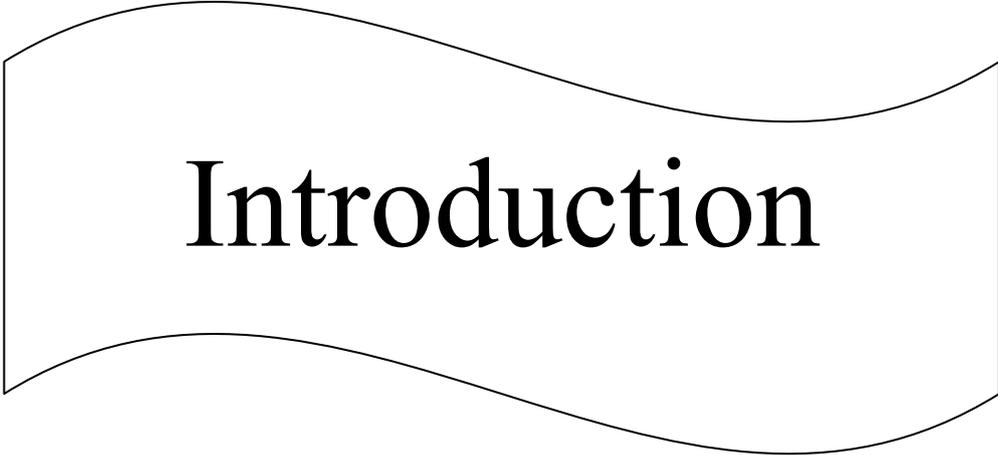
## Liste des figures

N°	Titre	Page
<b>1</b>	Photo de la bigarade (orange amère)	<b>3</b>
<b>2</b>	Coupe équatoriale d'une orange amère	<b>5</b>
<b>3</b>	Structure chimique de l'acide ascorbique	<b>11</b>
<b>4</b>	Action de l'acide ascorbique sur un radical libre et les voies de sa régénération.	<b>12</b>
<b>5</b>	Régénération des tocophérols par l'action de l'acide ascorbique	<b>13</b>
<b>6</b>	Principaux acides hydroxycinnamiques	<b>15</b>
<b>7</b>	Principaux acides hydroxybenzoïques	<b>15</b>
<b>8</b>	Structure de base des flavonoïdes	<b>16</b>
<b>9</b>	Structure chimique de principales classes de flavonoïdes	<b>17</b>
<b>10</b>	Photographie de la bigarade étudiée	<b>22</b>
<b>11</b>	Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl)	<b>27</b>
<b>12</b>	Schéma représentatif des différentes étapes d'étude de l'activité antimicrobienne	<b>29</b>
<b>13</b>	Rendement d'extraction des feuilles, pépins et écorce de la bigarade	<b>31</b>
<b>14</b>	Teneur en composés phénoliques totaux des différentes parties de la bigarade	<b>33</b>
<b>15</b>	Teneur en flavonoïdes des différentes parties de la bigarade	<b>35</b>
<b>16</b>	Teneur en caroténoïdes des différentes parties de la bigarade	<b>36</b>
<b>17</b>	Le pouvoir réducteur de jus, pépins, écorce et feuilles de la bigarade	<b>38</b>
<b>18</b>	Test de phosphomolybdate d'ammonium de jus, pépins, écorce et feuilles de la bigarade	<b>39</b>
<b>19</b>	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH <sup>o</sup> par les différents extraits en fonction de concentration	<b>40</b>
<b>20</b>	Photos des boîtes de pétris après incubation montrant les zones d'inhibition des différents germes	<b>42</b>

---

**Liste des tableaux**

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Description de <i>citrus aurantium</i>	<b>4</b>
<b>II</b>	Composition et valeur nutritive de quelques espèces d'agrumes	<b>6</b>
<b>III</b>	Composition en vitamine des oranges amères et oranges douces	<b>7</b>
<b>IV</b>	Diamètre de la zone d'inhibition des extraits tester vis-à-vis les germes à étudier	<b>42</b>



# Introduction

### Introduction

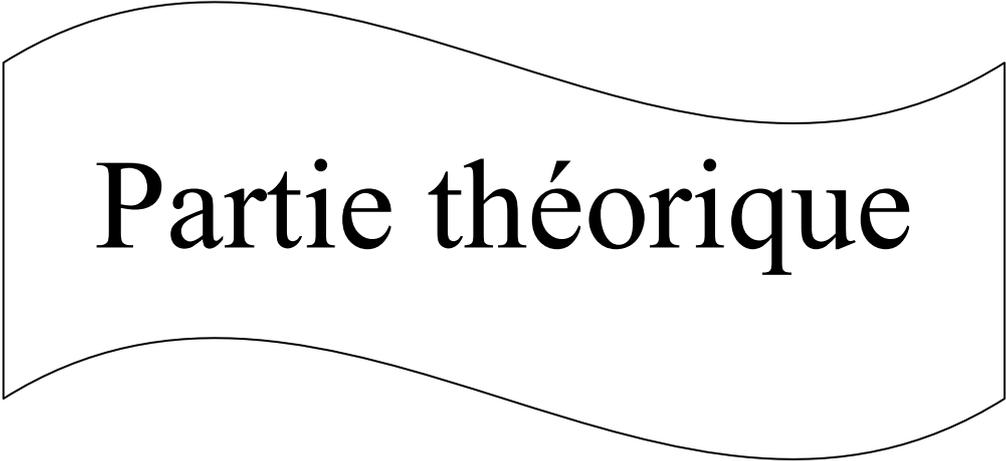
En raison de leur capacité à endommager les molécules biologiques, les radicaux libres peuvent engendrer de nombreuses pathologies. Le stress oxydatif est défini comme étant l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées réactives due à un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (Kœchlin-Ramonatxo, 2006). Il est impliqué dans plusieurs pathologies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires voire les maladies neurodégénératives et certains cancers (Khan, 2010).

Pour éviter les conséquences du stress oxydatif, 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 est obligatoire.

De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont suggéré que la consommation régulière de fruits et légumes permettait la réduction du risque des cancers et des maladies cardiovasculaires (Khan, 2010 ; Rapisarda *et al.*, 2008).

La Bigarade (*Citrus aurantium*) est l'une des espèces des agrumes qui sont considérées comme les fruits les plus importants dans le monde ; ces fruits sont consommés généralement crus ou sous forme de jus. La consommation des agrumes est associée à la réduction de l'apparition de plusieurs maladies. Les effets bénéfiques de ces fruits sont souvent attribués à la présence des composés bioactifs (la vitamine C, les composés phénoliques, les caroténoïdes,...) qui préviennent l'oxydation des molécules biologiques, par inhibition des radicaux libres (Abeysinghe *et al.*, 2007).

Cette étude est une tentative d'explorer les différentes parties de l'orange amère (écorces, feuilles, pépins et jus) comme une source naturelle d'antioxydants, ainsi, les objectifs de cette étude sont de déterminer ses teneurs en composés phénoliques, flavonoïdes, caroténoïdes et la vitamine C, d'évaluer les activités antioxydantes de ses extraits méthanoliques par trois différents tests ( Pouvoir réducteur, test au phosphomolybdate d'ammonium et neutralisation des radicaux DPPH) et d'estimer également leur activité antimicrobienne vis-à-vis certains germes pathogènes tels que *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), *Listeria innocua* et *Candida albicans*.



# Partie théorique

## I. Historique :

Le terme agrumes provient du latin *acrumen* qui signifie dans l'antiquité des arbres à fruits acides, les agrumes englobent plusieurs variétés (Ladaniya, 2008 ; Khan et *al.*, 2010). L'air naturel des agrumes est probablement le sud-est d'Asie, dans le territoire situé sous la chaîne de l'Himalaya. Comme beaucoup de plantes d'importance majeure, les agrumes ont voyagé au gré des invasions et des grandes conquêtes du monde (Jean- Marie, 2008).

Les agrumes remontent au temps des échanges entre l'Orient et l'Occident avant l'ère chrétienne. Ils se sont développés un peu plus tard au Maghreb et en Espagne par les Arabes. Ces derniers par leurs conquêtes avaient introduit le Bigaradier dans l'empire des Almohades. L'oranger fut importé quelques siècles après par les Maures d'Andalousie. En Algérie, le Bigaradier embellissait déjà pendant la période Ottomane (du 16 au 18 siècle) les jardins des Beys (Casbah, Hauteurs d'Alger et Constantine) (Hadj Sahraoui, 2007).

Au début de la colonisation en 1850, le Mandarinier fut introduit en Algérie par M. Hardy. Au dix-neuvième siècle le père Clément de l'Orphelinat agricole de Misserghin (W. d'Oran), effectuant un croisement de Mandarinier avec l'Oranger découvrit la Clémentine qui s'est avérée une variété précoce parmi le groupe des mandarines. Cette variété a été lancée et développée en verger de production dont actuellement plusieurs variétés et clones sont issus et commercialisés à travers le monde (Hadj Sahraoui, 2007).

Les oranges représentent l'une des récoltes de fruits les plus importantes du monde (Li-Ying, 2008). Elles se dit « Naranja » en Espagne, « Laranja » en Portugal, « Arancia » en Italie, « Orange » en France, « Malta » en Inde, « Kan » en Japon, « Portucal » en Grèce, « Tchina » en pays du Maghreb (Kimball, 1999).

## II. Généralité sur la bigarade:

*Citrus aurantium* (la bigarade, l'orange amère ou l'orange de Séville) est l'un des agrumes appartenant à la famille Rutaceae, est connue pour son goût extrêmement amer et aigre (Bocco et *al.*, 1998). Elle se distingue des oranges douces par leurs fruits à peau plus épaisse et plus rugueuse et à pulpe acide et amère (Leroy, 1968).

En raison de leur goût aigre et amer, les oranges amères ne sont pas employées comme fruits comestibles, elles sont plutôt utilisées pour la fabrication de jus et des marmelades (confitures d'orange) (Ersus et Cam, 2007).

Ce groupe inclus quatre variétés : Berguamot, Chinitto, Daida et Séville (Peterson et *al.*, 2006).



**Figure 1** : Photo de la bigarade (orange amère).

## II.1. Description :

Le bigaradier est un bel arbrisseau fruitier de 5 à 10 mètres de hauteur à des branches épineuses, il vit sous les climats tempérés, mais dispose d'une résistance au froid jusqu'à 2C°.

Ces feuilles vertes brillantes ont une odeur faible et une saveur amère, elles sont ovales, subaiguës au sommet, à pétiole articulé et plus ou moins ailée, elles mesurent environ 8cm de longueur et 4 cm de largeur.

Les fleurs pouvant atteindre 25mm, sont blanches et très odorantes. (Escartin, 2011), possèdent de 4 à 5 pétales imbriqués, et sont souvent recourbés vers l'arrière. (Polese, 2008).

Le fruit appelé « Bigarade » est ronds parfois ovalisant ou aplatis. Tient longtemps sur l'arbre sans perdre leur parfum, les fruits sont des oranges à jus très chargé d'acidité et d'amertume. Au moins de 15 à 20 pépins par fruit. La peau rugueuse plus au moin épaisse et piquetée. (Masaoudi, 2005).

Les graines sont de couleur blanchâtre à verdâtre pâle, aplaties et angulaires. Elles sont polyembryonnaires, ce qui signifie qu'elles ont plusieurs embryons qui peuvent germer. Les embryons sont soit Zygotiques, dérivent de la pollinisation de l'ovaire par reproduction sexuée, soit Nucellaire, provenant entièrement à partir de la plante mère et présentent des caractéristiques très similaires à la plante mère. (Polese, 2008).

Les caractéristiques du bigaradier sont illustrées dans le Tableau I :

**Tableau I** : Description de *Citrus aurantium*. (Massaoudi, 2005).

Espèce	Non commun	Taille de l'arbre	Couleur de fruit	Forme de fruit	La pulpe	Epines	Feuilles	Fleurs
<i>Citrus aurantium</i>	Bigaradier (orange amère)	5 à 10 m	Rouge, Orange	Taille moyenne à peau rugueuse, rond ou ovale	Acide et amère	à court épines	Bien vertes, pointues, fortement ailées	Blanches et très parfumées

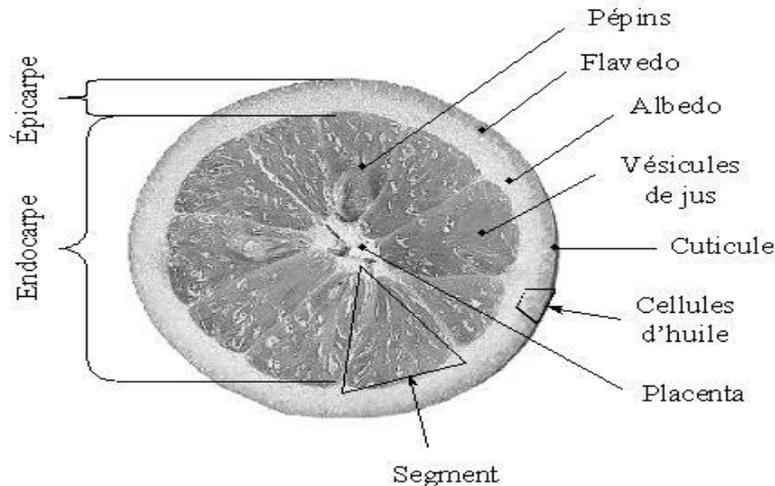
## II.2. Classification botanique :

D'après (Kimball, 1999 ; Manner et *al.*, 2006 ), la position systématique de la bigarade est comme suite :

<b>Règne</b>	Végétal
<b>Division</b>	Embryophyta
<b>Sous-division</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotyledoneae
<b>Sous-classe</b>	Archychalmydeae
<b>Ordre</b>	Géraniale
<b>Sous-ordre</b>	Géraniineae
<b>Famille</b>	Rutaceae
<b>Sous-famille</b>	Aurantiodeae
<b>Tribus</b>	Citreae
<b>Sous-tribus</b>	Citrinae
<b>Genre</b>	Citrus
<b>Espèce</b>	<i>Citrus aurantium</i>

### II.3. Morphologie :

Les agrumes présentent la même structure anatomique qui comprend trois parties (Figure 2) :



**Figure 2** : Coupe équatoriale d'une orange amère (Sousser, 1997).

#### II.3.1. Epicarpe ou flavédo :

Est la partie la plus externe de l'écorce, colorée en jaune orangé ou en rouge. Elle comprend de nombreuses poches sécrétrices d'huile essentielles (Tenscher et *al.*, 2005).

#### II.3.2. Mésocarpe ou albédo :

Est la couche intérieure blanche et spongieuse et riche en pectines (Bouroukaa, 2012). La combinaison flavédo et albédo est appelée péricarpe, communément connu sous le nom d'écorce ou peau. (Salunkhe et Kadam, 1995).

#### II.3.3. Endocarpe ou pulpe :

C'est la partie comestible du fruit, il est composé de segments, recouverts par une membrane mince, distribués autour d'un axe central ayant la même composition que l'albédo. Les segments sont composés de vésicules de jus recouvertes par les membranes plus fines et

contiennent les cellules de jus. Pendant que le fruit mûrit, le jus s'accumule dans les vacuoles et occupe la majeure partie du volume des cellules mûres. (Kimball, 1999).

### III. Composition chimique et biochimiques de la bigarade et d'autres agrumes :

Les agrumes présentent une composition diversifiée. Ils contiennent très peu de fibres, de protéines et de lipides et ils présentent une excellente source de vitamine C et renferment également : la vitamine A (rétinol), B3 (nicotinamide), B5 (acide pantothénique), B6 (pyridoxine) et E (tocophérol). (Souci et *al.*, 1994).

L'écorce d'orange (Bigarade) est composée essentiellement de la cellulose, l'hémicellulose, substances pectiques, des pigments (flavonoïdes, anthocyanines et caroténoïdes) et des huiles essentielles. Elle contient également d'autres composés tels que, les glucides, les minéraux, des protéines et peu de lipides. (Lu et *al.*, 2009).

Les feuilles sont principalement composées de grandes molécules chimiques emprisonnant de nombreux éléments minéraux tels que calcium, potassium, sodium, magnésium, soufre et phosphore. Elles contiennent également de la chlorophylle, des nutriments (glucides, lipides et protéines), des acides aminés, des composés aromatiques complexes. Les acides gras, les alcools primaires, les esters et les carbohydrates ont été identifiés comme les principaux constituants des feuilles d'agrumes. (Anoop, 2012).

**Tableau II :** Composition et valeur nutritive de quelques espèces d'agrumes (Souci et *al.*, 1994 ).

Composant (g)	Bigarade	Citron	Clémentine	Pamplemousse
Eau (%)	85,70	90	86,9	90
Glucides (g/100g)	8,25	2,5	10,4	7,55
Fibres alimentaires (g /100g)	1,6	2,1	1,4	0,1
Acides organiques (g/100g)	1,13	3,5 – 7,2	0,6 – 1,00	1,76
Protides (g/100g)	1,00	1,00	0,7	0,4
Lipides (g/100g)	0,2	0,2	0,2	0,1

**Tableau III** : Composition en vitamine des oranges amères et oranges douces (Souci et *al.*, 1994).

<b>Vitamines</b>	<b>Bigarade</b>	<b>Citron</b>	<b>Clémentine</b>	<b>Pamplemousse</b>
<b>Vitamine C (mg/100g)</b>	49,35	129	41	33
<b>Carotène (µg)</b>	19,83	18,5	300	14
<b>Vitamine B1 (thiamine) (µg)</b>	79	60	80	35
<b>Vitamine B2 (riboflavine) (µg)</b>	42	80	40	20
<b>Vitamine B3 (nicotinamide) (µg)</b>	300	400	300	200
<b>Vitamine B5 (Ac. pantothénique)</b>	240	319	200	189
<b>Vitamine B6 (pyridoxine)</b>	104	172	40	37
<b>Vitamine B8 (biotine) (µg)</b>	2,30	-	1	-
<b>Vitamine B9 (Ac. folique) (µg)</b>	42	13	26	17
<b>Vitamine E (tocophérol) (µg)</b>	320	240	550	110

#### **IV. Utilisations et effets thérapeutiques de la bigarade :**

L'utilisation traditionnelle des citrus est due à leurs propriétés thérapeutiques, remonte au 4<sup>ème</sup> – 5<sup>ème</sup> siècle avant JC (Arias et Ramon-Laca, 2005). Les espèces les plus utilisées pour ces applications sont le citron et l'orange amère (Otero et *al.*, 2000).

Le zeste d'orange amère renferme de la synéphrine et de la N-méthyltétramine, ce qui a donné lieu à la création par les médecins chinois d'un produit pharmaceutique aux propriétés adrénérergiques (action stimulante similaire à celle de l'adrénaline). En concentrant ces deux substances grâce à un procédé d'hémisynthèse, donnant un extrait qui est en fait un véritable médicament de la classe des sympathomimétique, employé contre les effets du choc anaphylactique. L'extrait du l'orange amère est une substance thermogène, il augmente le

métabolisme basal, il augmente aussi la quantité de calories brûlées durant la journée en stimulant le système nerveux, de la même façon que l'adrénaline (Dionne, 2009).

Les feuilles d'orange amère sont utilisées pour leur propriété antispasmodique, tonique et fébrifuge et dans le traitement de l'excitation nerveuse et les palpitations (Martinez, 1959).

La décoction des feuilles cause un goût très amer et désagréable à boire surtout pour les enfants, il est recommandé donc d'utiliser les feuilles incorporées dans la confiture pour corriger la saveur désagréable (Rocheport, 1789).

En phytothérapie, on utilise le fruit pour faciliter la digestion et diminuer les flatulences.

En infusion, il est censé dissiper les maux de tête et faire baisser la fièvre. Son jus stimule les défenses du système immunitaire. En accident, on prescrit ses huiles essentielles pour réguler le rythme cardiaque, calmer les palpitations, favoriser le sommeil. On peut aussi effectuer des massages relaxants avec l'essence de néroli diluée. Enfin, les huiles essentielles d'essence de néroli et de petit-grain sont employées en parfumerie (Escartin, 2011).

## 1. Les oxydants

### 1.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes, ou un groupe d'atomes, avec un nombre impair d'électrons sur l'orbite extérieure, et ils peuvent se former quand l'oxygène interagit avec certaines molécules (Pelli et Lyly, 2003).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être des radicaux libres : anions superoxydes ( $O_2^-$ ), radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ), ou des molécules non radicalaires mais hautement instables ( $O_2$  singulet,  $H_2O_2$ ) ; la plupart des radicaux libres proviennent de la chaîne respiratoire (Berger, 2006).

Les radicaux libres sont plus souvent instables ; de ce fait ils sont réactifs et leur durée de vie est faible (Houee-Levin et *al.*, 2005).

Afin de se stabiliser, les espèces chimiques radicalaires vont interagir très rapidement avec les molécules environnantes afin de se séparer de leur électron célibataire (radicaux réducteurs) ou d'acquérir un électron supplémentaire (radicaux oxydants). Il se crée ainsi des réactions en chaîne d'échange d'électrons célibataire aboutissant à une production en cascade de nouvelles espèces radicalaires (Constantin, 2008).

#### 1.1.1. Sources des radicaux libres

Les radicaux libres sont en permanence et en faible quantité dans l'organisme (Favier, 2003) et selon leurs origines, on distingue deux catégories :

- ✓ **Endogène** : les radicaux libres se produisent spontanément et d'une manière continue au sein de l'organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques, soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente, soit au cours d'une réaction redox avec un composé non radicalaire, lors de la respiration cellulaire (Kœchlin-Ramonatxo, 2006).
- ✓ **Exogène** : les radicaux libres peuvent être d'origine environnementale suite à une exposition prolongée au soleil, pollution atmosphérique, ozone, radiation (Lee et *al.*, 2004).

## 1.2. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif implique toute condition dans laquelle les métabolismes oxydants peuvent exercer leurs effets toxiques à cause d'une production élevée ou d'altération des mécanismes cellulaires de protection (Pelli et Lyly, 2003 ; Valko et *al.*, 2007). Il est défini comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les prooxydants et les antioxydants en faveur des premiers (Pincemail et *al.*, 1999) et impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène (Pelletier et *al.*, 2004), ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles.

## 2. Les antioxydants

Les antioxydants sont définie comme toute substance, qui en faible concentration par rapport au substrat, susceptible d'être oxydée, ainsi elle prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat (Pastre et Prymenko, 2007).

Les antioxydants sont largement présents dans nos aliments, soit sous forme naturelle, soit sous forme d'additifs utilisés dans l'industrie agroalimentaire (Tanguy et Begué-Simon, 2009).

Le système endogène est formé par les enzymes à savoir le superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase, alors que le système exogène est représenté par la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les composés phénoliques (Gilca et *al.*, 2007 ; Valko et *al.*, 2007).

## 3. Les antioxydants de la bigarade

Les agrumes dont la bigarade sont importants en raison de leurs propriétés nutritionnelles et antioxydantes. Ils contiennent une multitude de composés phytochimiques actifs qui contribuent à la santé. Plus de 170 composés phytochimiques ont été identifiées chez les oranges (Betoret et *al.*, 2008).

Il est bien connu que les agrumes sont riches en vitamine C et en caroténoïdes, tout comme d'autre molécules bioactives (les acides phénoliques, les flavonoïdes, etc.) (Rapissadra et *al.*, 2008).

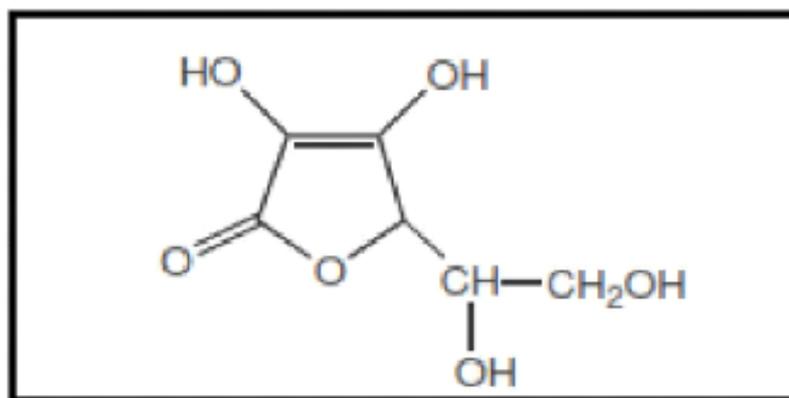
Les oranges amères sont riches en flavanones glycosylés dont l'héspéridine, la narirutine et la naringine (Ortuno et *al.*, 2006 ; Betoret et *al.*, 2008 ; Xu et *al.*, 2008) et en flavones polyméthoxylés particulièrement la sinensétine et la nobilétine (Del Caro et *al.*, 2004).

L'écorce de l'orange amère contient plus de 15% de composés phénoliques que les fruits épluchés (Balasundram et *al.*, 2005). Cette partie non comestible du fruit est une bonne source de flavonones (néoériocitrine, naringine et néohéspéridine), de flavone glycosilés (diosmétine) (Wang et *al.*, 2008) et de caroténoïdes dont la lutéine, la zéaxanthine et la cryptoxanthine (Goodner et *al.*, 2001).

### 3.1. La vitamine C

La vitamine C est un antioxydant puissant. Elle participe dans les réactions avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase pour la neutralisation des radicaux libres (Cheick Traore, 2006). Elle existe sous forme réduite (l'acide ascorbique) et sous forme oxydée (l'acide déshydroascorbique). Le couple acide ascorbique/ acide déshydroascorbique permet le transfert d'un ou deux électrons ; ainsi, la vitamine C intervient dans diverses réactions (Chepda et *al.*, 1999).

L'acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble importante, cette dernière ne peut pas être synthétisée par l'organisme elle doit être apportée par l'alimentation (Klimczak et *al.*, 2007). Chimiquement, elle a une structure apparentée à celle des hexoses. Elle est constituée d'un cycle lactone portant une fonction ène-diol et deux fonctions alcool (Figure 3). L'effet antioxydant de l'acide ascorbique peut être directe par inhibition des radicaux libres ou indirecte par régénération des tocophérols (vitamine E) (Chepda et *al.*, 1999).

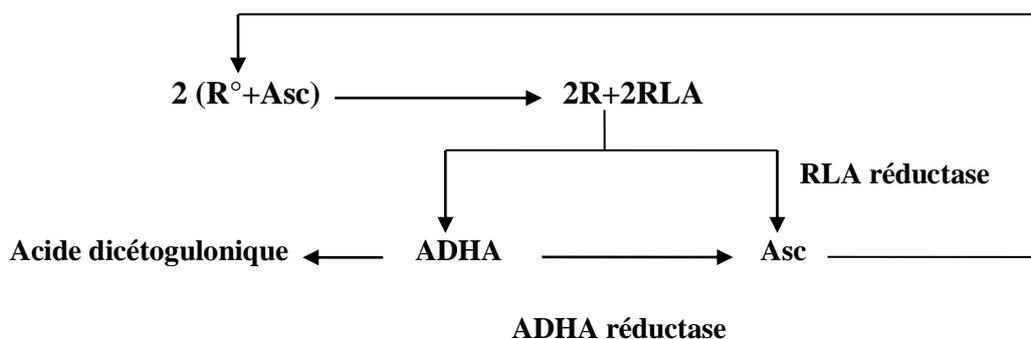


**Figure 3** : Structure chimique de l'acide ascorbique (Diallo, 2005).

### 3.1.1. Propriétés antioxydantes de la vitamine C

#### 3.1.1.1. Neutralisation des radicaux libres

L'action de l'acide ascorbique (Asc) sur un radical libre ( $R^\circ$ ) et les voies de sa régénération est montrée sur la figure 4. Le radical libre ( $R^\circ$ ) est neutralisé par le transfert d'un électron provenant de l'acide ascorbique (Asc). Il résulte un produit détoxifié (R) et un radical libre ascorbyl (RLA). Deux molécules de ce dernier peuvent réagir entre elles pour donner une molécule d'acide ascorbique et une molécule d'acide déshydroascorbique (ADHA) qui peut être transformé en acide ascorbique par ADHA réductase ou se transforme en produit stable, l'acide dicétogulonique (Rose et Bode, 1993).



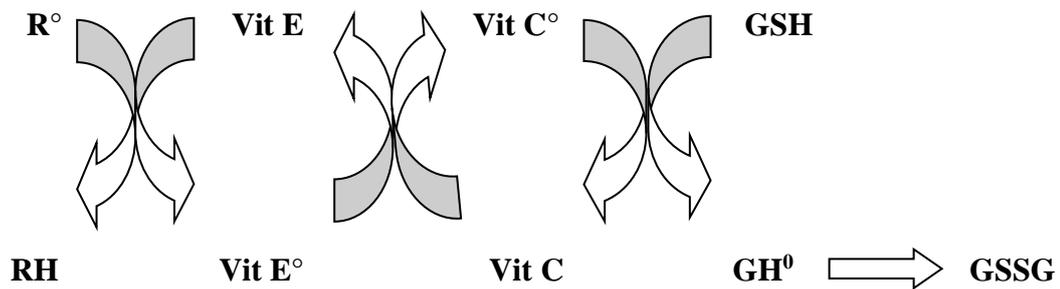
**Figure 4 :** Action de l'acide ascorbique sur un radical libre et les voies de sa régénération (Rose et Bode, 1993).

#### 3.1.1.2. Régénération des tocophérols

La vitamine C joue un rôle fondamental en régénérant la vitamine E (Curtay et Robin, 2000 ; Antwerpen, 2006).

Le terme vitamine E correspond à deux groupes de molécules de nature lipophile : les tocophérols et les tocotriénols. Seul les tocophérols présentent une activité antioxydante significative (Papas, 1998 ; Cuvelier et *al.*, 2003).

Par interaction avec un radical lipidique  $R^\circ$ , la vitamine E (Vit E) ou le tocophérol se transforme en un radical tocophéryl (Vit E $^\circ$ ), ce dernier est régénéré en Vit E sous l'action de la vitamine C (Vit C) qui, à son tour, prend une forme radicalaire (Vit C $^\circ$  = radical ascorbyl). le glutathion réduit (GSH) permet de régénérer la Vit C en se transformant en un radical thyl (GH $^\circ$ ) et par réaction de ce dernier avec une autre molécule de thyl, il donne de glutathion oxydé (GSSG) (figure 5) (Pincemail et *al.*, 1998).



**Figure 5 :** Régénération des tocophérols par l'action de l'acide ascorbique (Pincemail et *al.*, 1998).

### 3.2. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels liposolubles, synthétisés par les végétaux et les microorganismes. Ils sont responsables de la coloration rouge, orange et jaune des plantes, des fleurs et des fruits (Jean et *al.*, 2003).

Les caroténoïdes sont des molécules formées par l'enchaînement de 8 unités isopréniques, elles se dérivent toutes par cyclisation, déshydrogénation et oxydation de la même molécule  $C_{40}H_{56}$  (lycopène) (Derbel et Ghedira, 2005). Selon leur composition chimique, les caroténoïdes sont divisés en deux classes : les carotènes contenant seulement les atomes de carbones et d'hydrogène, et les xanthophylles qui porte au moins un atome d'oxygène (Stahl et Sies, 2003).

Grace à leur longue chaîne carbonée polyinsaturée, les caroténoïdes présentent une activité antiradicalaire et ils sont particulièrement efficaces contre l'oxygène singulet (Ghedira, 2005).

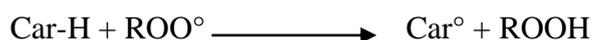
#### 3.2.1. Propriétés antioxydantes des caroténoïdes

##### 3.2.1.1. Neutralisation des radicaux libres

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



La propriété antiradicalaire des caroténoïdes la mieux décrite est leur capacité à inhiber le radical peroxyde ( $ROO^\circ$ ) selon la réaction :



Les caroténoïdes jouent un rôle important dans la protection des membranes cellulaires et des lipoprotéines contre les dommages de la peroxydation (Beutner et *al.*, 2001 ; Stahl et *sies*, 2003).

### 3.2.1.2. Piégeage de l'oxygène singulet

Les caroténoïdes sont des piègeurs efficaces de l'oxygène singulet en le transformant en oxygène moléculaire triplet par la réaction suivante (Lee et *al.*, 2004).



En plus de leur activité antioxydante, les caroténoïdes ont des bienfaits sur la santé (amélioration du système immunitaire avec la réduction du risque de certaines maladies dégénératives telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, la cataracte et la dégénération maculaire) (Dias et *al.*, 2009).

## 3.3. Les composés phénoliques

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie de simples molécules (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés), avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Urquiaga et Leighton, 2000). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits et graines) (Boizot et Chrpentier, 2006). Les phénols sont formés à partir de certains acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine, et la phénylalanine et les sous-produits de leur métabolisme (Ladaniya, 2008).

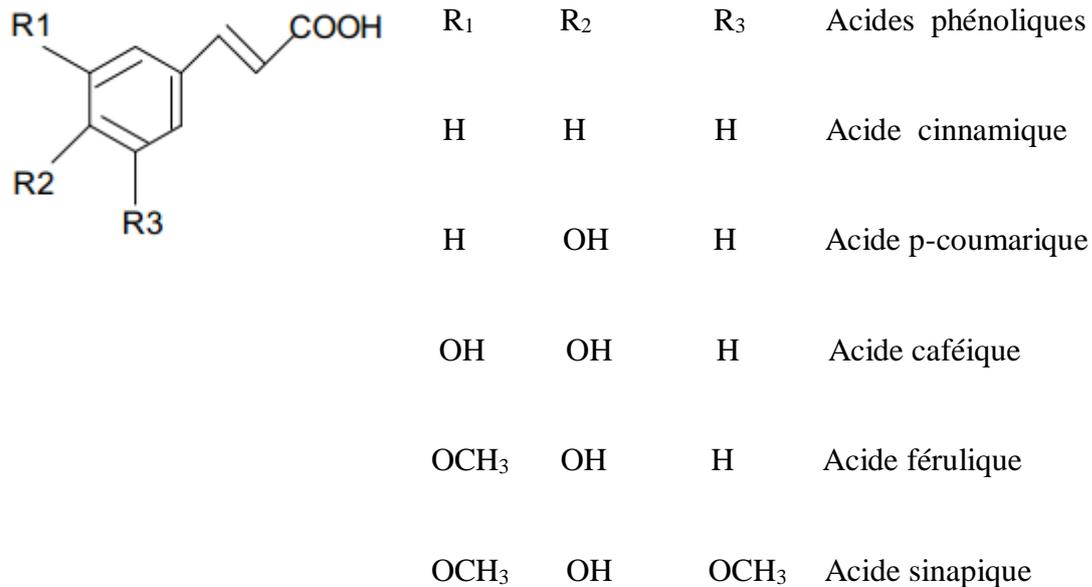
Les principales classes de composés phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les coumarines, les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénolset les tanins (King et Young., 1999 ; Tapiero et *al.*, 2002).

### 3.3.1. Acides phénoliques

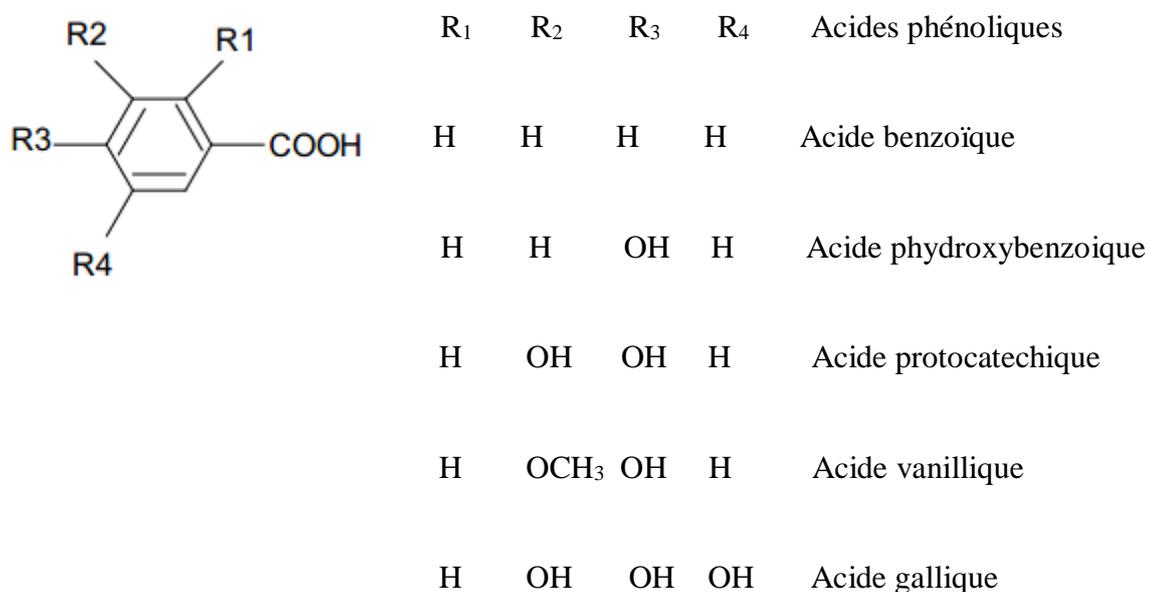
Les acides phénoliques constituent environ un tiers du régime phénolique (Zadernowski et *al.*, 2009). Ce terme, acide phénolique, peut s'appliquer à tous les composés organiques

possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils possèdent un caractère antioxydant, ils sont pour la plupart des dérivés cinnamiques ou benzoïques (Berset, 2006).

L'orange amère contient essentiellement les acides chlorogéniques, caféiques, p-coumariques, sinapiques, féruliques (hydroxycinnamiques) (Bocco et *al.*, 1998 ; Gorinstein et *al.*, 2001). Les structures de ces acides sont illustrées dans les figures 6 et 7:



**Figure 6 :** Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).



H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide syringique
OH	H	H	H	Acide salicylique
OH	H	H	OH	Acide gentisique

**Figure 7 :** Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

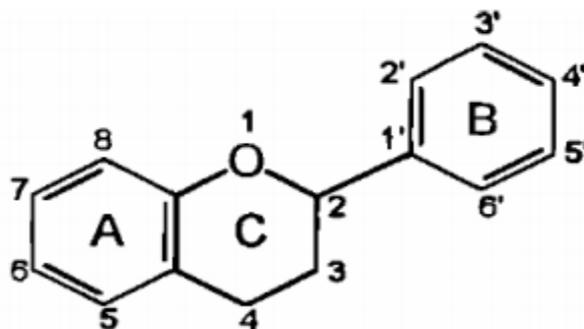
### 3.3.1.1. Propriétés antioxydantes des acides phénoliques

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).

### 3.3.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 600 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ce sont des pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005).

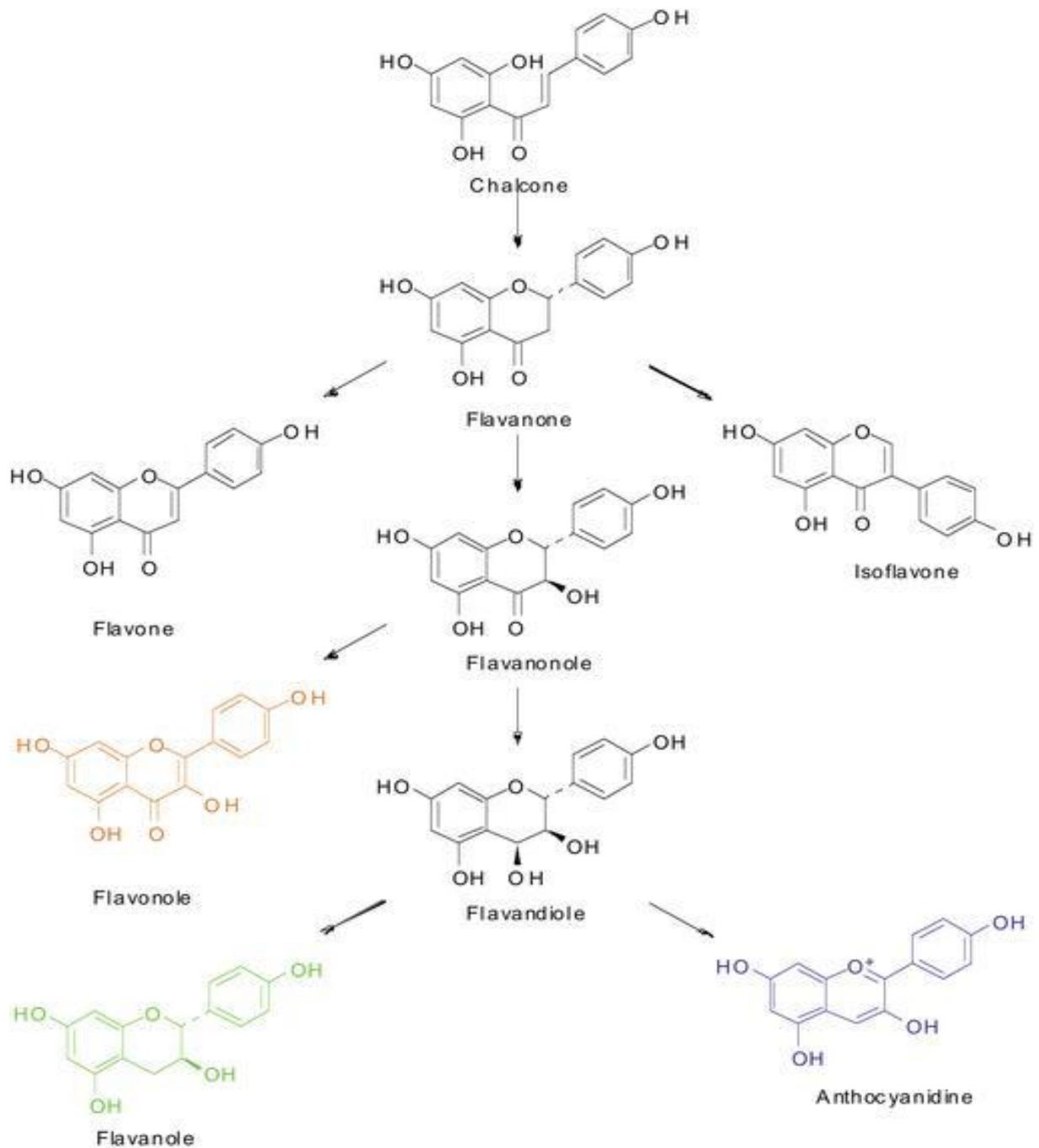
La structure de base des flavonoïdes est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques désignés par les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné C, (Dacosta, 2003) (Figure 8).



**Figure 8 :** Structure de base des flavonoïdes (Krishna et *al.*, 2001).

Selon leurs structures moléculaires, les flavonoïdes sont répartis en différentes classes: flavanones, flavones, flavonols, flavanes, isoflavones et anthocyanines (Benbrook, 2005).

Figure 9



**Figure 9 :** Structures chimiques des principales classes de flavonoïdes.

### 3.3.2.1. Flavanones

Les flavanones ou dihydro-2,3 flavones constituent les flavonoïdes majoritaires isolés dans les oranges douces et amères (Peterson et *al.*, 2006). Ils existent en deux formes, les formes aglycones (les molécules ne sont pas attachées à des fragments de sucre), comprennent : Naringinine, Hespéritine, Isosakuratenine, Heriodictyol, tandis que dans les

formes glycosides (les molécules sont attachées avec des fragments de sucre) on trouve : l'Hespéridine, Narirutine, Néohespéridine, Néoériocitrine et Naringine (Di Majo et *al.*, 2005).

### 3.3.2.2. Flavones

Les flavones des agrumes se trouvent sous forme glycosylée (rutine, diosmine,...) et polyméthoxylée (sinensétine, tangerétine, nobilétine, hexa-O-methylquercetagine, ..) (Jayaprakasha et *al.*, 2007). Ils sont présents en faibles quantités dans les agrumes (Tripoli et *al.*, 2007).

Les flavones sont localisés principalement dans le flavedo des agrumes. On rencontre généralement la diosmine et la tangeritine dans l'orange douce et lutéoline dans l'orange amère (Lucheta et *al.*, 2007).

Bien que les flavones se trouvent en faibles quantités, ces composés ont une capacité antioxydante importante (Tripoli, 2007).

### 3.3.2.3. Flavonols

Ils sont présents à des concentrations peu élevées et sous formes glycosylées, les plus abondants sont la quercétine et le kaempférol. Les flavonols se concentrent beaucoup plus au niveau de la peau des fruits (Benbrook, 2005).

### 3.3.2.4. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes

Cette activité antioxydante est due aux groupements phénoliques existants dans les flavonoïdes et qui sont une source d'un atome d'hydrogène facilement accessible (Di Majo et *al.*, 2005). Cette activité peut s'exercer selon plusieurs moyens :

- ✓ Ils neutralisent les radicaux libres ( $R^\circ$ ) par transfert d'hydrogène selon la réaction suivante :



$R^\circ$  peut être le radical peroxy, l'anion superoxyde, le radical alkoxy ou hydroxyle (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005 ; Tripoli et *al.*, 2007).

- ✓ Les flavonoïdes peuvent intervenir à différents niveaux de processus de peroxydation. Ils sont capables de capturer directement les composés radicalaires, et ainsi d'interrompre la propagation de la réaction en chaîne radicalaire. Ils sont capables

également de protéger les membranes cellulaires (Garcia et *al.*, 1997 ; Robards et Antolovich, 1997 ; Havsteen, 2002). Cela ce fait grâce à leurs activités anti-lipoperoxydation.

- ✓ Les flavonoïdes inhibent la formation des radicaux libres par chélation des métaux de transition tels que le cuivre, le fer et l'aluminium qui à l'état libre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux libres (Puppo, 1992 ; Tripoli et *al.*, 2007). Cette inhibition est due à l'activité de chélation des métaux.

#### **4. Activité antimicrobienne**

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes, de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut, schématiquement, en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997).

Le traitement des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes (Billing et Sherman, 1998).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

##### **4.1. Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens**

###### **4.1.1. *Escherichia coli* (ATCC 25922)**

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, (Kaper et *al.*, 2004), de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$ , *E.*

*coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhées infantiles et les intoxications alimentaires (Percival, 2004).

#### **4.1.2. *Vibrio cholerae* (ATCC 14035)**

L'eau est le véhicule de choix de ce vibron dont l'isolement est basé sur la capacité que présente le germe de pousser dans des milieux dont le pH est supérieur ou égal à 8,5. Ces germes sont aérobies préférentiels et forment des voiles à la surface des milieux de culture liquides. Sur les milieux gélosés les colonies lisses (S) sont brillantes, translucides, rondes. Le vibron du choléra est très mobile (cil polaire), il se multiplie entre 10 et 40°C et cultive bien entre un pH de 7,6 et 9, ou dans des milieux salés (3 %). Il est inhibé par le sulfate de magnésium. Les vibrions du choléra sont oxydase+, gélatine+, H<sub>2</sub>S-, citrate+ (lentement), glucose+, amidon+, maltose+, mannose+, lactose-, dextrine+, indole+.

#### **4.1.3. *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (ATCC 433300)**

Ce sont des cocci à Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulées, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë et intoxications alimentaires (Dworkin et al., 2006).

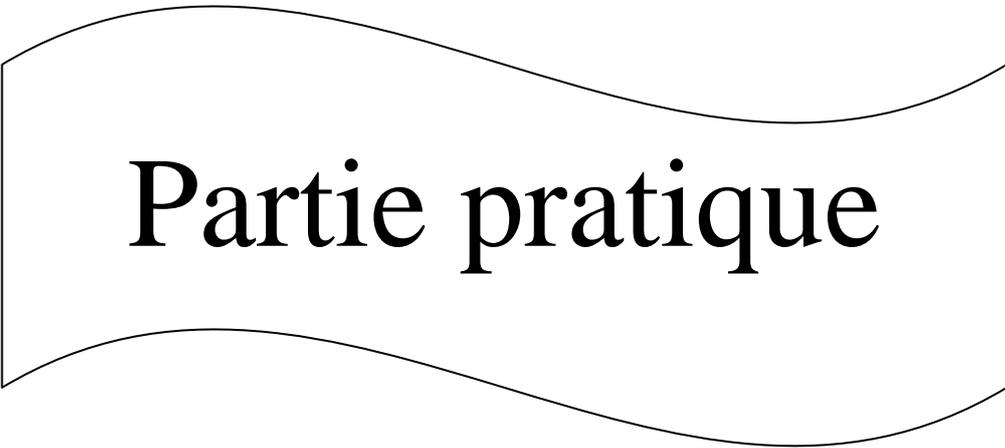
#### **4.1.4. *Listeria innocua* (CLIP 774915)**

*Listeria innocua* est l'une des six espèces appartenant au genre *Listeria*. Il se trouve largement dans l'environnement (comme le sol) et les sources alimentaires. Il peut survivre à un pH et à une température extrêmes, et à une forte concentration de sel. En termes d'apparence, c'est une bactérie Gram-positif en forme de tige. C'est une bactérie non-spore. Il peut vivre individuellement ou s'organiser en chaînes avec d'autres bactéries.

*Listeria innocua* c'est un mésophile fonctionnant à une température optimale de 30 à 37 °C. *Listeria innocua* est importante parce qu'elle est très semblable à celle du pathogène alimentaire *L. monocytogenes* mais non pathogène. Ainsi, son génome a été séquencé pour le comparer au génome de *L. monocytogenes* pour apprendre ce qui rend ce dernier pathogène.

#### **4.1.5. *Candida albicans* (ATCC 1023)**

Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement dans le tube digestif de l'homme comme des germes saprophytes et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo-vaginale, (ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco- cutanées (Delorme et Robert, 1997).



# Partie pratique

# Matériel et méthodes

## 1. Matériel végétal

### 1.1. Echantillonnage

La récolte de la bigarade et ses feuilles est réalisée dans la région d'Aokas (Bejaïa) durant le mois de février (2017). Les fruits étaient bien murs et ne présentent aucun signe de blessure ou d'infection. La récolte s'est faite manuellement, au hasard, sur le même arbre.



**Figure 10** : Photographie de la bigarade étudiée.

### 1.2. Traitement des échantillons

#### 1.2.1. Les écorces et les feuilles

Les oranges amères et leurs feuilles ont été bien lavées à l'eau du robinet, les oranges sont ensuite épluchées pour séparer les écorces de la pulpe. Les écorces et les feuilles sont découpées en petits morceaux et séchées dans une étuve ventilée à 40°C pendant 36 heures.

#### 1.2.2. Les pépins

Afin d'extraire les pépins, la bigarade a été découpée en deux pour faciliter leur extraction, les pépins ont été ensuite séchés dans une étuve ventilée à 40°C pendant 36 heures.

Les écorces, les feuilles et les pépins séchés ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique, puis tamisés à l'aide d'un tamis muni de mailles de 250  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les poudres obtenues sont conservées dans des bocaux en verre fermés, étiquetés et stockés à l'abri de la lumière, pour une prochaine utilisation.

#### 1.2.3. Le jus

Pour l'obtention du jus, les bigarades ont été tranchées en deux et les pépins ont été retirés. En utilisant un presse-agrumes, la bigarade est pressée et le jus récupéré et directement utilisé.

## 2. Dosage des antioxydants

### 2.1. Composés phénoliques totaux

#### 2.1.1. Préparation des extraits

Après une étude bibliographique sur les différents procédés et solvants d'extraction, nous avons opté pour le protocole de Guimarães et *al.* (2010).

Trois g de la poudre de chaque échantillon sont extraits au moyen de 50 ml de méthanol pur sous agitation magnétique pendant 3 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière puis filtrés à l'aide d'un papier filtre. Le filtrat est ensuite évaporé à l'étuve à 40°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Les extraits secs sont pesés pour estimer le rendement d'extraction comme suit :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = ((p_1 - p_0) / E) \times 100$$

**P<sub>0</sub>** : Poids du bécher vide (g).

**P<sub>1</sub>** : Poids du bécher après séchage (g).

**E** : Poids de la poudre de chaque échantillon (g).

Les extraits ont été reconstitués dans du méthanol pur, à des volumes connus, afin d'obtenir des solutions mères à des concentrations connues de (60mg/ml), qui sont en suite stockées à 4°C pour une prochaine utilisation.

#### 2.1.2 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols est basé sur la réaction d'oxydoréduction. Lors de l'oxydation des polyphénols, le réactif de Folin-Ciocalteu qui est un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles (mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et de l'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>)) est réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>). La coloration bleue produite est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (Lapornik et *al.*, 2005).

La teneur en composés phénoliques est déterminée selon la méthode rapportée par Singleton et Rossi (1965). Cent µl d'extrait de chaque échantillon ou de jus sont mélangés

avec 6 ml d'eau distillée et 500 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (1/2). Un et demi ml de carbonate de sodium (20%) et 1,9 ml d'eau distillée sont additionnés respectivement. Un blanc (tous les réactifs excepté l'échantillon) est préparé dans les mêmes conditions.

Après deux heures d'incubation à l'abri de la lumière, la lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm (Kafkas et *al.*, 2009). La concentration en composés phénoliques est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage et exprimées en mg équivalent d'acide gallique par 100 g de matière sèche (mg EAG/100g MS), ou en mg équivalent d'acide gallique par 100 ml de jus frais (mg EAG/100ml de jus frais).

### 2.1.3. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (Ribéreau-Gayon, 1968).

La teneur en flavonoïdes est déterminée selon la méthode rapportée par Ordonez et *al.*, (2006). Zéro et demi ml de jus ou extraits de chaque échantillon sont additionnés à 2 ml de chlorure d'aluminium (2%). Après 20 min d'incubation, l'absorbance est lue à l'aide d'un spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 390 nm.

La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage et elle est exprimée en mg équivalent de quercétine par 100 g de matière sèche ou par 100 ml de jus frais.

### 2.1.4. Dosage des 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 (Rodriguez-Amaya, 2001). L'extraction des caroténoïdes a été réalisée selon la méthode de Soto-Zamora et *al.* (2005) avec quelques modifications.

Une masse de 0,1 g de la poudre de chaque échantillon sont écrasés avec un pilon dans 10 ml de solvant d'extraction (hexane/acétone/éthanol, 5, 5/2, 5/2), ce dernier est récupéré dans une ampoule à décanter, après agitation, on laisse le mélange se décanter et lors de la séparation des deux phases, la phase hexanique supérieure est récupérée et protégée de la lumière par le papier aluminium. L'opération est répétée jusqu'à l'épuisement total de la couleur jaune.

La teneur en caroténoïdes est déterminée par la mesure de l'absorbance de la phase hexanique récupérée à 450 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de  $\beta$ -carotène par 100 g de matière sèche ou en mg équivalent de  $\beta$ -carotène par 100 ml de jus frais en se référant à une courbe d'étalonnage.

### 2.1.5. Dosage de la vitamine C dans le jus

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

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

Cinq cent  $\mu$ l de jus sont mélangés avec 2,5 ml de 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP) et le mélange est incubé pendant 10 min.

L'absorbance est mesurée à 515 nm, la concentration en acide ascorbique est déterminée en se référant à la courbe standard de l'acide ascorbique et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique par 100 ml de jus frais (mg EAA/100 ml de jus frais).

## 3. Evaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes ont été mises en œuvre, celles adoptées dans ce travail sont :

### 3.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur se base sur la réaction d'oxydoréduction. C'est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) du complexe ferricyanure [ $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) qui donne une coloration bleu-verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Ribeiro *et al.*, 2008 ; Guimarães *et al.*, 2010).

Le pouvoir réducteur est estimé par la méthode d'Oyaizu (1986) rapportée par Kumar et *al.* (2005). Un volume de 1 ml de chaque extrait, à différentes concentrations, est additionné à 2,5 ml de tampon phosphate (pH 6,6 ; à 0,2M), 2,5 ml de ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) à 1%, après agitation, le mélange est soumis à l'incubation dans un bain marie à 50°C pendant 20 min. Deux virgule cinq ml d'acide trichloracétique à 10% sont additionnés au mélange et centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min.

Un volume de 2,5 ml du surnageant est ajouté à 2,5 ml d'eau distillée, 0,5 ml de chlorure ferrique à (0,1%) est additionné au mélange. le mélange homogénéisé préalablement, est incubé à l'abri de la lumière pendant 10 min. L'absorbance est lue à une longueur d'onde de 700 nm.

### 3.2. Test au phosphomolybdate d'ammonium

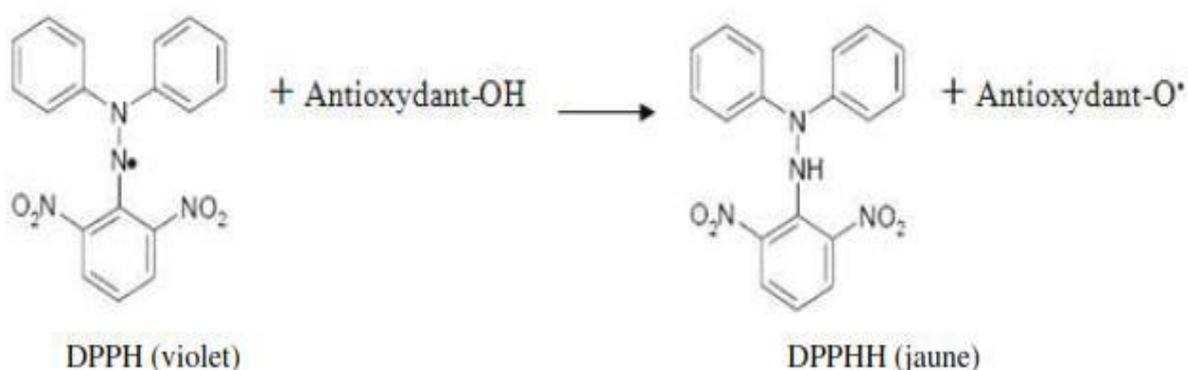
Le test au phosphomolybdate d'ammonium est employé pour déterminer la capacité antioxydante totale (TAC). Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo(VI), présent sous la forme d'ions molybdate, en molybdène Mo (V) en présence de l'extrait, pour former un complexe vert de phosphate/ Mo (V) à pH acide (Prieto et *al.*, 1999).

Le Protocole expérimental est celui décrit par Meot-Duros et *al.* (2008). Deux ml de réactif de molybdate (préparé à partir de molybdate d'ammonium à 4mM, du phosphate de sodium à 28 mM et de l'acide sulfurique à 0,6 M) sont ajoutés à 200 $\mu$ L des extrais à différentes concentrations. Après incubation à 90°C pendant 90 min, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 695 nm.

### 3.3. Neutralisation du radical DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ( $\alpha,\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl) est l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette due à une recombinaison des radicaux DPPH $^\bullet$ , mesurable par spectrophotométrie à 515-517 nm (Cristina et *al.*, 2009). Le mécanisme est récapitulé dans la réaction suivante (Guimarães et *al.*, 2010).



**Figure 11** : Réaction de test DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl hydrazyl) (Guimarães et *al.*, 2010).

Le Protocole utilisé dans cette méthode est celui de Milardovic et *al.* (2006). Il consiste à mélanger 2,9 ml de la solution DPPH avec 0,1 ml de chaque extrait à différentes concentrations ; après une incubation de 30 min, un blanc (méthanol) et un contrôle (méthanol + DPPH) sont préparés. La mesure de la réaction de réduction de la solution du DPPH° a été faite à 515 nm.

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

$$\% \text{ de réduction du DPPH} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{contr}} - \text{Abs}_{\text{éch}}}{\text{Abs}_{\text{contr}}} \right) \times 100$$

**Abs<sub>contr</sub>** : absorbance du contrôle à 515 nm à T=0 min.

**Abs<sub>éch</sub>** : absorbance de l'échantillon à 515 nm à T= 30 min.

## 4. Propriétés physico-chimiques

### 4.1. pH du jus

Le pH du jus est mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

✓ le pH-mètre est étalonné grâce à des solutions tampons à des pH standards et connus. Puis la sonde du pH-mètre est immergée dans l'échantillon et la valeur du pH est affichée directement sur le pH-mètre.

## 4.2. Densité du jus

La densité du jus est mesurée avec un pycnomètre, qui est généralement composé de deux éléments : une fiole et d'un bouchon.

La capacité du pycnomètre propre étant connue avec précision (10 mL) (il suffit de peser au moyen d'une balance de précision le pycnomètre avant et après remplissage pour déterminer par calcul la masse volumique d'un produit liquide).

La densité est calculée selon la formule suivante :

$$D = [(M_1 - M_0) / V] / [(M_2 - M_0) / V]$$

$M_0$  : La masse du pycnomètre vide.

$M_1$  : La masse du pycnomètre rempli de jus.

$M_2$  : La masse du pycnomètre rempli d'eau distillée.

$V$  : volume du pycnomètre.

## 4.3. Acidité du jus

L'acidité est la somme des acides organiques et minéraux exprimée en fonction de l'acide dominant (Acide citrique pour le jus d'oranges), elle est déterminée par titrage avec l'hydroxyde de sodium (NaOH, 0,1M), en présence de la phénolphtaléine comme indicateur coloré, jusqu'au point d'équivalence de la courbe de neutralisation (Bouroukaa, 2012).

cinq ml de jus dilué (2/5) sont versés dans un bécher muni d'un agitateur. Ajouter quelques gouttes de Phénolphtaléine et tout en agitant, on titre avec une solution d'hydroxyde de sodium (0,1 M), dans une burette, jusqu'à l'obtention d'une coloration rose persistant pendant 30s.

L'acidité du jus est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Acidité} = N_b \times V_b \times M_r / V_a \times P$$

**Nb** : La normalité de la solution d'hydroxyde de sodium (0,1N).

**Va** : Volume du jus en ml (5 ml).

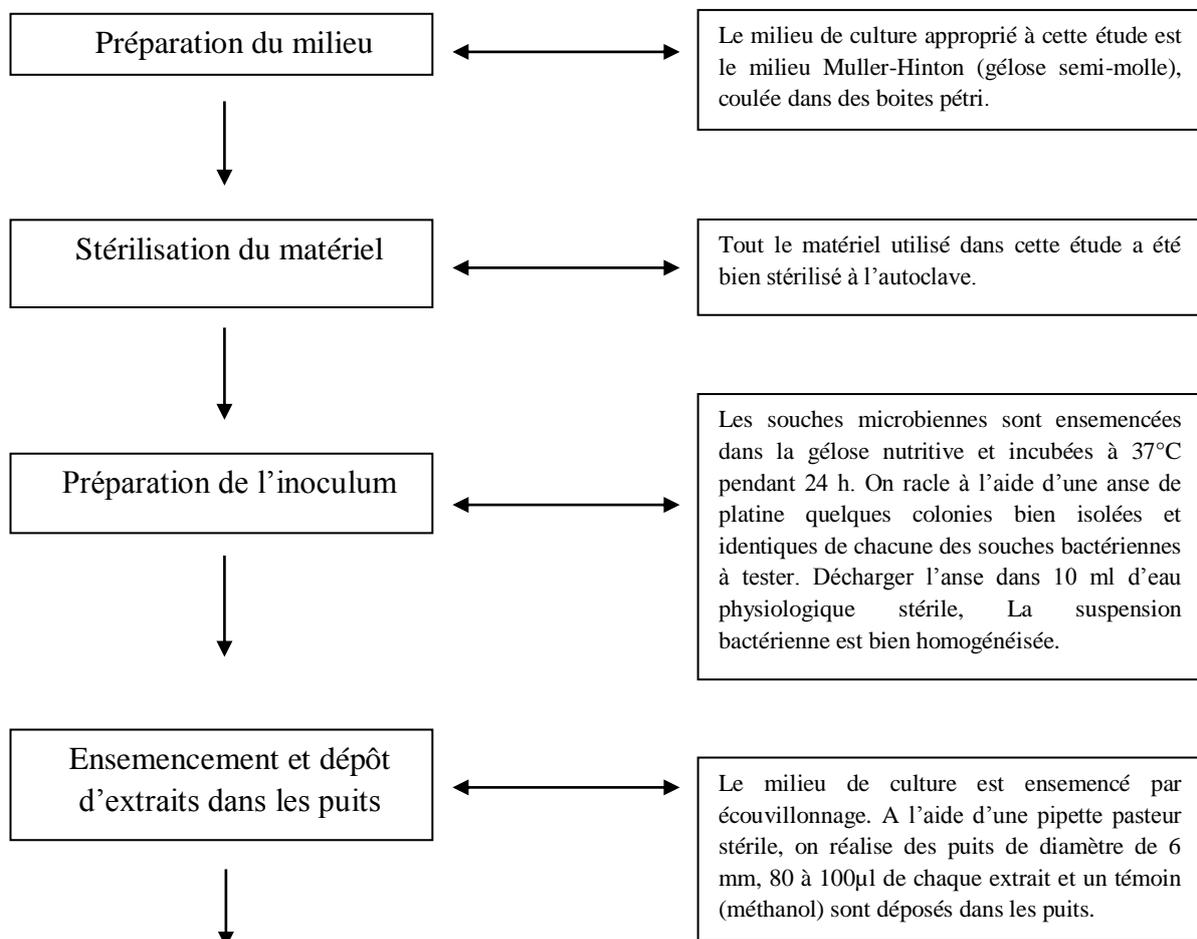
**Mr** : masse molaire de l'acide citrique (192,13 g/mol).

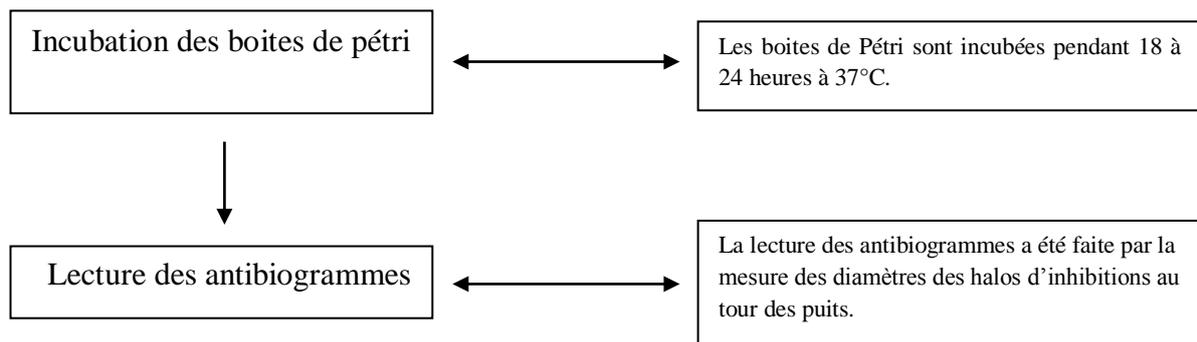
**Vb** : Volume d'hydroxyde de sodium (ml).

**P**: Nombre de protons portés par l'acide citrique (3).

## 5. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits a été réalisée par la méthode des puits on utilisant cinq germes microbiens à savoir quatre bactéries *E. coli* et *Vibrio cholerae* (gram négative) *Staphylococcus aureus* sensible à la Méthiciline et *Listeria innocua* (gram positive) et une levure qui est *Candida albican*, ces puits ont été imbibés de 80 à 100 µl d'extraits. Le protocole suivant résume les différentes étapes suivies durant cette étude :





**Figure 12 :** Schéma représentatif des différentes étapes d'étude de l'activité antimicrobienne.

## 6. Analyse statistique

Une analyse descriptive des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2007, afin de déterminer les moyennes et les écarts types.

D'autre part, une étude statistique a été faite par l'analyse de la variance ANOVA au seuil  $p < 0,05$  à l'aide du logiciel STATISTICA 5.5.

# Résultats et discussion

## 1. Rendement d'extraction

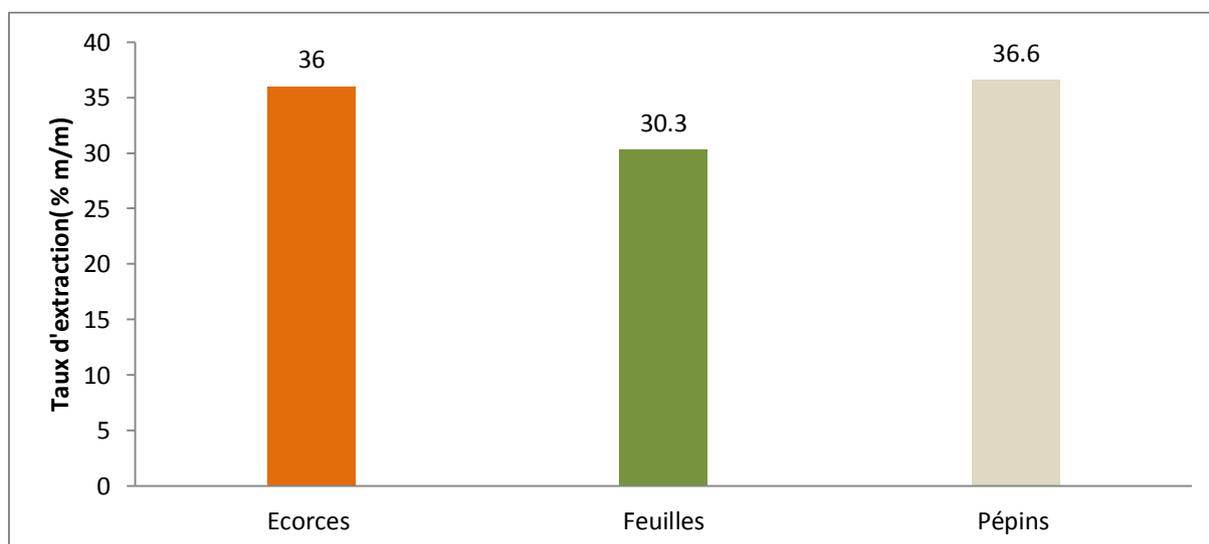
Il existe plusieurs techniques d'extraction des substances actives présentes dans les plantes. L'extraction par solvant est une méthode très utilisée pour libérer les substances bioactives présentes dans les vacuoles du matériel végétal dont l'objectif d'avoir un rendement maximal (Robards, 2003). Elle présente l'étape clé avant toute analyse quantitative ou qualitative (Muanda, 2010).

Les composés phénoliques peuvent être isolés facilement à partir d'un tissu végétal par extraction avec des solvants organiques (méthanol, éthanol, acétone...).

Dans la présente étude, l'extraction adoptée est celle de macération des matières sèches par un solvant polaire. Le méthanol pur (99%) a été choisi comme solvant d'extraction, plusieurs études ont montré sa capacité à extraire le maximum de composés phénoliques comparant à d'autres solvants.

Le méthanol a été utilisé pour ces deux avantages majeurs : sa capacité d'inhiber la réaction du polyphénol oxydase qui cause l'oxydation des composés phénoliques et son avantage d'être facilement éliminé par évaporation (Yao et *al.*, 2004).

Le rendement d'extraction des différentes parties analysées de l'orange amère est illustré dans la figure suivante :



**Figure 13 :** Rendement d'extraction des feuilles, pépins et écorce de la bigarade.

D'après les résultats obtenus, on observe que les rendements en extrait sec sont proches entre les différentes parties. Le rendement le plus élevé est celui des pépins (36,6%) suivi de l'écorce et les feuilles avec des taux de 36% et 30,3% respectivement.

Ziaur (2006) a montré que le rendement le plus élevé pour l'écorce d'agrumes a été obtenu en utilisant le méthanol (19,87%), alors que Muthiah (2012) ont trouvé que le taux d'extraction pour les feuilles de la bigarade en utilisant l'éthanol est de 17,5%, ces valeurs sont nettement inférieures à celles obtenues dans la présente étude.

L'étude de Li et *al.* (2009), sur les différents paramètres affectant l'extraction des polyphénols à partir d'écorces d'agrumes, a montré que l'extraction à partir des écorces fraîches est meilleure de celle obtenue à partir des écorces sèches, et cela peut être due au processus de séchage (la durée et/ou la température de séchage) qui peut détruire certains phénols, et aussi la présence d'eau dans les écorces fraîches 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 rendent éventuellement l'extraction plus difficile.

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans les plantes qui varie principalement en fonction du nombre de groupement hydroxyles, du poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base (Mohammedi et Atik, 2011).

Le séchage influe sur le rendement d'extraction, ce processus est recommandé avant l'étape d'extraction car elle entraîne l'inhibition des enzymes et permet aussi de conserver la poudre pendant une longue durée sans modification importante (Owen et Johns, 1999).

Selon Chan et *al.* (2009) la température du séchage doit être inférieure à 50 C° afin de ramollir le tissu végétal, affaiblir l'intégrité des parois cellulaires et d'hydrolyser les liaisons phénols-protéines ou phénols-polysaccharides, améliorant ainsi la solubilité des composés phénoliques.

Par ailleurs, la réduction de la dimension des particules par un broyage augmente la surface de contact avec le solvant, permettant ainsi d'accélérer la cinétique et d'augmenter le rendement d'extraction.

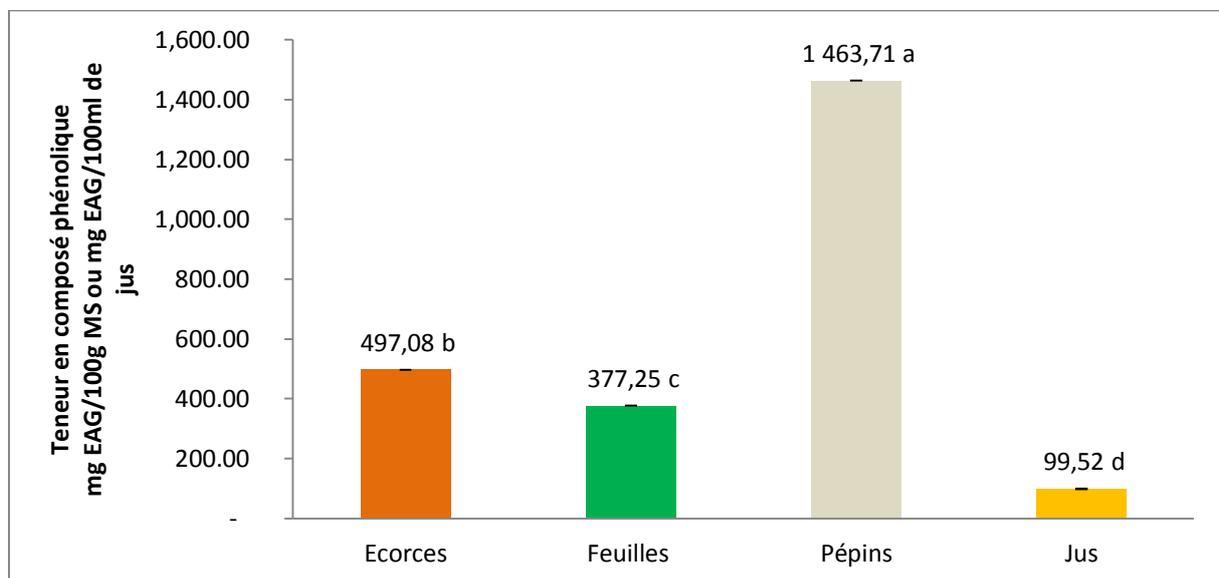
## II. Dosage des antioxydants

### II.1. Les composés phénoliques totaux

#### II.1.1. Teneur en composés phénoliques totaux

Les différents dosages réalisés ont mis en évidence la présence de polyphénols totaux et de flavonoïdes dans toutes les parties de la bigarade analysée.

A l'issue des dosages effectués, il s'est avéré que les quatre échantillons étudiés renferment des teneurs importantes en composés phénoliques totaux. Les différents résultats obtenus sont illustrés dans la figure 14.



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

Les barres verticales représentent les écarts types

Les valeurs désignées par les lettres présentent des différences significatives ( $p<0,05$ )

Les résultats sont classés par ordre décroissant :  $a > b > c > d$

#### Figure 14 : Teneurs en composés phénoliques totaux des différentes parties de la bigarade

Les résultats obtenus montrent que les pépins sont les plus riches en composés phénoliques avec une teneur de  $1463,71 \pm 0,35$  mg EAG/100g MS suivi par les écorces et les feuilles avec des teneurs de  $497,08 \pm 0,28$  et  $377,25 \pm 0,59$  mg EAG/100g MS respectivement tandis que le jus frais présente une teneur de  $99,52 \pm 0,87$  mg EAG/100 ml.

L'étude statistique montre qu'il existe de différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différentes parties analysées de la bigarade.

Muthiah (2012) ont trouvé des teneurs en composés phénoliques des écorces, des feuilles et des fruits de quelques variétés d'agrumes qui varient entre 739 et 3305 mg équivalent de pyrocatecholé/100g MS. Alors que Bejer et *al.* (2012), dans leur étude sur les feuilles d'orange, ont trouvé une teneur en composés phénoliques totaux de 584 mg équivalent d'acide caféique/ 100g MS. Les résultats obtenus par Ghasemi et *al.* (2009) sur l'écorce de la bigarade est de 223,2 mg EAG/g MS.

Les différences observées entre les résultats des différents travaux et ceux obtenus dans la présente étude peuvent être liées à la méthode d'extraction, la différence des standards utilisés ainsi qu'à la méthode adoptée pour le dosage.

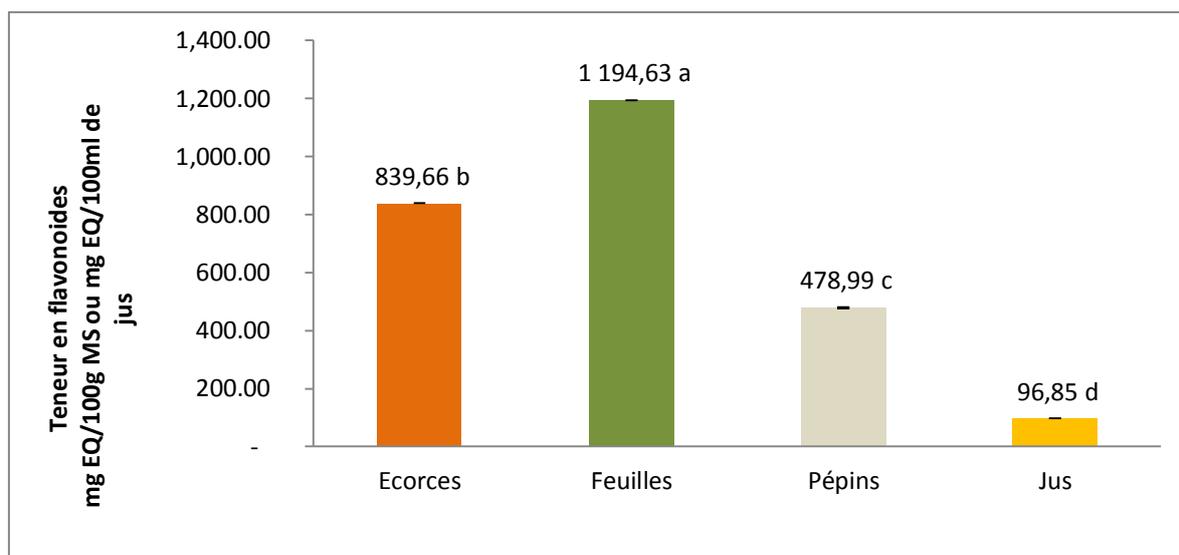
### II.1.1. Teneurs en flavonoïdes

Les concentrations en flavonoïdes des différentes parties de la bigarade (écorces, feuilles, pépins et jus) présentent des différences significatives ( $p < 0,05$ ). Les résultats enregistrés pour les teneurs en flavonoïdes des parties étudiées de la bigarade sont présentés dans la figure 15.

La teneur la plus élevée est observée dans le cas des feuilles ( $1194,63 \pm 0,91$  mg EQ/100 g MS) et la plus faible est enregistrée par de pépins ( $478,99 \pm 1,56$  mg EQ/100g MS).

D'après l'étude de Ghasemi et *al.* (2009), la concentration des écorces de la bigarade en flavonoïdes est de 7,7 mg EQ/g MS, alors que Lagha-Benamrouche et Madani, (2013) ont trouvé 1,17 mg EQ/g MS pour les écorces et 3,25 mg EQ/g MS pour les feuilles de la même plante (bigarade). Ces concentrations sont supérieures à celles trouvés dans notre étude.

La méthode de conservation des plantes et d'exposition à la lumière peuvent affecter la teneur en flavonoïdes car ils sont sensibles à l'oxydation, et ils ont tendance à former des polymères donnant ainsi des tannins condensés ce qui pourrait expliquer ces différences de concentrations (Manach et *al.*, 2004).



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

Les barres verticales représentent les écarts types

Les valeurs portant des lettres différentes montrent des différences significatives ( $p<0,05$ )

Les résultats sont classés par ordre décroissant ;  $a > b > c$

**Figure 15 :** Teneur en flavonoïdes des différentes parties de la bigarade.

### II.1.2. Teneur en caroténoïdes

Les caroténoïdes sont insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques tels que l'acétone, l'hexane et le méthanol (Rodriguez- Amaya, 2001). Au cours de leur extraction, deux phases bien distinctes se sont formées : une phase apolaire lipophile à partir de laquelle ont été isolés les caroténoïdes et une phase polaire qui renferme des molécules hydrophiles tels que les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes.

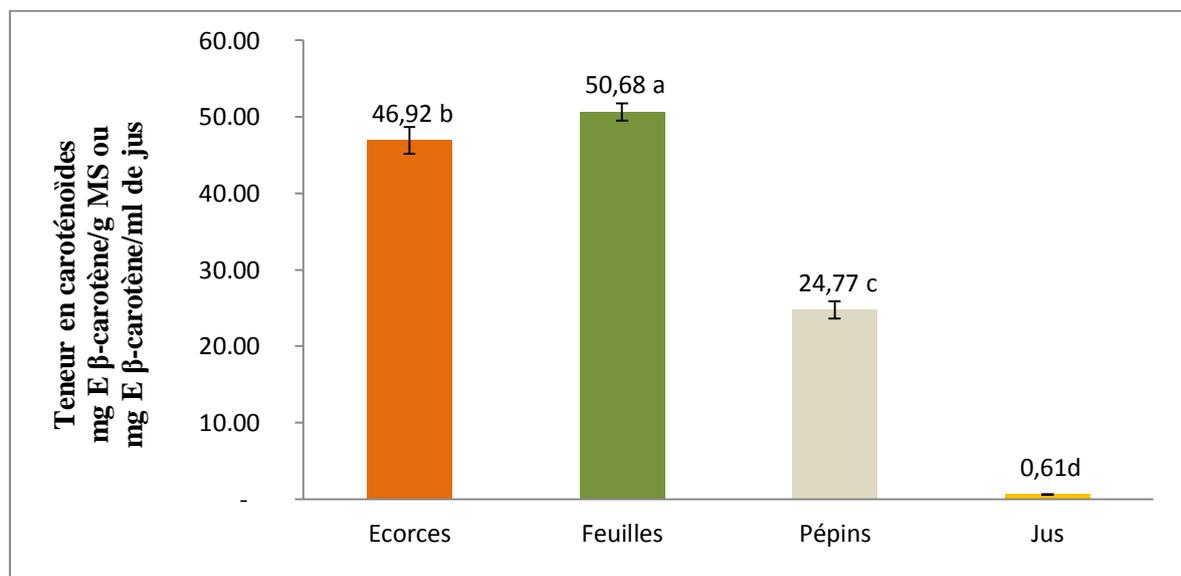
Les concentrations en caroténoïdes des différentes parties de la bigarade analysées présentent de différences significatives ( $p<0,05$ ). La teneur la plus élevée est notée pour les feuilles ( $50,68\pm 1,13$  mg équivalent de  $\beta$ -carotène/g MS) suivie de l'écorce et des pépins ( $46,92\pm 1,72$  et  $24,77\pm 1,13$  mg équivalent de  $\beta$ -carotène/g MS) respectivement. Alors que le jus frais a une teneur de  $0,61\pm 0,13$  mg équivalent de  $\beta$ -carotène/ml.

Les résultats de la présente étude ont montré que les feuilles de la bigarade sont les plus riches en caroténoïdes que les autres parties contrairement aux résultats obtenus par Rodriguez-Amaya (2001) qui a montré que les écorces sont les plus riches en caroténoïdes que les autres parties de la plante et cela est peut être due à l'absorbance des chlorophylles à 450nm.

La concentration en caroténoïdes varie non seulement avec les espèces mais aussi avec les variétés, les facteurs naturels (la lumière, le sol, le degré de maturation, le climat, l'origine géographique et les conditions de culture) et les conditions de conservation et de stockage, en effet l'exposition des oranges à la lumière et à des températures élevées favorise les pertes en caroténoïdes (Rodriguez-Amaya, 2001 ; Dias et *al.*, 2009).

Kato et *al.* (2004) ont indiqué que l'accumulation des caroténoïdes pendant la maturation des agrumes est régulée par l'expression des gènes responsables de leur biosynthèse, ainsi que les conditions de culture.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 16.



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

Les barres verticales représentent les écarts types

Les valeurs portant des lettres différentes montrent des différences significatives ( $p<0,05$ )

Les résultats sont classés par ordre décroissant ;  $a > b > c$

**Figure 16:** Teneur en caroténoïdes des différentes parties de la bigarade.

### II.1.4. Teneur en vitamine C de jus

Le résultat du dosage de la vitamine C, obtenu pour le jus frais de la bigarade est exprimé en mg équivalent de l'acide ascorbique par 100 ml de jus frais (mg EAA /100 ml), est de  $254,07 \pm 6,24$  mg EAA /100 ml.

Selon Elez-Martinez et Martin-Belloso (2007) et Izuagie et Izuagie (2007), les teneurs en acide ascorbique des jus d'oranges sont comprises entre 56,3 et 60 mg/100ml, alors que Ramful et *al.* (2010), ont trouvés que la teneur de la bigarade en vitamine C est inférieur à 600 $\mu$ g/ ml. Ces résultats sont inférieurs à celle obtenue dans la présente étude.

La variabilité des teneurs en acide ascorbique des oranges est influencée par les variations saisonnières et annuelles du soleil, l'humidité, la variété du fruit, la position des fruits sur l'arbre et leur degré de maturité.

D'autres facteurs peuvent aussi être impliqués, notamment la sensibilité de cette vitamine à l'air et à des températures élevées (Elez-Martinez et Martin-Belloso, 2007).

## III. Evaluation de l'activité antioxydante

### III.1. Pouvoir réducteur

Le potentiel antioxydant des extraits est estimé en utilisant la méthode de réduction au ferricyanure de potassium. La présence de réducteurs dans les extraits induit la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) selon la réaction suivante :



La couleur jaune de la solution de ferricyanure de potassium vire vers une couleur bleue verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque extrait.

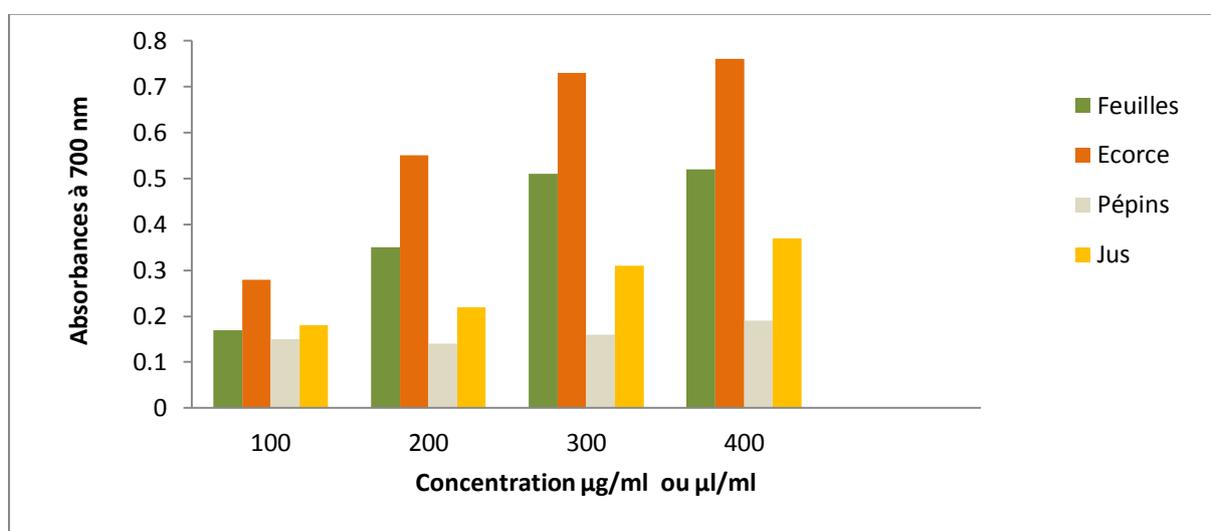
Le pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des feuilles, pépins, écorces et aussi le jus, est déterminé par la mesure de l'absorbance à 700 nm, et l'augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur.

Dans la présente étude, le pouvoir réducteur varie d'une partie de la bigarade à l'autre, d'après la présentation graphique (figure 17), les écorces de la bigarade présentent le meilleur pouvoir réducteur avec des absorbances de 0,28 à 0,76 suivi par les feuilles avec des absorbances de 0,17 à 0,52 tandis que les pépins présentent le pouvoir réducteur le plus faible

dont les absorbances varient de 0,15 à 0,19. Cependant que les absorbances de jus frais varient de 0,18 à 0,37.

Plusieurs études, ont confirmé que le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration (Elmastasa et *al.*, 2006 ; Nisha et *al.*, 2009).

La capacité antioxydante est influencée par plusieurs facteurs, tels que la variété, le degré de maturation, le sol, le climat et les méthodes analytiques (Xu et *al.*, 2008). Elle dépend également, selon Huang et *al.* (2006), de la teneur en composés phénoliques, incluant les flavonoïdes.

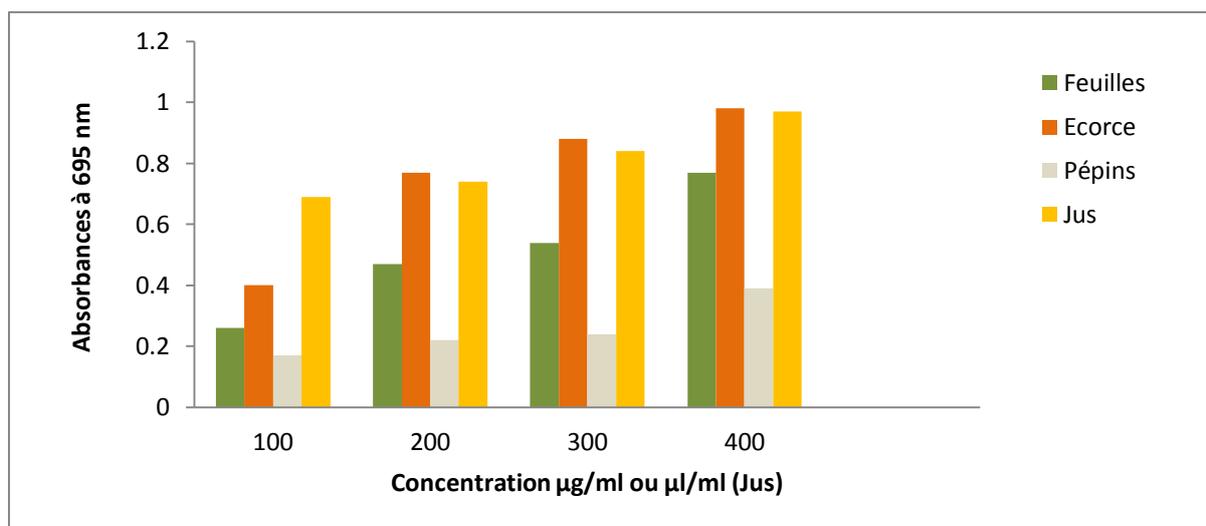


**Figure 17:** Le pouvoir réducteur de jus, pépins, écorce et feuilles de la bigarade.

### III.2. Test de phosphomolybdate d'ammonium

La capacité antioxydante totale des extraits méthanoliques et le jus est évaluée par la méthode de Meot-Duros et *al.*,(2008). Ce test est basé sur la réduction de Mo (VI) à (V) par la présence de l'échantillon et la formation ultérieure d'un complexe vert de phosphate/ Mo (V).

Les résultats des différents extraits et le jus sont représentés dans la figure 18 qui montre que l'activité antioxydante des différentes parties étudiées de la bigarade est proportionnelle à leurs concentrations.



**Figure 18 :** Test de phosphomolybdate d'ammonium de jus, pépins, écorces et feuilles de la bigarade.

Le pouvoir de phosphomolybdate d'ammonium dans la présente étude est déférent d'une partie à l'autre de la bigarade, la plus grande activité a été enregistrée pour les écorces où les absorbances élevée ont été notées de 0,4 à 0,98 suivi par les feuilles et les pépins avec des absorbances de 0,26 à 0,77 et 0,17 à 0,39 respectivement par contre le jus frais présente des absorbances de 0,69 à 0,97.

### III.3. Neutralisation du radical DPPH

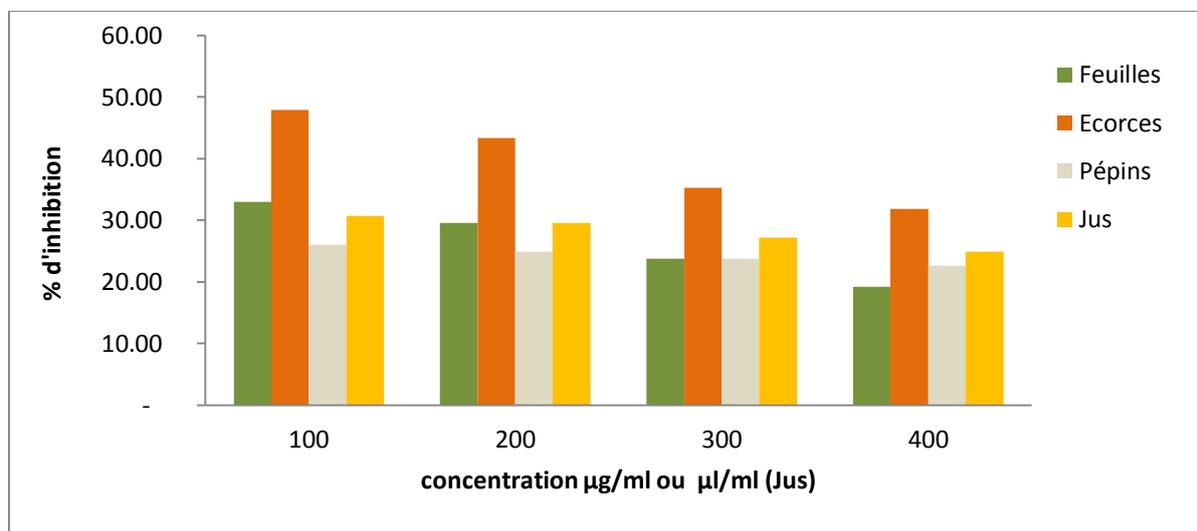
La neutralisation du radical libre, stable DPPH, est une méthode rapide et largement utilisée pour évaluer cette activité comparée à d'autres méthodes (Kuda et *al.*, 2005). Cette activité antiradicalaire est basée sur la réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, suite à un transfert d'hydrogène qui provient des différents antioxydants qui se trouvent dans le milieu réactionnel.

Expérimentalement, lorsque un volume défini de l'extrait est additionné à un volume déterminé de la solution du DPPH, alors ceci provoque la forme réduite, l'absorbance du mélange réactionnel diminue et devient stable dans un laps de temps court, ainsi la solution change de couleur instantanément du violé sombre à la jaune pâle (Molyneux, 2004).

La caractéristique principale d'un antioxydant est sa capacité d'agir en tant que piègeur de radical libre en donnant un proton. Afin de se renseigner sur le piégeage du radical DPPH et

la puissance des écorces, feuilles, pépins et jus de la bigarade, nous avons testé une gamme de concentrations pour chaque échantillon.

Les résultats de l'activité antiradicalaire des échantillons testés à des concentrations différentes, exprimés en pourcentage d'inhibition sont illustrés dans la figure 19.



**Figure 19 :** Pourcentage d'inhibition du radical DPPH° par les différents extraits en fonction de concentration.

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits d'écorces, feuilles, pépins et jus de la bigarade présentent une capacité de piéger le radical DPPH°, comme on constate également que le pourcentage d'inhibition du radical est proportionnel à la concentration des différents extraits utilisés.

L'étude statistique ( $p < 0.05$ ) n'a révélée aucune différence significative entre les écorces et les pépins, par contre le pourcentage d'inhibition du radical DPPH des feuilles est significativement différent.

Les écorces présentent le pourcentage d'inhibition le plus élevé qui est de  $39,59 \pm 7,35\%$  suivie de celui des feuilles  $26,37 \pm 6,11\%$  et enfin les pépins avec un pourcentage de  $24,36 \pm 1,48\%$ . Le jus frais de la bigarade présente un pourcentage d'inhibition qui est de l'ordre de  $28,09 \pm 2,55\%$ .

Lagha-Benamrouche et Madani, (2013) ont montré que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH des écorces de la bigarade est de 88% et celui de ces feuilles est de 99,5%. Ces résultats sont nettement supérieurs à celle obtenue dans la présente étude.

La neutralisation du radical DPPH par les extraits des différentes parties d'agrumes a été attribuée, par plusieurs auteurs, à la présence de composés phénoliques qui cèdent facilement des protons pour le réduire (Tepe et *al.*, 2007 ; Li et *al.*, 2009 ; Nisha et *al.*, 2009).

## IV. Propriétés physico-chimiques

### IV.1. pH

Le genre *Citrus* contient deux espèces d'orange. La première, *Citrus sinensis* (L) Osbeck, correspond aux oranges douces, la deuxième, *Citrus aurantium* (L), aux oranges amères. La bigarade est peu comestible à cause de son amertume et son pH bas, son utilisation est principalement réservée à la production de marmelades ou des huiles essentielles (Kimball, 1999). Le pH des oranges varie entre 3.0 et 3.5 (Rangana et *al.*, 1983), la bigarade, étant la plus acide, son pH est inférieur à celui d'autre agrumes, qui est de 2,31.

### IV.2. Densité de jus

On entend par densité le rapport entre la masse volumique d'une substance et la masse volumique d'une substance de référence (eau).

La densité du jus obtenue dans nos analyses est de 1,07 qui est presque égale à la densité de différents jus de différents fruits, citant le jus d'orange et le jus de pomme qui présentent une densité de 1,05. (FAO, 2005)

### IV.3. Acidité de jus

L'acidité a un rôle fondamental dans la saveur acidulée du jus d'orange, l'acidité a une influence remarquable sur la perception sensorielle des composés volatils du jus (Ahmed et *al.*, 1978). L'acidité du jus de la bigarade est de 7,17 g d'acide citrique/l de jus.

## V. Activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien des extraits de différentes parties : écorces, feuilles et pépins de *Citrus aurantium* par la méthode de diffusion des extraits dans des puits sur un milieu gélosé solide, Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour la levure en présence d'un témoin qui est le méthanol.

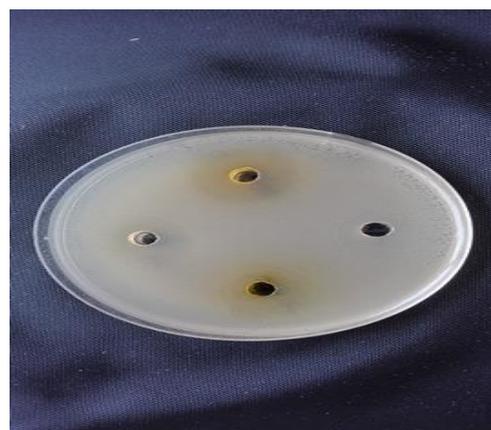
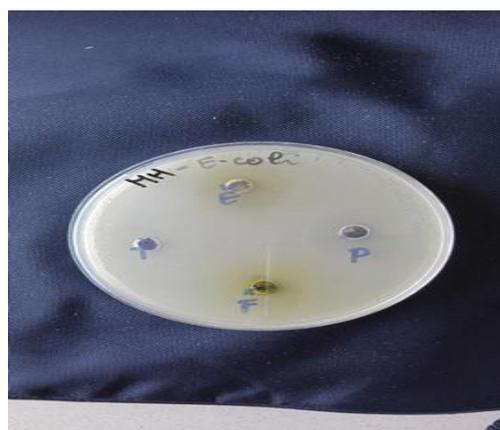
L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les extraits à tester vis-à-vis quatre bactéries : *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae* qui sont des Gram<sup>-</sup>, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et *Listeria innocua* qui sont des Gram<sup>+</sup> et un champignon qui est une levure : *Candida albicans*.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau et la figure, photographiées au laboratoire après incubation, suivants, ils représentent les diamètres des zones d'inhibitions des extraits tester vis-à-vis les germes à étudier.

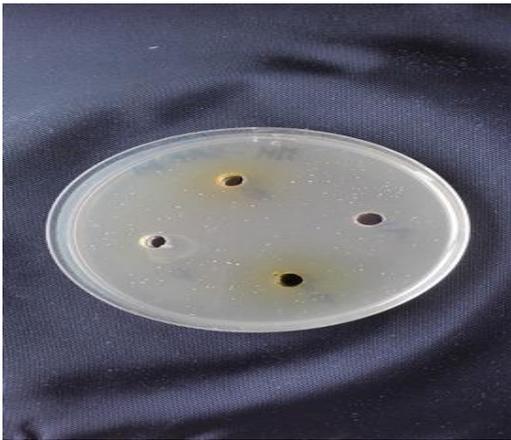
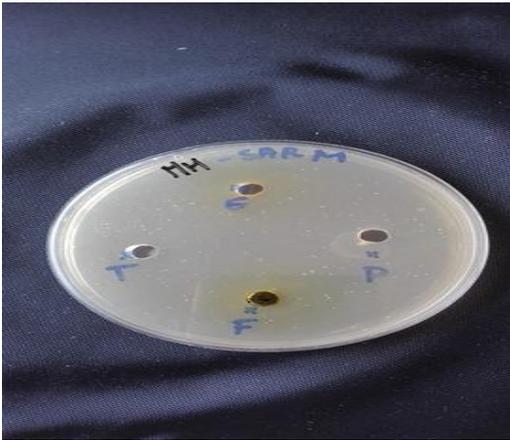
Les puits des extraits des écorces, feuilles, pépins et le témoin sont représentés par les lettres E, F, P et T respectivement.

**Tableau IV :** Diamètre de la zone d'inhibition des extraits tester vis-à-vis les germes à étudier.

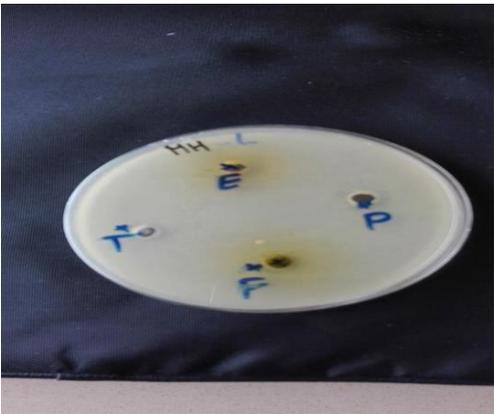
Extraits	Diamètre de la zone d'inhibition (nm)				
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	<i>Vibrio cholerae</i> ATCC14035)	<i>Listeria innocua</i> (CLIP774915)	<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM) (ATCC433300)	<i>Candida albicans</i> (ATCC1023)
Ecorce	<b>20</b>	12	<b>20</b>	<b>15</b>	13
Pépins	18	09	0	0	14
Feuilles	17	<b>13</b>	17	10	<b>19</b>
Témoin	0	0	0	0	0



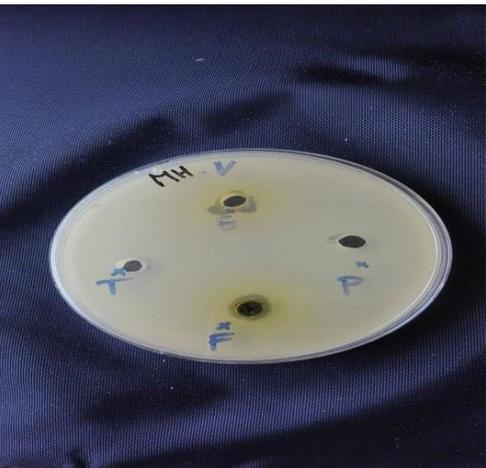
*E.coli*



*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM)



*Listeria innocua*



*Vibrio cholerae*



*Candida albicans*

**Figure 20** : Photos des boîtes de pétris après incubation montrant les zones d'inhibition des différents germes.

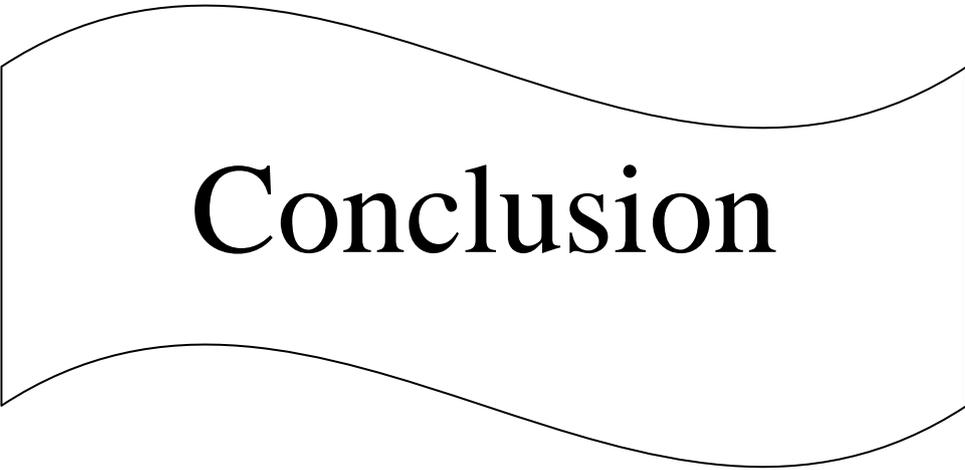
Les bactéries et le champignon étudiés ont montré des sensibilités différentes aux extraits testés, par exception, la souche *Listeria innocua* et SARM ne présentent pas de sensibilité vis-à-vis l'extrait de pépins, comme on a constaté que les germes ne présente aucune sensibilité envers le témoin.

Le diamètre de la zone d'inhibition des extraits de différentes parties de la bigarade varie entre 09 mm et 20 mm, ces résultats indiquent l'effet inhibiteurs des extraits vis-à-vis les germes étudiés.

D'après les résultats obtenus, les écorces présentent une meilleure activité antimicrobienne envers *E.coli* et *Listeria innocua* avec un diamètre de zone d'inhibition de 20 mm. Par contre la meilleure activité marquée par l'extrait de feuilles contre *Candida albicans* avec un diamètre de 19 mm et envers *E.coli* et *Listeria innocua* avec un diamètre de 17 mm. L'extrait de pépins présente une meilleure activité antimicrobienne contre *E.coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 18 mm.

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif majoritaire, mais plutôt à l'action combinée (synergie) de différents composés (Essawi et Srour, 2000).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique, l'altération des fonctions de la membrane cytoplasmique, la séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne et l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (Jungkind, 1995).



**Conclusion**

---

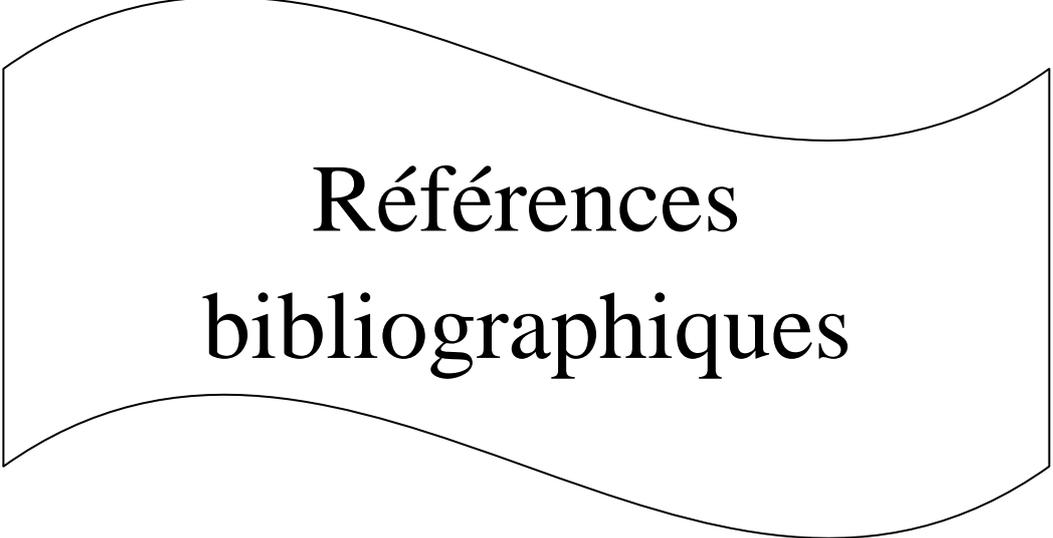
## Conclusion

La présente étude est consacrée aux dosages des différents antioxydants (Acide ascorbique, Caroténoïdes, Composés phénoliques et Flavonoïdes), et à l'évaluation de l'activité antioxydante (Pouvoir réducteur, Neutralisation du radical DPPH et le Test de phosphomolybdate d'ammonium) et de l'activité antimicrobienne des extraits de différentes parties (écorce, feuilles et pépins) de *Citrus aurantium* cultivée dans la région de Béjaïa (Aokas), en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction.

Les résultats obtenus dans ce travail nous permettent de déduire que l'orange amère est une source importante de différents antioxydants. En effet, les dosages effectués ont montré que les feuilles de la bigarade contiennent la teneur la plus élevée en caroténoïdes suivies des écorces avec des teneurs de  $50,68 \pm 1,13$  mg E  $\beta$ -carotène/g de MS et  $46,92 \pm 1,72$  mg E $\beta$ -carotène/g de MS, respectivement. Alors que la teneur la plus importante en composés phénoliques est enregistrée avec les pépins avec une teneur de  $1463,71 \pm 0,35$  mg EAG/100g de MS, concernant les feuilles, elles présentent une source excellente de flavonoïdes qui est de  $1194,63 \pm 0,91$  mg EQ/100g de MS.

Les différents extraits des différentes parties de l'orange amère étudiée présentent différents pouvoir réducteur. Le jus présente un pouvoir réducteur important alors que le meilleur pouvoir antiradicalaire est enregistré par les écorces, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH des différents extraits varie pour des doses allant de 24,36% à 39,59%.

L'activité antimicrobienne des extraits étudiés ont montré que les bactéries : *Escherichia coli*, *Listeria innocua* et *Vibrio cholerae* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et la levure *Candida albicans* présentent une sensibilité vis-à-vis des extraits, les diamètres des zones d'inhibitions varient entre 9 et 20 mm, [sachant que la meilleure activité est présentée par l'extrait des écorces envers *E. coli* et *Listeria innocua* et l'extrait des feuilles envers *Candida albicans*, *E. coli* et *Listeria innocua* et enfin l'extrait de pépins envers *E. coli*, alors que SARM et *Listeria innocua* présentent une résistance envers ce dernier].



**Références  
bibliographiques**

A

**Abeyasinghe D.C., Li X., Sun Ch.D., Zhang W.S., Zhou Ch.H. et Chen K.S. 2007.** Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, 104(4): 1338-1344.

**Ahmed E. M., Dennison R. A., et Shaw P. E. 1978.** Effect of selected oil and essence volatile components on flavor quality of pumpout orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (2) : 368-372.

**Anoop K.S. 2012.** Advances in citrus nutrition. Soil science. National research center for citrus. India.

**Arias B.T et Ramon-laca L. 2005.** Propriétés pharmacologiques d'agrumes et de leurs anciennes et utilisation médiévale dans la région méditerranéenne. *Journal d'Ethnopharmacologie*, (97) : 89-95.

B

**Balasundram, N., Sundram, K., et Samman, S. 2006.** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1) : 191-203.

**Bejar, A. K., Mihoubi, N. B., et Kechaou, N. 2012.** Moisture sorption isotherms—Experimental and mathematical investigations of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. *Food Chemistry*, 132(4) : 1728-1735.

**Benbrook C. M. 2005.** Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. *The organic center*, 6-8.

**Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin R.F., Ortuno A. et Del Rio A. J. 1667.** Uses and Properties of Citrus Flavonoïds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4505-1515.

**Berger M.M. 2006.** Manipulations nutritionnelles du stress oxydatif état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 : 48-53.

**Berset C. 2006.** Antioxydants phénoliques-structure, propriétés, sources végétales. Les polyphénols en agroalimentaire. P. Sarni-Manchado and V. Cheynier. Paris, Lavoisier, 265-294.

**Betoret E., Betoret N., Carbonell J.V. et Fito P. 2008.** Effects of pressure homogenization on particle size and the functional properties of citrus juices. *Journal of food Engineering*. Sous press.

**Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Blanco I.H., Hoffmann T., Martin H.D., Mayer B., Noack P., Ruck C., Schmidt M., Schulke I., Sell S., Ernst H., Haremza S., Seybold G., Sies H., Stahl W. et Walsh R. 2001.** Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of  $\beta$ -carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 559-568.

**Billing J. et Sherman, P. W. 1998.** Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly review of biology*, 73(1) : 3-49.

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

**Bocco A., Cuvelier M. E., Richard H. et Berset C. 1998.** Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2123-2129.

**Boizot N. et Charpentier J. P. 2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, 79-82.

**Boudjouef M. 2011.** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisiacampestris*L. Université Ferhat Abbas, Sétif.

**Bouroukaa A. 2012.** Etude biochimique de l'adultération du jus de fruits. Université de Carthage.

## C

**Chan S. W., Lee C. Y., Yap C. F., Aida W. W. et Ho C. W. 2009.** Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16(2) : 203-213.

**Cheik Traore M., 2006.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako : 72.

**Chepda T., Perier C., Chamson A. et Frey J. 1999.** Effets pro et antioxydant de l'ascorbate. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 13 (2) : 115-20.

**CODEX STAN 245. 2004.** Normes CODEX pour les oranges.

**Constantin P. J. 2008.** Pathologies vasculaires oculaires. *Rapport SFO, édition Elsevier Masson*, (22) : 181.

**Cowan M. M. 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.

**Cristina P., Ilonka S. et Bartek T. 2009.** Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, *Revue de Génie Industriel*, 4 : 25-39.

**Curtay J.P. et Robin J.M. 2000.** Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie*. 1-4.

### D

**Del Caro A., Piga A., Vacca V. et Agabbio M. 2004.** Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*. 84 (1) : 99-105.

**Delorme J et Robert A. 1997.** Mycologie médicale. Ed. Centre collégial de développement de matériel didactique, [Mont-Royal Québec], 184.

**Derbel S. et Ghedira K. 2005.** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phétothérapie*. 3(1) : 28-34.

**Di Majo D., Giammanco M., La Ghardaia M., Tripoli E., Giammanco S. et Finotti E b. 2005.** Flavanones in Citrus fruits : structure-antioxidant activity relationships. *Food Research Intrnational*, 38 (10) : 1161-1166.

**Diallo A. 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense Willd.(Myrtaceae)* (Doctoral dissertation, Thèse. Université de Bamako, Mali: Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odoto-Stomatologie), 13-14.

**Dias M. G., Camões M. F. G., et Oliveira, L. 2009.** Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 113(3) : 808-815.

**Dionne J.Y. 2002.** Les carotenoides. Québec Pharmacie, 48(9): 800-804.

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

**Dworkin Martin., Stanley Falkow., Eugene Rosenberg., Karl-Heinz Schleifer.et Erko Stackebrandt. 2006.** The Prokaryotes. *Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer Science & Business Media, (3): 1-1185.

E

**Elez-Martinez P. et Martin-Belloso O. 2007.** Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*, 102 (1) : 201-209.

**Elmastaş M., Gülçin I., Işildak Ö., Küfrevioğlu Ö. İ., İbaoğlu K., et Aboul-Enein H. Y. 2006.** Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, (3): 258-266.

**Ersus S. et Cam M. 2007.** Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits. *Chemistry of Natural Compounds*. 43 (5): 607-609.

**Essawi T. et Srour M. 2000.** Screening of some Plesinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacol*, 70 (3) : 343-349.

F

**FAO. 2005.** Food and Agricultural Organisation.

**Favier A. 2003.** Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.

G

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

**Ghedira K. 2005.** Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques. Rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4) : 162-169.

**Gilica M., Stoian I., Atanasiu V. et Virgolici B. 2007.** The oxidative hypothesis of senescence. *Journal of postgraduate medicine*, 53 (3): 207.

**Goodner K.L., Rouseff R.L. et Hofsommer H.J. 2001.** Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49 (3) : 1146-1150.

**Gorinstein S., Martin-Belloso O., Park Y. S., Haruenkit R., Lojek A., Caspi A., Libman I. et Trakhtenberg S. 2001.** Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74(3): 309-315.

**Guimarães R., Barros L., Barreira J. C., Sousa M. J., Carvalho A. M., et Ferreira, I. C. 2010.** Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1) : 99-106.

**H**

**Hadj Sahraoui M.K. 2007.** Mesures de développement des agrumes. Agriculture et développement rural durable.

**Hannebelle T., Sahpaz S. et Bailleul F. 2004.** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1) : 3-6.

**Havsteen B. H. 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96 (2): 67-202.

**Houee- Levin C., Sicerd-Roselli C. et Berges J.L. 2005.** Chimie et biochimie radicalaire. Edition-belin.

**Huang D., Chen H.J., Lin C.D. et Lin Y.H. 2005.**Antioxydant and antiproliferative activities of water spinach (ipomoea aquaticaforsk) constituents. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46: 99-106.

**Huang R., Xia R., Lu Y. et Wang M. 2007.** Antioxydant activity and oxygen- scavenging system in orange pulpe during fruit ripening and maturation. *ScientiaHorticulturae*, 113 (2): 166-172.

**I**

**Isabelle Escartin. 2011.** Guide des agrumes, découvre le chemin des plantes. Institut KLORANE, protéger explorer éduquer, 13.

**Izuagie A.A. et Izuagie F.O. 2007.** Iodimetric Determination of ascorbic acid (Vitamin C) in citrus fruits. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(5): 367-369.

**J**

**Jayaprakasha G.K. et Patil B. S. 2007.** In vitro evaluation of the antioxydant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*, 101 (1) : 410-418.

**Jean A., Jacques P. et Regine F. 2003.** La science alimentaire de A à Z (chaire de biochimie industrielle et agroalimentaire conservatoire National des Arts et Métiers). Lavoisier, 3<sup>ème</sup> édition, 57-58.

**Jean-Marie P. 2008.** La culture des agrumes. Edition : ARTEMIS.

**Jungkind D. L. 1995.** Antimicrobial resistance: a crisis in health care;[based on the proceedings of the Eastern Pennsylvania Branch of the American Society of Microbiology Symposium on Antimicrobial Resistance: a crisis in health care—Clinical laboratory and epidemiologic considerations.

K

- Kafkas E., Ercisli S., Kemal K. N., Baydar K., et Yilmaz H. 2009.** Chemical composition of blood orange varieties from Turkey: A comparative study. *Pharmacognosy Magazine*, 5(20) : 329.
- Karadeniz F. 2004.** Main organic acide distribution of authentic citrus juice in Turkish. *Journal of agriculture and forsty*, 28: 267-271.
- Kato M., Ikoma Y., Matsumoto H., Sugiur M., Hyodo H., et Yano, M. 2004.** Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*, 134(2) : 824-837.
- Kaufmann SHE. 1997.** Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin, 345.
- Khan I., Shan Z.A., Saeed M. et Shan H.U. 2010.** Physicochemical analysis of *citrus sinensis*, *citrus Reticulate* and *citrus paradise*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 32(6): 774-780
- Kimball D.A. 1999.** Citrus processing, a complete guide, second edition. Kimball D.A., Ed. Gaithersburg. An Aspen publication.
- King A.M.Y, et Young G. 1999.** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99: 213-218.
- Klimczak I., Malecka M., Szlachta M. et Gliszczynska- Swiglo A. 2007.** Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (3) : 313-322.
- Koechlin-Ramonotxo C. 2006.** Oxygène, stress oxidant et supplimentationsantioxydantes ou un aspect different de la nutrition dans les maladies respiratoire. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 (4) : 165-177.
- Kohl P. 2005.** Travaux pratiques de physique pour techniciens supérieurs chimistes.
- Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. et Sripal R. 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol*, 33 (1) : 2-16.
- Kuda T., Tsunekawa M., Hishi T. et Araki Y. 2005.** Antioxidant properties of dried « kayamo- nori », a brown alga *Scytosiphonlomentaria* (Scytosiphonales, phaeophyceae), *Food Chemistry*, 89 (4) : 617-622.

**Kumar R.S., Sivakumar T., Sundream R.S., Gupta M., Mazumdar U.K., Gomathi P., Ajeshwar Y., Saravanan S., Kumar M.S., Muruges K. et Kumar K.a. 2005.** Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa*L. Stem bark. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, 38 (7) : 1015-1024.

## L

**Ladaniya M. S. 2008.** Citrus fruit: biology, technology and evaluation San Diego: Academic, 198.

**Lagha-Benamrouche. S et Madani. K. 2013.** Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis L.* and *Citrus aurantium L.*) cultivated in Algeria:Peels and leaves. *Industrial Crops and products*, 50 :723– 730.

**Lapornik B., Prosek M. et Wondra A.G. 2005.** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71 (2) : 214-222.

**Lee J., Koo N. et Min D.B. 2004.** Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1) : 21-33.

**Leroy J.F. 1968.** Les agrumes. In: les fruit tropicaux et subtropicaux. Ed. presses Universitaires de France, 61-77.

**Li H., Wang X., Li Y., Li P. et Wang H. 2009.** Polyphenolic compounds and antioxydant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112 (2) : 454-460.

**Lu D., Cao Q., Li X., Cao X., Luo F., et Shao W. 2009.** Kinetics and equilibrium of Cu (II) adsorption onto chemically modified orange peel cellulose biosorbents. *Hydrometallurgy*, 95(1) : 145-152.\*

**Lucheta A. R., Soliva-Pinhati A. C., Basilio-Palmieri A. C., Berger I. J., Freitass-Astua J. et Cristofany M. 2007.** An in silico analysis of the key genes involved in flavonoid biosynthesis in *Citrus sinensis*. *Genetic and MolecularBiology*, 30(3): 819-831.

## M

**Macheix J. J., Fleuriet A., et Jay-Allemand C. 2005.** *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.* PPUR Presses polytechniques.

**Manner Harley I., Buker Richard S., Easton Smith V., Ward Deborah. Et Elevitch Craig R. 2006.** *Citrus (citrus) Fortunella (kumquat). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, 2: 1-35.

**Marsh k., Ernery, Gonzalez P et Echeverria E. 2003.** The H<sup>+</sup> translocating vacuolar pyrophosphatase in acidless citrus cultivars. *In Proceedings of the international society of citriculture, 9<sup>th</sup> congress 2000 orlando, Florida*, 672-673.

**Mau J., Tsai S. Y., Tseng Y. H. et Huang S. J. 2005.** Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma* species. *Food Chemistry*. 93 (4) :641-649.

**MeotDuros L., Gaetan G.L. et Magné C. 2008.** Radical scavenging, antioxidant and antimicrobial activities of halophytic species. *Journal of Ethnopharmacology*. 116 (2) : 258-262.

**Messaoudi S. 2005.** Les plantes médicinales. Edition Dar et Maarifa.

**Milardovic S., Ivekovic D. et Bozidar S.G. 2006.** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 68 (2) : 175-180.

**Mohammedi Z. et Atik F. 2011.** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarixaphylla* (L.) karst., 609-615.

**Molyneux P. 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*, 26 (2): 211-219.

**Muanda F. N. 2010.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat en chimie organique, Université Paul Verlaine-Metz, 88-89.

**Muhammad K.K. 2010.** Polyphénols d'Agrumes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec le sérum albumine. Académie d'Aix-Marseille, Université d'Avignon.

**Muthiah P.I. 2012.** In vitro antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of citrus. *International Journal of Phytopharmacy*, 2 (1): 13-20.

## N

**Nisha P., Nazar P.A. et Jayamurthy P. 2009.** A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (10) : 2640-2644.

O

**Ordenez A.A.L., Gomez J.D., Vattuone M.A. et Isla M.I. 2006.** Antioxydant activities of sechium edule (Jacq). Swartz extracts. *Food Chemistry*, 97 (3) : 452-458.

**Ortuno A., Baidez A., Gomez P., Arcas M.C., Porrás I., Garcia-Lidon A. et Del Rio J.A. 2006.** *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids. Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*. 98 (2) : 351-358.

**Otero R., Nu-Nez V., Barona J., Fonnegra R., Jimenez S.L., Osorio R.G., Saldarriaga M. et Diaz A. 2000.** Morsures des serpents et ethnobotanique dans la région nord-ouest de la Colombie. Partie III. Neutralisation de l'effet hémorragique de *Bothrops atrox* venibn. *Journal des Ethnophar-logie*, 73 : 233-241.

**Owen P.L. et Johns T. 1999.** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern northamérican plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64 (2) : 149-160.

P

**Pailly O., Tison G et Amouroux A. 2004.** Harvest time and storage conditions of "star ruby" grape fruit (*Citrus paradise Macf.*) for short distance summer consumption. *Postharvest biology and technology*, 34 (1) : 65-73.

**Papas A.M. 1998.** Vitamin E : Tocopherols and Tocotrienols. In : Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. Ed. CRC Press, 189-210.

**Pastre J., Priymenko N. 2007.** Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Médecine Vétérinaire* 1(4) :180-189.

**Pelli K. et Lyly M. 2003.** Les antioxydants dans l'alimentation. Ed. INRA, 4-17.

**Percival SL. 2004.** Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 480.

**Peterson J.J., Dwyer J.T., Beecher G.R., Bhagwet S.A., Gebhardt S.E., Haytowitz D.B. et Holden J.M. 2006.** Flavanones in orange, tangerines (mandarine), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: S66-S73.

**Pietta P. G. 2000.** Flavonoïdes as Antioxidants. *Journal of Natural products*, 63 (7) : 1035-1042.

**Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O. 1999.** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : importance en matière de prévention. *Cancérologie*, 95, 1-4.

**Polese J.M. 2008.** Culture d'agrumes. Edition artémis.

**Prieto P., Pineda M., et 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 (2) : 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.

## R

**Ramful D., Bahorun T., Bourdon E., Tarnus E. et Aruoma O.I. 2010.** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278 (1) :75–87.

**Rangana, S.; Govindrajan, V. J. et Ramana K. V. R. 1983.** Citrus Fruits - Varieties. Chemistry, Technology, and Quality Evaluation. Part II: Chemistry, Technology and Quality Evaluation. A: Chemistry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18 (4): 313-386.

**Rapisarda P., Lo Bianco M., Pannuzzo P. et Timpanaro N. 2008.** Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* L. Osbeck]. *Postharvest Biology and Technology*, 49 (3) : 348-354.

**Ribeiro S.M.R., Barbosa L.C.A., Queiroz J.H., Knodler M. et Schieber A. 2008.** Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Food Chemistry*, 110 (3) : 620-626.

**Ribéreau-Gayon P. 1968.** *Les Composés phénoliques des végétaux: par Pascal Ribéreau-Gayon,...* Dunod, 23.

**Robards K. 2003.** Strategies of the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A* 1000 (1) : 657-691.

**Robards K. et Antolovich M. 1997.** Analytical Chemistry of fruit Bioflavonoids. *Analyst*, 122 (2) : 11R-34R.

**Robards K., Prenzler D.p., Tucher G., Swatsitang P. et Glover W. 1999.** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66 (4) : 401-436.

**Rochefort D. 1793.** Cours Elementaire de Matière Médical suivi d'un précis de l'Art et Formuler. Méquignon (Paris), 386: 84-87.

**Rodriguez-Amaya D.B. 2001.** A guide to carotenoid analysis in foods. *International LifeSciences Institute press*, 1-71

**Rose R. C. et Bode A.M. 1993.** Biology of free radical scavengers : an evaluation of ascorbate. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7 (12) :1135-1142.

S

**Salunkhe D.K. et Kadam S.S. 1995.** Botany. In : Handbook of Fruit Science and Technology : Production, Composition, Storage, and Processing. Ed. CRC Press, 41-42.

**Sarni-Manchad P., et Cheynier V. 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire, Éd Tec & Doc. *Coll. Sci. & Techn. Agroaliment., Lavoisier, Paris*, 10.

**Singleton V.L. et Rossi J.A. 1965.** Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdophosphotungstic acids reagents. *American Journal of Enology and viticulture*, 16 (3) : 144-158.

**Skerget M., Kotnik P., Hadolin.M., Hras A.R., et SimonicM., Knez Z. 2005.** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89 (2) : 191-198.

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

**Sousi S.W., Fachmann W. et Kraut H. 1994.** Fruits. In : « la composition des aliments » 5<sup>ème</sup> édition. Ed. CRC Press, 801-980.

**Stahl W. et Sies H. 2003.** Antioxydant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24 (6) : 345-351.

**Susser A. 1997.** The Great Citrus Book: A Guide with Recipes. Ed. Ten Speed Press, 1-160.

T

**Tanguy M. et Begué-Simon A.M. 2009.** Antioxydants Première partie : Les antioxydants dans l'alimentation. *Médecine*, 5 (6):256-260.

**Tapiero H, Tew KD, Nguyen Ba G et Mathé G. 2002.** Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomédecine et Pharmacothérapie*, 56 (4) : 200-207.

**Tenscher E., Anton R. et Lobstein A. 2005.** Agrumes. In : Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec et Doc, 77.

**Tepe B., Eminagaoglu O., Akpulat H.A. et Aydin E. 2007.** Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *Verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *Amaciaca* (Freyen & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 100 (3) : 985-989.

**Tripoli E., La Gardia M., Giammanco S., Di Majo D. et Giammanco M. 2007.** Citrus flavonoids : Molecular structure, biological activity and nutritional proprieties. A review. *Food Chemistry*, 104 (2) : 466-479.

U

**Urquiaga I. N. E. S. et Leighton F. E. D. E. 2000.** Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research*, 33 (2) : 55-64.

V

**Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M.T.D., Mazura M. et Telser J. 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39 (1) : 44-84.

**Van Antwerpen P. 2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : ciblage du système myloperoxydase / peroxyde d'hydrogène/ chlorure. Thèse de Doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université libre de Bruxelles, 221.

W

**Wang Y.C., Chuang Y.C. et Hsu H.W. 2008.** The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106 (1) : 277-284.

X

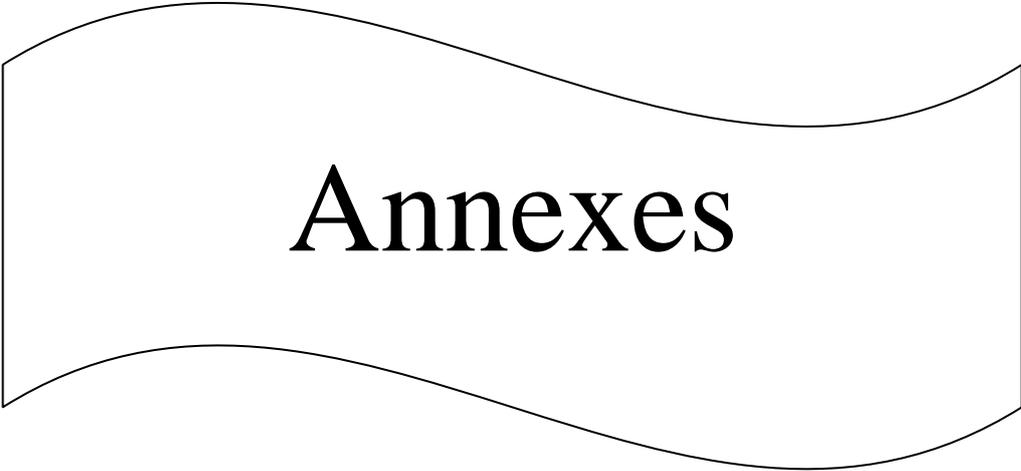
**Xu G., Liu D., Chen J., Ye X., Ma Y. et Shi J. 2008.** Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106 (2) : 545-551.

Z

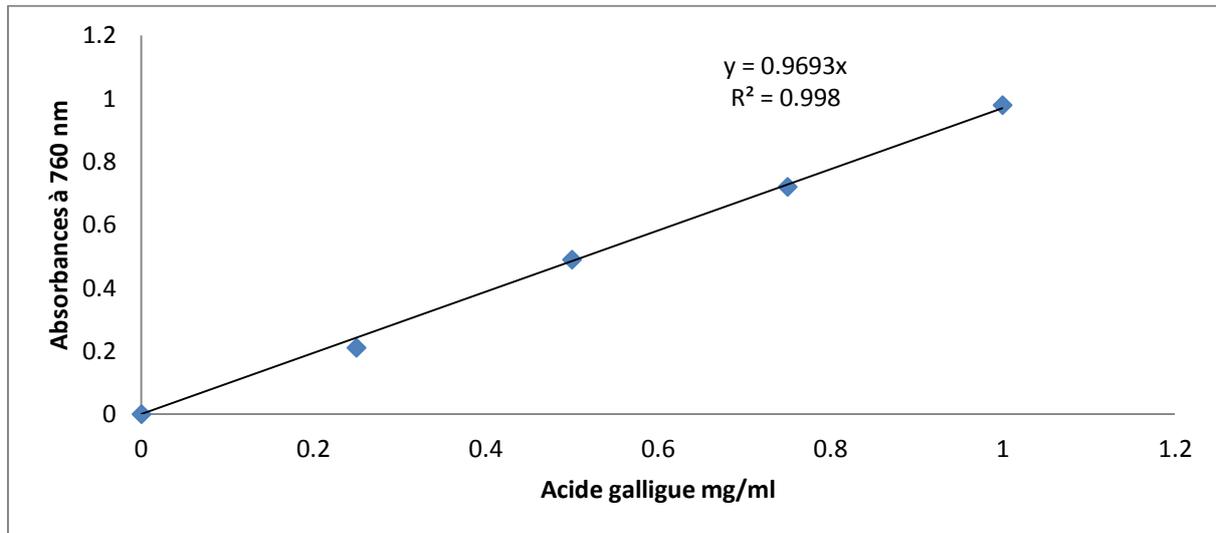
**Zadernowski R., Czaplicki S. et Nacz M. 2009.** Phenolic acid profiles of mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 112 (3) : 685-689.

**Ziaur Rahman. 2006.** Citrus peel extract, a natural source of antioxidant. *Food Chemistry*, 99: 450-454.

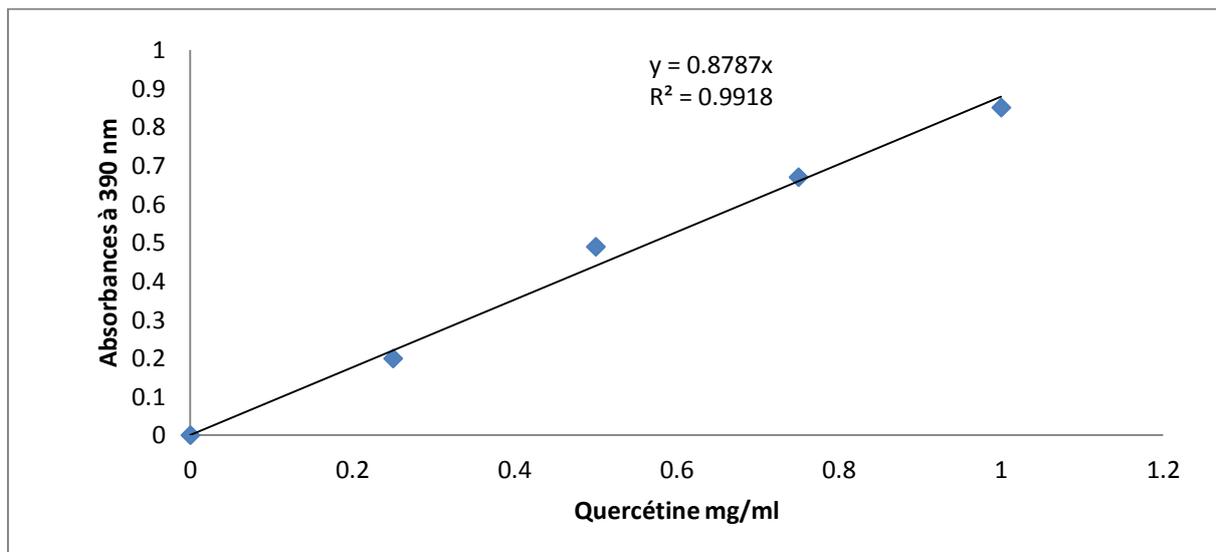
**Ziena H.M.S. 2000.** Quality attributes of Bearss seedless line (*Citrus latifolia tan*) juice during storage. *Food chemistry*, 71 (2) :167-172.



# Annexes



**Figure 21 :** Courbe d'étalonnage des polyphénols



**Figure 22 :** Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

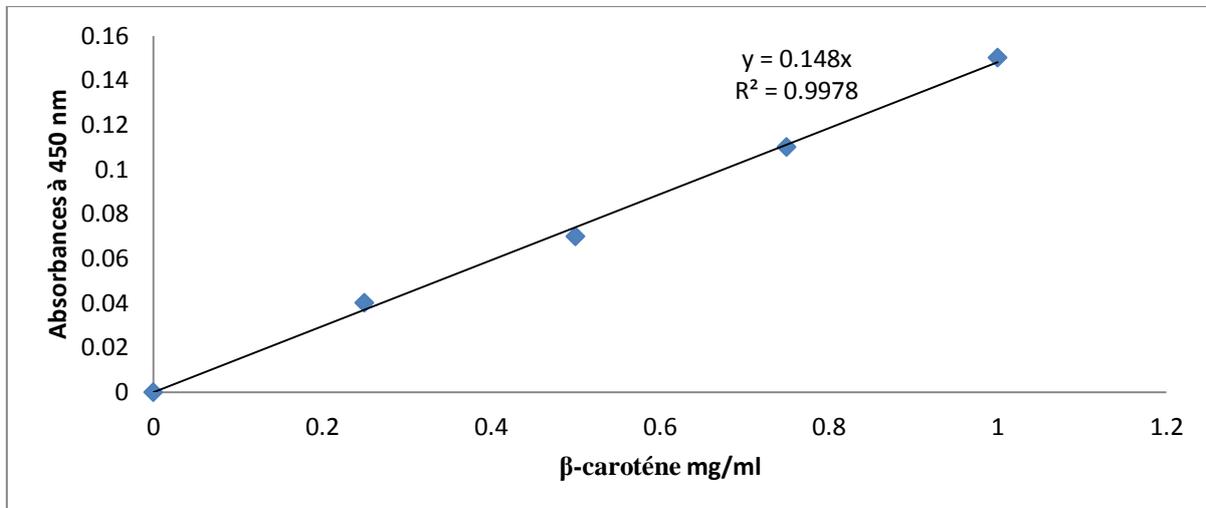


Figure 23 : Courbe d'étalonnage des caroténoïdes

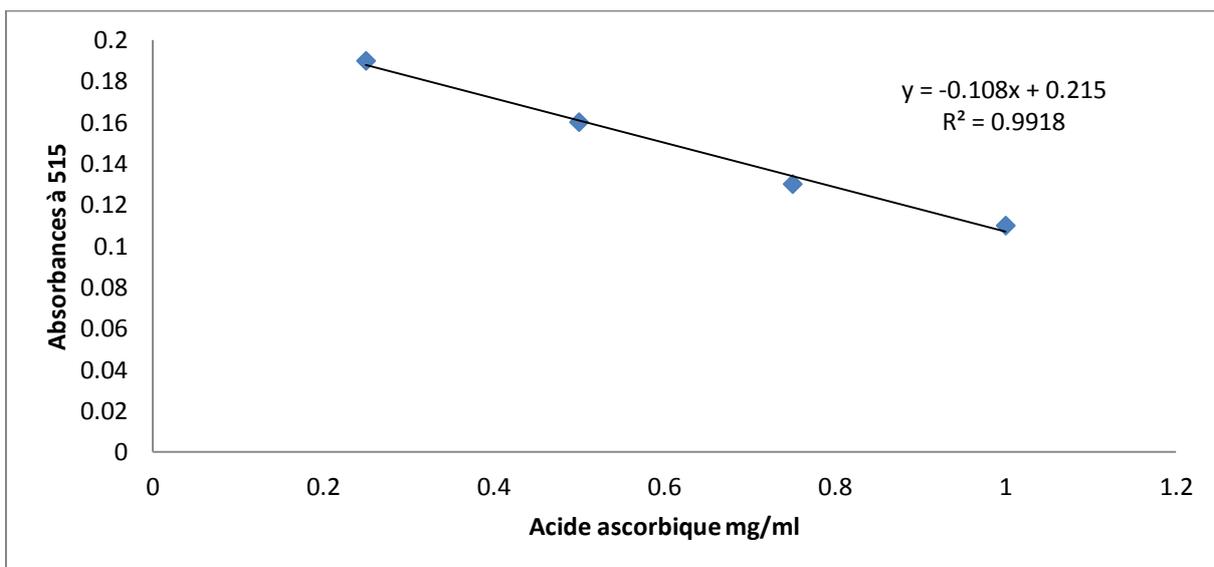


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

**Résumé :** Les travaux menés dans notre étude ont permis de doser les antioxydants et d'évaluer l'activité antioxydante et antibactérienne, des écorces, feuille, pépins et jus de l'orange amère ainsi les propriétés physico-chimiques du jus. L'extraction de ces principes actifs est faite par le méthanol pur.

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, la teneur la plus élevée est de  $1463,71 \pm 0,35$  mg EAG/100g MS, enregistrée par l'extrait de pépins. Les flavonoïdes quant à eux, ont été évalués en utilisant la méthode  $AlCl_3$ , les teneurs enregistrées varient entre  $1194,63 \pm 0,91$  mg EQ/100g de MS et  $478,99 \pm 1,56$  mg EQ/100g de MS. L'extraction des caroténoïdes avec de l'hexane a donné un rendement important,  $50,68 \pm 1,13$  mg E de  $\beta$ -carotène/g de MS sont donnés par l'extrait de feuilles. Le dosage d'acide ascorbique de jus de la bigarade a révélé une teneur de  $259,07 \pm 6,24$  mg EAA/100ml de jus.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par trois méthodes citant le pouvoir réducteur, la neutralisation de radical DPPH et le Test de phosphomolybdate d'ammonium. L'ensemble des extraits présentent différentes activités. Alors que les résultats de l'activité antimicrobienne des différents extraits de l'orange amère montrent que ce fruit peut inhiber la croissance de cinq germes microbiens à savoir : *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et *Candida albicans*, la meilleure activité est enregistrée par l'extrait des écorces envers *E. coli* et *Listeria innocua* et l'extrait des feuilles envers *Candida albicans* avec un diamètre de la zone d'inhibition de 20,20 et 19 mm respectivement.

**Mots clés :** Agrumes, bigarade, antioxydants, caroténoïdes, composés phénoliques, flavonoïdes, activité antioxydante.

**Abstract:** The work carried out in our study allowed to quantify the antioxidants and to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of barks, leaves, seeds and juice of bitter orange as well as the physicochemical properties of the juice. The extraction of these active compounds was carried out using pure methanol.

The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, the highest content being  $1463.71 \pm 0.35$  mg EAG / 100 g MS, recorded by the seed extract. The flavonoids were evaluated using the  $AlCl_3$  method and the recorded contents ranged between  $1194.63 \pm 0.91$  mg EQ / 100 g DM and  $478.99 \pm 1.56$  mg EQ / 100 g DM, extraction of carotenoids with hexane gave an important yield,  $50.68 \pm 1.13$  mg E of  $\beta$ -carotene / g MS were shown in the leaf extract. The ascorbic acid content of sour orange juice revealed a value of  $259.07 \pm 6.24$  mg EAA / 100 ml of juice.

The antioxidant activity of the various extracts was evaluated by three methods, namely the reducing power, the DPPH radical neutralization and the ammonium phosphomolybdate test. All the extracts present different activities. While the results of the antimicrobial activity of the different bitter orange extracts showed that this fruit can inhibit the growth of five microbial germs namely *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* resistant to methicilline (SARM) and *Candida albicans*, the best activity was recorded by the bark extract towards *E. coli* and *Listeria innocua* and the extract of the leaves towards *Candida albicans* with a diameter of the inhibition zone of 20, 20 and 19 mm respectively.

**Keywords:** Citrus, bitter orange, antioxidants, carotenoids, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity.