

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème

**Activité antioxydante des
extraits d'écorce et de pulpe de
Citrus limon et *Citrus sinensis***

Présenté par : TIGRINE Nadir

Soutenu le : 12/06/2016

Devant le jury composé de :

M ^{me} Kara. S	MAA	Présidente
M. BASLI. A	MCB	Pomoteur
M ^{elle} Ayouni. K	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Je remercie Dieu, le tout puissant de ma avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.

*Je tien particulièrement à remercier mon promoteur, **M. BASLI abdelkader**.*

Pour avoir accepté da mon encadrer, pour orientation et ces conseil qu'elle mon a prodigué tout au long de ce travail.

*Je tien à remercier à mes deux amies proche **Nawel** et **Sonia**, pour son aide, ces encouragements et ces conseils.*

Je remercie chaleureusement les membres de jury :

***M^{elle} Ayouni** et **M^{me} Kara** pour l'intérêt qu'ils ont manifesté envers mon travail en acceptant de l'évaluer.*

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude et mes remerciements à tous le personnel Existés pendant le travail en laboratoire d'enzymologie, pour leurs orientations, leurs conseils et leurs disponibilités tout au long de la réalisation de mon travail

Merci pour tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre mon travail

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes très chers parents qui m'ont soutenu depuis toujours. C'est grâce à eux
que je suis aujourd'hui au stade final de ma formation.*

*Mes frères khaled,riad et fahim, auxquels je souhaite une très bonne
continuité et réussite dans la vies.*

Mes sœurs : souhila, Nadira et soraya que j'aime beaucoup.

Mes amies proches sonia et nawel

A ma tendre LAMIA

*Mes amis de toujours : saadi, brahim, Naim, aimad, islam, mounir, aamar,
anis, azeddine, koukou,nourdine, samir, djemaai, atman, rabbah, mustapha,
abderzak, mouloud, boubker, toufik, amirouche, naim, nabil, soufiane, salim,
dazahir,dakhidher, dasadhek, damarzouk, dabousghir, daboukhalfa,
dalbachir, dahmed, safia ,souraya, sonia, leila, sghira, chafiaa, wissem,
sonia, nadia, thellili.....*

Toute la promotion de pharmacologie moléculaire.

Tous ceux qui me sont chers.

Nadi

Liste des abréviations

Abs: Absorption

ABTS: 2, 2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid

ADN: Acide ribonucléique

AGMI: Acide gras monoinsaturé

AGPI: Acide gras poly-insaturé

Al³⁺: anion d'aluminium

AlCl₃: Trichlorure d'aluminium

BHA: Butylated hydroxyanisole

Cl⁻: anion chlorique

Cu⁺: anion de cuivre

CYP450: cytochromes de type 450

IC₅₀: Concentration Inhibitrice 50

D.O: Densité Optique

DPPH: radical 1, 1-Diphényl-2 picrylhydrazyl

e⁻: électrone

EAG/gMS: Equivalent d'Acide Gallique par gramme de Matière Sèche

EQ/gMS : Equivalent de Quercitine par gramme de Matière Sèche

ERO : Espèces Réactives de l'oxygène

ERN : Espèce Réactives d'azote

Fe²⁺: anion de fer

FeCl₂: chlorure de fer

PI% : Pourcentage d'Inhibition

H⁺: anion d'hydrogène

H₂O₂: eau oxygénée

INRAA : Institut National des Recherches Agroalimentaire des Agrumes

K₂S₂O₈ : persulfate de potassium

LOOH : hydroperoxyde

mL : millilitre

mM : millimolaire

Min : minute

MPO : myeloperoxydase

Na₂CO₃: Carbonate de sodium

nm: nanometre

NH₂: groupements amines

NO: Oxyde nitrique

NOS : oxyde nitrique synthétase

O^{o-2}: Radical anion superoxyde

OH^o: Radical hydroxyl

ONOO^o: Radical perxynitrite

R: rendement

RL : Radicaux Libres

RO^o: Radical alcoyle

ROO^o: Radicaux libres peroxylés

ROS: Reactive oxygen species

TCA: Acide trichloroacétique

TROLOX: 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

UV : Ultraviolet

µg : Microgramme

% : pourcentage

Liste des Figures

Figure 01: Structures chimiques des acides phénoliques.....	15
Figure 02: Structure générale des flavonoïdes.....	16
Figure 03: Piégeage des ROS (R^*) par les flavonoïdes.....	17
Figure 04: Structure chimique des tannins condensés(a) et des tannins hydrolysables(b).....	18
Figure 05: Morphologie de deux variétés analysées.....	22
Figure 06: schéma du protocole d'extraction des composés phénoliques	24
Figure 07: piégeage du radical libre DPPH*	27
Figure 08: Taux d'extraction des polyphénols des quatre échantillons de citrus.....	31
Figure 09: les teneurs en polyphénols totaux dans les quatre extraits de <i>citrus limon</i> et de <i>citrus sinensis</i>	32
Figure 10: Teneurs en flavonoïdes dans les parties écorce et pulpe de citron et d'orange.....	33
Figure 11: Evaluation de pouvoir antiradicalaire DPPH en fonction des concentrations des extraits de <i>citrus limon</i> et <i>citrus sinensis</i>	34
Figure 12: variation de l'inhibition de l'ABTS ^{o+} en fonction des concentrations des extraits.	36
Figure 13: pourcentage d'inhibition du radical NO en fonction de différentes concentrations des extraits de <i>citrus limon</i> et <i>citrus sinensis</i>	38
Figure 14 : les variations des absorbances de citrus en fonction de jours.....	40
Figure 15: histogrammes de l'inhibition de peroxydation lipidique de l'acide linoléique en présence des différents extraits de citrus.....	40

Liste des Tableaux

Tableau I: les caractéristiques générale de <i>citrus sinensis</i>	4
Tableau II: Principaux composés de l'orange.....	5
Tableau III: les caractéristiques générales de <i>citrus limon</i>	6
Tableau IV: Composition biochimique moyenne du citron.....	7
Tableau V: Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe.....	16
Tableau VI: les résultats des IC ₅₀ pour le test DPPH.....	35
Tableau VII: les valeurs de Trolox des différents extraits de citrus.....	37
Tableau VIII: Les valeurs IC ₅₀ du piégeage du radical NO par les différents extraits de citrus et les standards.....	38

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01

CHAPITRE I: SYNTHES BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur les Citrus

I.1.1. Caractères généraux.....	03
I.1.2. Historique.....	03
I.1.3. Définition.....	03
I.1.4. Quelques espèces de Citrus.....	04
I.1.4.1. L'orange.....	04
I.1.4.2. Le citron.....	06
I.1.5. Effets thérapeutiques des Citrus.....	08

I.2. Les oxydants et les antioxydants des Citrus

I.2.1. Radicaux libres.....	08
I.2.2. Les types des radicaux libres.....	09
I.2.2.1. L'espèce réactive d'oxygène (ROS).....	09
I.2.2.2. L'espèce réactive d'azote (RNS).....	11
I.2.3. L'effet des radicaux libres sur les molécules biologiques.....	11
I.2.4. Le système antioxydant des agrumes.....	13
Composés phénoliques.....	14

I.2.5. Activités biologiques des polyphénols.....	19
I.2.5.1. Activité antioxydante.....	19
I.2.5.2. Autres propriétés pharmacologique.....	20

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1. Echantillonnage.....	22
II.1.1. Traitement des échantillons.....	23
II.2. Extraction et dosage des polyphénols.....	23
II.2.1. Extraction.....	23
II.2.1.1. Macération.....	23
II.2.1.2. Délipidation.....	23
II.2.1.3. Fractionnement.....	24
II.2.2. Dosage des composés phénoliques.....	25
II.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	25
II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	26
II.3. Mesure de l'activité antioxydant.....	26
II.3.1. Evaluation du pouvoir antiradicalaire.....	26
II.3.1.1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	26
II.3.1.2. Test d'ABTS.....	28
II.3.1.3. Test de l'activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO).....	29
II.3.2. Mesure de l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique.....	29
II.3.3. Analyses statistique.....	30

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Le taux d'extraction.....	31
III.2. Dosage des composés phénoliques.....	32
III.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	32

III.2.2. Dosage des flavonoïdes	33
III.3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	34
III.3.1. Evaluation de pouvoir antiradicalaire DPPH.....	34
III.3.2. Activité scavenging du radical ABTS ^{•+}	36
III.3.3. Activité de piégeage du radical NO.....	38
III.3.4. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	39
Conclusion.....	42
Références bibliographiques.....	44
Annexes	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La médecine traditionnelle demeure le recours principal d'une grande majorité des populations pour résoudre leur problème de santé, du fait qu'elle constitue un élément important du patrimoine culturel. Selon l'organisation mondiale de la santé, près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (**OMS, 2002**). Le stress oxydatif est impliqué dans un large spectre de maladies qui ont un impact énorme sur la santé des populations.

Ces maladies à l'origine du stress oxydatif sont dues généralement suite à la production excessive des espèces réactive d'oxygène (ERO) et les espèces réactive d'azote (ERN) qui pourraient devenir toxiques pour les composants majeurs de la cellule ; les lipides, les protéines et les acides nucléique (**Valko et al., 2006**). Ceci provoquerait un dysfonctionnement cellulaire et serait impliqué dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) et le processus de vieillissement (**Aruoma, 2003**).

Un grand nombre d'études scientifiques ont été menées pour découvrir les propriétés fonctionnelles des composés d'origine végétale, antioxydant ou autres, qui pourraient être efficaces pour la santé (**Tumbas et al., 2010**). De nombreux travaux réalisés sur différentes espèces de citrus ont montré qu'elles contenaient en majorité des composés phénoliques ayant un fort potentiel antioxydant corroborant leurs usages traditionnels. Parmi toutes ces espèces l'orange « *Citrus sinensis* » et le citron « *Citrus limon* » sont populaire par leur richesse en vitamine C, des quantités considérables de composés phénoliques tels que les flavonoïdes et de caroténoïdes sont identifiées (**Del Rio et al., 2004**).

C'est dans ce contexte, que notre travail de mémoire s'inscrit, visant à étudier les composés phénoliques des fruits de ces deux espèces de citrus, et de tester leur pouvoir antioxydant afin d'expliquer la marge thérapeutique de ces métabolites sur l'organisme.

De ce fait, la thématique du travail que nous avons opté porte sur l'évaluation de l'activité antioxydante et l'effet de l'inhibition de la peroxydation lipidique des écorces et des pulpes prélevés de « *Citrus limon* » et *Citrus sinensis* ». Ce travail a été structuré comme suit :

INTRODUCTION

- Un premier chapitre sur une synthèse bibliographique comportant une partie consacrée à la présentation générale sur les agrumes, une autre partie présentant l'activité antioxydante
- Un deuxième chapitre comportant la partie pratique, consacré à l'extraction éthanolique et dosage des composés phénolique dont les polyphénols totaux et les flavonoïdes, ainsi que l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante par les tests anti-radicalaire (DPPH, ABTS, NO) et le test anti-péroxydation lipidique.
- Un troisième chapitre présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. GENERALITES SUR LES CITRUS

1. CARACTERES GENERAUX

Les agrumes (nom masculin, de l'italien *agrumi*, de l'ancien français « aigruns » signifiant « fruits aigres ») sont les fruits des végétaux des genres *Citrus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* et *Poncirus* (famille des *Rutaceae*), parmi lesquels on trouve les citrons, les clémentines (en réalité un hybride de deux espèces : la mandarine et l'orange douce), les kumquats, les bergamotes, les limes, les limettes, les mandarines, les oranges, les pamplemousses, les pomelos, les tangerines, les combavas, les yuzus et les cédrats.

2. HISTORIQUE

L'histoire des agrumes, d'après **Webber et al., (1967)** remonte à 4000 ans avant J-C. où le cédratier a poussé en Mésopotamie. La plupart des types d'agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour des montagnes de l'Himalaya et du sud-est asiatique.

La première mention écrite sur les agrumes se trouve dans la littérature sanskrit environ 800 ans avant J-C. la culture des agrumes a commencé en chine probablement 500 ans avant J-C. le cédrat est le premier agrume introduit en Europe par Théophraste en 310 ans avant J-C. Alors que le dernier agrume avoir arrivé en Europe fut le mandarinier au début du 19^{ème} siècle. Depuis lors, il est devenu l'un des agrumes les plus populaires et une source de développement continu (**Bousbia et al., 2009**).

3. DEFINITION

Les agrumes sont des petits arbres ou arbustes, dont la taille peut varier de 2 à 10 mètres de haut suivant les espèces. Leur frondaison est généralement dense et leurs feuilles sont persistantes, à l'exception des *Poncirus*. Leurs fruits et toutes les parties de l'arbre (écorce, feuilles, branches, et fleurs) contiennent des glandes à essence.

La peau du fruit est une écorce (péricarpe) composée de deux couches concentriques. La couche superficielle, rugueuse et résistante, de couleur vive souvent jaune orangé sous l'action des flavonoïdes, est nommée épicarpe ou flavedo ou encore zeste en cuisine. La couche interne, blanche et spongieuse, est le mésocarpe ou albédo.

La pulpe est composée de quartiers juteux contenant les pépins. Elle est riche en vitamine C.

Ce sont des fruits non-climactériques qui doivent être récoltés à maturité. Ils sont résistants au transport et à la conservation. Si les fruits sont assez aisés à différencier sur le plan culinaire, la distinction des espèces botaniques est en revanche complexes, car les différentes espèces s'hybrident très facilement et sont difficiles à fixer. Le genre *Citrus* ne contiendrait finalement pas plus de onze espèces (**Bénédicte et Michel, 2011**).

4. QUELQUES ESPECES DE CITRUS

4.1. L'ORANGE

L'oranger est un arbre, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé. La floraison blanche très parfumée, les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange. Il existe plusieurs variétés les plus connues la Sanguine, Thomson navel, valencia latté, Washington navel Powell, Florida pineapple, orange portugaise etc.... (**LOUSSERT, 1989**).

Les caractéristiques généraux de l'espèce *citrus sinensis* sont récapitulées dans le tableau I

Tableau I : les caractéristiques généraux de *citrus sinensis* (**Bénédicte et Michel, 2011**)

espèce	Variété	Caractéristiques générales
<i>Citrus sinensis</i>	Washington Navel	<ul style="list-style-type: none">• Aspect général : arbre au port harmonieux et croissance rapide, il peut atteindre de grande taille en pleine terre (7 à 8m)• Fleurs : blanches et immaculées, très parfumées.• Feuilles : vert profond, légèrement ailées.• Fruits : de forme et de coloration variable en fonction des différents groupes auxquelles ils appartiennent. La pulpe juteuse diffère en couleur et en acidité selon les variétés.

➤ Classification

Taxonomiquement, les oranges douces appartiennent à :

Ordre : Sapindales

Sous-ordre : des géraniiineae,

Classe : des dicotyledoneae

Famille : Rutaceae

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus sinensis*

➤ Composition chimique et valeur nutritive d'orange

L'orange contient de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C, vitamines P, B₁, B₉, E, provitamine A. Riche en calcium, riche en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile (levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion (**Bousbia, 2011**)

Les principaux composés de l'orange sont résumés dans le Tableau II.

Tableau II : Principaux composés de l'orange (**Anonyme, 2007**)

Constituants	Teneurs
Glucides	8.5 à 12 % dans le fruit à maturité, représenté par le saccharose (40 %). Fructose et glucose
Acides organiques	1.2 %, surtout de l'acide citrique et de l'acide malique
Autres composés	Lipides concentrés dans les pépins peu de protéines
Energétiques	
Vitamines	Teneur élevée en vitamine C (40 à 80 mg pour 100g). Vitamines hydrosolubles qui sont toutes des vitamines du groupe B (B1 et B9, en particulier), vitamine A (0.05 à 0.2 mg pour 100g), vitamine E (0.24mg pour 100g).
Minéraux	Calcium, Magnésium, Potassium et Phosphore
Oligo-éléments	Fer, Cuivre, Zinc, Manganèse, Nickel, Iode, trace de Bore et de Sélénium
Fibres	Une teneur de 2.4 % en moyenne, elles ont l'originalité d'être riches en

	pectine (environ 50 %)
Flore mésophile	Levures et lactobacilles indispensables à sa bonne digestion
Substances aromatiques	Ce sont des composés complexes caractéristiques de ce fruit (aldéhydes, esters... etc.), des essences odorantes
Pigments	Donnent à la pulpe sa couleur plus ou moins marquée jaune orangé pour les flavonoïdes et les caroténoïdes, jaune pour les xanthophylles, rouge ou rouge violacé pour les anthocyanes

4.2. LE CITRON

Le citron est le fruit du citronnier ; son nom scientifique est *Citrus limon*.

C'est un fruit capsulaire multiloculaire (de neuf à dix loges) formé de deux écorces dont l'une externe jaunâtre, mince, parsemée d'une infinité de vésicules globulaires contenant des huiles essentielles très aromatiques et l'autre interne épaisse blanche tendre, charnue et forme la partie la plus importante du fruit. la pulpe très acide et juteuse entoure quelques pépins.

Les caractéristiques de *citrus limon* sont récapitulées dans le tableau suivant.

Tableau III : les caractéristiques générales de citrus limon

L'espèce	Variété	Caractéristiques généraux
<i>Citrus limon</i>	Eureka	<ul style="list-style-type: none"> • Aspect général : arbre de port érigé et de croissance rapide • Feuilles : blanche, rosées en boutons, groupées en inflorescences. La floraison, avec une certaine variabilité selon les variétés, est remontante, parfois très remontante. Dans ce dernier cas, on le dira «citronnier des 4 Saisons » • Fruits : ovales, moyens à gros, au zeste très parfumé. La peau est d'épaisseur variable, la pulpe acide, juteuse, avec quelques pépins. Ils restent longtemps sur l'arbre sans que le gout s'altère.

➤ **Classification**

Selon **Padrini et al., (1996)** la classification de citron est la suivante :

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : *Citrus*

Espèce : *Citrus limon*

➤ **Composition chimique et valeur nutritive du citron**

Comme les autres agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90% d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). L'acidité est due essentiellement à l'acide citrique accompagné de faibles quantités d'acides malique, caféique et férulique

Le citron est un fruit remarquable par sa haute teneur en vitamine C et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes (naringosides, hespéridosides). La teneur de ce fruit en glucides est faible mais les fibres (cellulose, hémicelluloses et pectines) représentent 2,1% du poids total. La teneur en protéines ne dépasse pas 1g/100g. Diverses substances minérales ont été identifiées dans le citron. Le potassium est le minéral le plus abondant (Valnet, 2001).

Selon Souci *et al.* (1996) la composition biochimique moyenne du citron (pour 100g de fruit frais) (Tableau IV):

Tableau IV : Composition biochimique moyenne du citron

Composition	Teneur
Eau	90,20 g/100 g
Glucides	3,16/ 100g
Protéines	0,70 g/100g
Lipides	0,60 g/100g
Acides organiques	4,88 g/100g
Fibres alimentaires	0,50 g/100g
Les vitamines	51,26 mg/100g
Les minéraux	211,95 mg/100g
Apports énergétiques	36,48 K Calories

5. EFFET THERAPEUTIQUE DES CITRUS

Les Citrus contiennent des quantités élevées de composés qui ont des effets bénéfiques pour la santé, y compris les polyphénols, l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les tocophérols (**Ercan *et al.*, 2011**). Ils ont une valeur très importante dans la médecine traditionnelle et pour la fabrication des produits comestibles (**Choi *et al.*, 2007**). Comme ils présentent plusieurs activités biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante, anticancéreuse (**Del-rio *et al.*, 2004**). La consommation d'agrumes frais ou de leurs jus semble être associée à une amélioration des profils lipidique sanguins, la survie chez les personnes âgées, moins de risque de cancers l'abaissement de la pression artérielle, ainsi que la réduction des risques d'accident vasculaire cérébral, les maladies cardiaques coronariennes, traiter l'obésité (**Ramful *et al.*, 2011**).

Les fruits d'agrumes ont également des propriétés antiallergique qui sont dues à sa richesse en quercétine, hespéridine et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, qui est un neurotransmetteur impliqué dans les réactions allergiques et inflammatoire (**Gonzalez Molina *et al.*, 2010**). L'activité anticancéreuse des flavonoïdes peut se produire par deux effets selon (**Tripoli *et al.*, 2007**):

- effet antimutagène
- effet antiprolifératif

1.2. LES OXYDANTS ET LES ANTIOXYDANTS DES CITRUS

1. RADICAUX LIBRES

➤ Définition:

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes ou molécules, possédant un ou plusieurs électrons non appariés (électron célibataire). La tendance des électrons non appariés à interagir avec les autres molécules ou atomes voisins, pour former des liaisons covalentes, procure aux radicaux libres une très grande instabilité (**Cheesman *et al.*, 1993**).

➤ Formation des radicaux libres :

La formation des radicaux libres peut être le résultat :

- D'un transfert d'électron: $A + e^- \rightarrow A^\cdot$
- D'une fusion homolytique: $X : Y \rightarrow X^\cdot + Y^\cdot$
- D'une fusion hétérolytique: $X : Y \rightarrow X^\cdot$

2. LES TYPES DES RADICAUX LIBRES

On distingue deux types des radicaux libres:

2.1. L'ESPECE REACTIVE D'OXYGENE (ERO)

Le terme ROS réfère aux espèces oxygénées qu'elles soient radicalaires tels l'anion superoxyde et le radical hydroxyle ou non radicalaires tel le superoxyde d'hydrogène. La génération des ROS est liée au fonctionnement normal de la cellule. Cependant, elle est amplifiée dans certaines conditions pathologiques telles l'inflammation et l'ischémie/reperfusion, qui peuvent évoluer vers de multiples maladies (**Fuji *et al.*, 2003; Mates, 2000**).

➤ L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

L'anion superoxyde est formé quand un électron entre dans l'orbitale π^*2p de l'oxygène. Une telle réaction est catalysée par des enzymes tels que le NADPHoxydase. L'anion superoxyde est un agent important dans le stress oxydatif, il est peu réactif mais c'est un précurseur des espèces très agressives (**Marfak, 2003**).

➤ Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le peroxyde d'hydrogène résulte de la:

- dismutation de l'anion superoxyde:

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$
- Réduction univalente de l'anion superoxyde :

$$O_2^{\cdot-} + 2 H^+ + 1 \text{ é } \longrightarrow H_2O_2$$
- Réduction bi-électronique de l'oxygène :

$$O_2^{\cdot-} + 2 H^+ + 2 \text{ é } \longrightarrow H_2O_2$$

Cette réaction est catalysée par des enzymes comme l'urate oxydase, le glucose oxydase et la diaminoacide oxydase (**Guttridge, 1995**).

Le peroxyde d'hydrogène est peu réactif (agent oxydant et réducteur faible), mais peut se transformer en radical $\cdot OH$ par l'exposition aux rayons ultraviolets ou par interaction avec les métaux de transition (Fe^{++} , Cu^{++}) (**Halliwell *et al.*, 2000**).

➤ Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$)

Le radical hydroxyle est généré dans les cellules soit par :

- clivage réducteur du peroxyde d'hydrogène :



- coupure homolytique du peroxyde d'hydrogène sous l'influence de rayons ionisant (**Marfak, 2002**) :



- La réaction de Fenton :



Le radical $\text{OH}\cdot$ est un oxydant extrêmement agressif, qui s'attaque à la majorité des molécules biologiques (**Guetttridge, 1995**).

➤ L'oxygène singulet (O_2^1)

C'est une forme très réactive de l'oxygène d'une durée de vie très limitée (10^{-4}s). Sa formation est très importante dans les réactions photochimiques. L'oxygène singulet réagit souvent par fixation à la double liaison pour former un endoperoxyde qui peut être réduit pour former un radical alkoxy. Ce dernier initie les réactions radicalaire (**Prior et al., 2005**).

➤ L'acide hypochloreux (HOCl)

L'acide hypochloreux est un oxydant puissant formé dans l'organisme par les neutrophiles activés. Le cytoplasme des phagocytes contient une myeloperoxydase (MPO) qui catalyse l'oxydation de l'anion chlorure (Cl^-) par H_2O_2 produisant HOCl (**Sanchez-Moreno, 2002**):



Récemment, HOCl peut donner naissance au radical $\text{OH}\cdot$ par une réaction dépendante ou non de fer :





2.2. L'ESPECE REACTIVE D'AZOTE (RNS)

➤ L'oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique est un radical libre synthétisé par trois iso formes de l'oxyde nitrique synthétase (NOS). Il peut être formé par voie non enzymatique à partir de nitrite à pH bas (<5). Il est impliqué dans plusieurs fonctions biologiques comme la respiration, la transmission nerveuse, l'apoptose et l'homéostasie (**Roncon et al., 2005**).

➤ L'anion peroxy nitrite (ONOO⁻)

La génération simultanée de l'oxyde nitrique et de superoxyde favorise la production de l'anion peroxy nitrite, ce dernier est un puissant oxydant qui peut initier la peroxydation lipidique ainsi que l'oxydation des protéines et de l'ADN (**Szabo, 2002**).

3. L'EFFET DES RADICAUX LIBRES SUR LES MOLECULES BIOLOGIQUES

✓ Les lipides

La peroxydation lipidique est un exemple frappant du dommage oxydatif dans les différentes structures cellulaires. La peroxydation des glycolipides, phospholipides et de cholestérol survient suite aux réactions déclenchées par les espèces radicalaires telles que le radical peroxy et le radical hydroxyle (**Gerotti, 1998**).

L'oxydation des lipides est initiée par l'arrachement d'un hydrogène situé entre deux doubles liaisons; formant un radical diène conjugué qui s'oxyde en radical peroxy. Ce dernier évolue en peroxyde en contact avec un autre acide gras pour produire un nouveau radical diène conjugué (réaction en chaîne). Les hydroperoxydes et les radicaux peroxy se transforment soit en d'autres espèces moléculaires ou propagent le processus de peroxydation lipidique (**Favier, 2003**).

La peroxydation, lipidique se déroule selon trois étapes:



L'oxydation est initiée par l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur le carbone (α) adjacent de la double liaison; cette réaction est limitante (**Grune *et al.*, 1998**).

*La propagation : en présence de l'oxygène (O_2):



*La terminaison:



La combinaison des deux radicaux est limitée par la basse concentration des radicaux et par les facteurs stériques (**Gordon, 1990**).

✓ L'ADN

Les études expérimentales sur l'action des ROS sur l'ADN ont mis en évidence quatre grands types de lésions:

- Modification des bases nucléiques.
- Apparition des sites abasiques.
- Apparition des adduits de l'ADN.
- Cassure de simple ou double brin.

L'ADN mitochondrial est plus sensible au stress oxydatif à cause de l'absence des histones et la génération des ROS dans ce site, de même pour les cellules en division car leur ADN est nu et non enroulé (**Davier, 2000; Lee *et al.*, 2004**).

Le déséquilibre dans la balance oxydants/antioxydants contribue au développement des cancers par différents mécanismes:

- Modulation des gènes d'expressions.
- Induction des altérations génétiques (**Valko *et al.*, 2004**).

✓ Les protéines

Les protéines sont très sensibles à l'attaque du radical hydroxyle (HO[•]) qui peut dénaturer les sites actifs des protéines enzymatiques. Les ROS sont à l'origine des changements fonctionnels, des fragmentations et une augmentation des attaques protéolytiques des protéines (**Gardes *et al.*, 2003**).

L'accumulation des protéines oxydées peut être à l'origine de nombreuses maladies telles que la maladie d'Alzheimer et la dystrophie musculaire (**Berlette et Stadtman, 1997**).

✓ Les glucides

Les ROS attaquent les mucopolysaccharides particulièrement les proteoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans les conditions physiologiques en présence des traces d'ions métalliques libérant le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et le cetoaldehyde, entraînant l'hydrolyse des protéines ou leur glycation (**Favier, 2003**).

4. LE SYSTEME ANTIOXYDANT DE CITRUS

Les antioxydants sont des composés qui peuvent atténuer, inhiber ou prévenir l'oxydation des matières oxydables en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif (**Kim et Lee., 2004**).

Les antioxydants sont classés selon différents critères :

- leur origine : naturelle ou synthétique
- leur nature : hydrosoluble ou liposoluble.
- leur mode d'action : primaires ou secondaires.

❖ Les antioxydants synthétiques

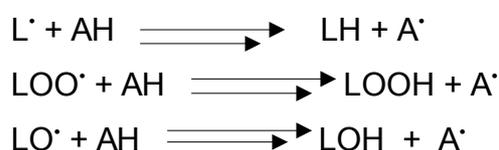
Les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire sont: butylate hydroxyanisol (BHA), butylate hydroxytoluène (BHT), propyle gallate et le tert butyle hydroxyquinone. Mais leur emploi est astreint à des règlements rigoureux à cause des soupçons qui planent sur leur toxicité (troubles hépatiques et cancers) (**Gulcin *et al.*, 2004**).

❖ Les antioxydants naturels

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

❖ Les antioxydants primaires

Ils englobent les composés qui interfèrent avec l'auto-oxydation lipidique en convertissant les produits d'oxydation lipidiques ($L\cdot$, $LOO\cdot$, $LO\cdot$) en produits plus stables grâce à leur propriété de donneurs de protons actifs. Le radical ($A\cdot$) dérivé de l'antioxydant se convertit en produit stable:



❖ Les antioxydants secondaires

Se sont des composés qui retardent l'auto-oxydation lipidique selon différents modes d'action :

- ✓ absorption des radiations ultraviolettes.
- ✓ inactivation de l'oxygène singulet.
- ✓ chélation des métaux.
- ✓ décomposition des hydroperoxydes.
- **COMPOSES PHENOLIQUES**

Les composés phénoliques sont des composés importants présentant une grande diversité de structures. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, qui peuvent être méthylés, acylés ou glycosylés, Ainsi, ils Constituent une vaste famille de métabolites secondaires comprenant plusieurs groupes, contenant chacun quelques dizaines à plusieurs milliers de molécules différentes. Parmi les composés phénoliques, on distingue classiquement des composés non flavonoïdes et des composés flavonoïdes basés sur un squelette en C6-C3-C6 (**Singleton et Esau, 1969**)

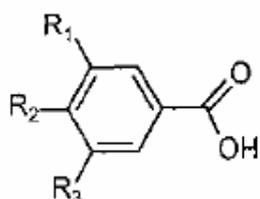
a. Les acides phénoliques et leurs dérivés phénols :

Les acides phénoliques sont divisés en deux sous classes (Figure 1) :

- ❖ Les dérivés de l'acide benzoïque ou les acides hydroxybenzoïques

Tels que l'acide gallique, les gallotanins et les ellagitanins.

- ❖ Les dérivés de l'acide cinnamique ou les hydroxycinnamiques qui comprennent les acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique qui sont des précurseurs d'anthocyanines (**Manach et al ., 2004.**).

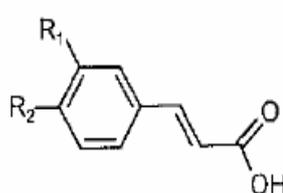


Acide hydroxybenzoïque

R1=OH : Acide coumarique.

R = R2=OH : Acide caféique.

R1=OCH3 ; R2=OH : Acide férulique



Acide hydroxycinnamique

R1=R2=OH ; R3=H : Acide protocatéchuique.

R= R2=R3=OH : Acide gallique.

Figure 1 : Structures chimiques des acides phénoliques (**Manach et al., 2004**).

Le pouvoir antioxydant des acides phénoliques réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres.

b. Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits et donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Ils sont stockés sous forme libre ou conjuguée mais leur localisation cellulaire est encore incertaine, bien que certains résultats favorisent le stockage dans la vacuole et/ou dans le réticulum endoplasmique (**LILOU et al ., 2008**).

- **Structures chimiques et classification :**

Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atome de carbone (C6-C3-C6) constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux), que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C, comme le montre la Figure 2.

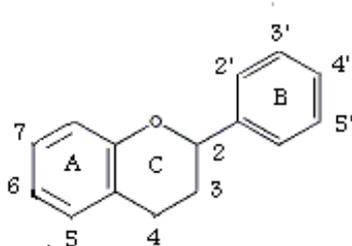
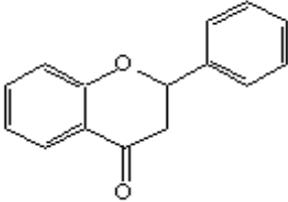
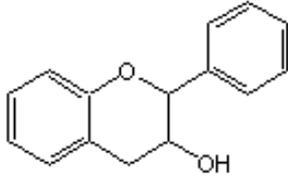
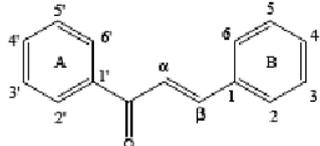


Figure 2 : Structure générale des flavonoïdes (Liu, 2004)

Ils sont principalement classés en flavones, flavonols, flavanones, flavanols, isoflavone, anthocyanidines (Tableau V):

Tableau V : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe.

Principaux classes des flavonoïdes	Composés	Structure de base
Flavone	Naringénine Galangine Diosmetine	
flavonol	Myricétine Quercétine Kaempférol Dihydrokaempférol	

<p>flavanone</p>	<p>Hesperetine Galangine</p>	
<p>flavanol</p>	<p>Catéchine</p>	
<p>Chalcone</p>	<p>Anthocyanine</p>	

❖ **Propriétés antioxydants des flavonoïdes :**

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (**Fuhrman et al., 1995**).

L'action antioxydant de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS (**Cotelle, 2001**). (Figure 3)

A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^{*}), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxy (Fl-O^{*}) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (**Jovanovic et al., 1998**)

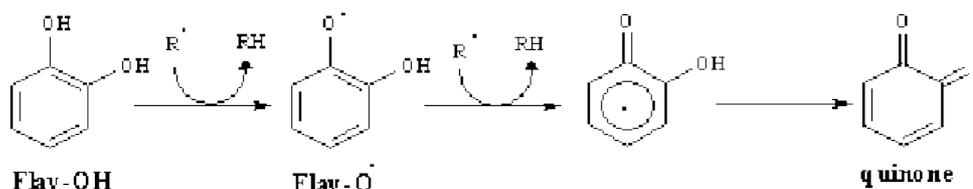


Figure 3 : Piégeage des ROS (R^*) par les flavonoïdes.

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde (*Cos et al., 1998*). Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (*Dacosta, 2003*), comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



b. Les Tannins

Les tannins sont des molécules à poids moléculaire élevé qui constituent le troisième groupe important des composés phénoliques. Ainsi, les tannins se réfèrent à l'acide tannique, il a une structure qui est composé d'un glucose centrale et 10 groupes galloyl, ce sont des polyphénols soluble dans l'eau et sont présents dans les écorces des fruits de quelques plantes (*Gulçin et al., 2010*).

Sur le plan structural, les tannins sont divisés en tannins hydrolysables et tannins condensés ou proanthocyanidines (*al-zoreky, 2009*).

▪ Les tannins condensés

Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ol dérivés de la catéchine ou de son nombreux isomère (Figure 4 a). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (*Cowan, 1999*).

▪ Les tannins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose et d'acide gallique. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique, ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide-l'acide éllagique (Figure 4 b) (Cowan, 1999).

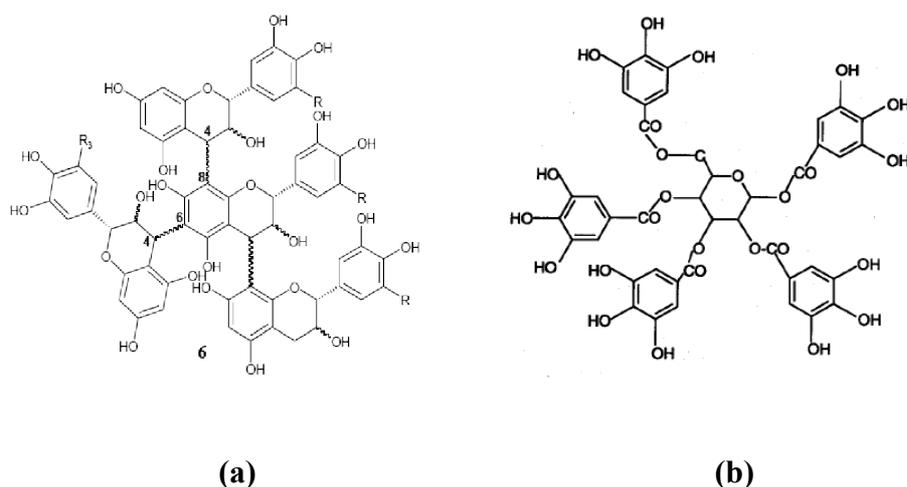


Figure 4 : Structure chimique des tannins condensés(a) et des tannins hydrolysables(b)

❖ Propriétés antioxydants des tannins

La nature polyphénolique de l'acide tannique qui est hydrophobe est le caractère responsable de l'action antioxydant, et son mécanisme antioxydant est encore loin d'être complètement compris. En présence de cuivre métallique l'acide tannique agit comme un prooxidant, ou comme un antioxydant suppresseur du radical hydroxyle (Gulçin *et al.*, 2010).

Comme beaucoup de polyphénols, l'acide tannique possède des propriétés antimutagéniques et antimicrobiennes.

5. ACTIVITES BIOLOGIQUES DES CITRUS

5.1. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Les polyphénols jouent un rôle important comme système de défense contre les RL, leurs activité antioxydante se produit par plusieurs mécanismes:

- Absorption des rayons UV: la naringénine et la rutine ont un effet protecteur contre les UV, en empêchant ainsi la surproduction des RL (**Tripoli *et al.*, 2007**).
- Renforcement de l'activité des enzymes antioxydants : les citroflavonoïdes jouent un rôle important dans l'augmentation de l'activité antioxydante du superoxyde-dismutase et de la catalase et par la modulation de l'expression de gène de su-peroxyde dismutase, catalase et de glutathion peroxydase (**Tripoli *et al.*, 2007**).
- Neutralisation des RL et chélation des métaux:des études réalisées in vitro et in vivo ont montré la capacité des polyphénols d'agrumes à neutraliser les RL et à chélater les métaux principalement le fer (**Del-Rio *et al.*, 2004**)
- Inhibition de la lipopéroxidation : diverses études expérimentales ont montré l'existence d'une relation importante entre les flavonoïdes de citrus limon et la diminution de l'oxydation de taux des lipoprotéines de faible densité LDL dans le sang (**Gonzalez-Molina *et al.*, 2010**)

5.2. AUTRES PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES

❖ Activité anti-inflammatoire

Ils sont capables d'inhiber les kinases et phosphodiesterases essentiels pour l'activation et la transduction du signal cellulaire. Ils ont également une incidence sur l'activation de certains nombre de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, y compris les lymphocytes T et B (**Manthey *et al.*, 2001**).

❖ Activité antiallergique

Les citrus sont également des propriétés antiallergiques qui sont dues à sa richesse en quercétine, hespéridine et diosmine, étant des inhibiteurs de l'histamine, un neurotransmetteur impliqué dans les réactions allergiques et l'inflammation (**Gonzalez-Molina *et al.*, 2010**)

❖ Activité antimicrobienne et antivirale

Plusieurs études expérimentales ont montré que les flavonoïdes des agrumes ont une activité antimicrobienne très importante :

- La quercétine et l'hespéridine inhibent l'infectiosité et la réplication de l'herpès simplex, le poliovirus, le virus parainfluenza et le virus syncytial(**Tripoli *et al.*, 2007**).

- Hespérétine, l'aglycone d'hespéridine, possède une activité antimicrobienne modérée contre *salmonella typhi* et *salmonella typhimurium*.

- ❖ **Activité anti-cancer**

La richesse de certaines plantes en métabolites secondaires comme les flavonoides est à l'origine de leur efficacité dans la prévention et le traitement des cancers. Les flavonoides sont considérés comme des agents antiprolifératifs et cytotoxiques vis-à-vis plusieurs lignées de cellules cancéreuses.

- ❖ **Action contre les maladies cardiovasculaires**

Beaucoup d'études se sont concentrées sur les effets cardiovasculaires des flavonoides. Les apports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoides. Ces substances sont des agents de relaxation vasculaires les plus efficaces comme l'épigénine et la génistéine. Cette relaxation est attribuée à l'action directe de ces flavonoides sur le muscle lisse vasculaire.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. ECHANTILLONNAGE

Les fruits utilisés dans la présente étude comprennent une variété du citron et une autre variété d'orange, qu'ont été récoltées pendant le mois de janvier 2016 dans la région d'Oued Ghir (INRAA) de Bejaïa. La récolte est faite manuellement, au hasard, sur le même arbre pour chaque variété.

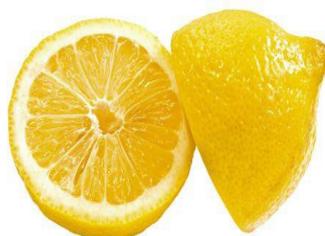
Ces fruits ont été donc emballés dans des sacs, étiquetés, puis transportés au laboratoire et ce afin de réaliser une étude comparative du point de vue composés bioactifs et activité Antioxydant.

Les deux fruits de chaque variété sont récapitulés dans la Figure 5.



Citrus sinensis

Variété : Washington navel



Citrus limon

Variété : Eureka

Figure 5 : morphologie de deux variétés analysées

II.1.1. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Les produits ayant servi à l'extraction des composés phénoliques, sont les parties d'écorce et la pulpe de citron (*Citrus limon*) et d'orange (*Citrus sinensis*). Les deux fruits sont bien lavés à l'eau de robinet, et coupés ensuite pour séparer les parties de fruit.

➤ **Séchage et broyage:**

Après un séchage pendant 15 jours à l'abri de la lumière à température ambiante, le broyage des échantillons son été réalisé à l'aide d'un broyeur électrique, et ce afin d'obtenir des poudres granulométrique plus au moins fine. Ces dernière ont été mises dans des flacons fermés, fumés, étiquetés et conservés à température ambiante à 25 C° jusqu'au moment de l'extraction.

II.2. EXTRACTION ET DOSAGE DES POLYPHENOLS

II.2.1. EXTRACTION

La méthode de (**Ladoh Yemeda *et al.*, 2014**) a été adoptée pour l'extraction des composés phénoliques totaux, et les étapes sont comme suit :

II.2.1.1. MACERATION

L'extrait brut des échantillons étudiés est obtenu par macération. Ce type d'extraction est un simple contact entre le support solide et le solvant ; 5g de poudre ont été mélangé avec 100 ml du solvant d'extraction (éthanol à 96%) ; le mélange a été mis sous agitateur magnétique à température ambiante pendant 24h. Après la macération, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier wattman N° 3. Le filtrat correspond à la fraction éthanolique.

II.2.1.2. DELIPIDATION

Dans l'ampoule à décanter, 100 ml de l'extrait éthanolique est ajouté à 100 ml de l'hexane (v/v). L'ampoule a été reposée sur un support fixe, le bouchon enlevé et laisser décanter de manière à récupérer la phase aqueuse.

II.2.1.3. FRACTIONNEMENT

L'extrait éthanolique obtenu est soumis à une deuxième extraction de type liquide /liquide à fin de pouvoir séparer les fractions de polyphénols. Dans ce cas, nous avons utilisé le solvant polaire, l'acétate d'éthyle, toutes les étapes d'extraction sont résumées dans la Figure 6.

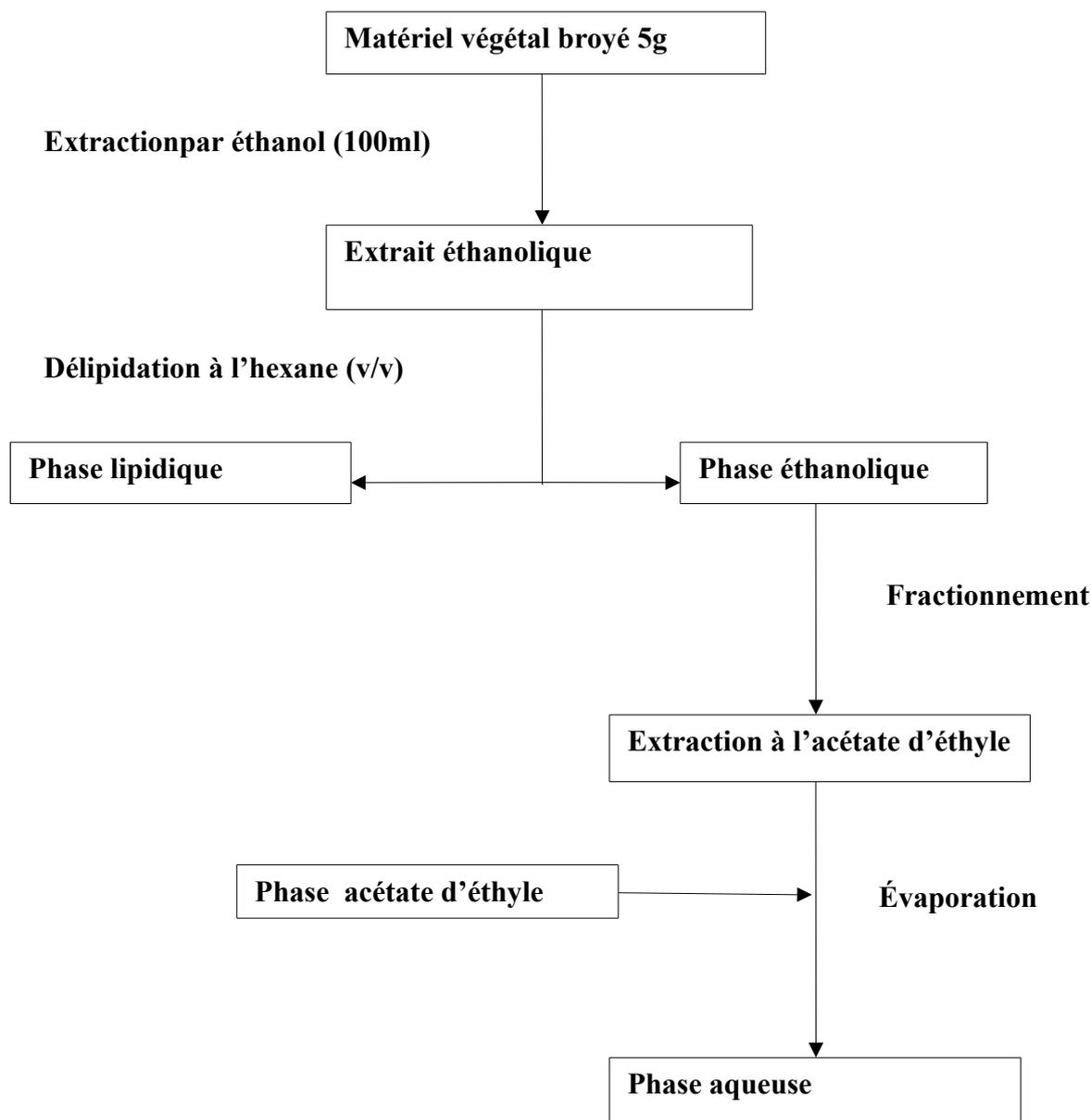


Figure 6 : schéma du protocole d'extraction

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

$$\text{Taux d'extraction(\%)} = \left[\frac{P_1 - P_0}{E} \right] \times 100$$

P₁ : poids de la matière sec après évaporation.

P₀ : poids initial du ballon

E : poids de l'échantillon initial (poudre en gramme)

II.2.2. DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUE

II.2.2.1. DOSAGE DES POLYPHENOLS TOTAUX

L'estimation de la teneur en phénol totaux contenue dans les quatre extraits : écorce d'orange, pulpe d'orange, écorce de citron, pulpe de citron est réalisée par dosage au spectrophotomètre, selon la méthode de (**Ladoh Yemeda *et al.*, 2014**). Cette méthode repose sur l'utilisation du réactif de Folin-ciocalteu.

➤ Principe

Cette méthode est basée sur les réactions d'oxydoréduction, le réactif de Folin-Ciocalteu, acide de couleur jaune, est utilisé comme oxydant, il est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀).

Lors de l'oxydation des polyphénols, le Folin est réduit en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (MO₈O₂₃) et ça en présence de carbonate de sodium.

L'intensité de la coloration est proportionnelle aux taux des polyphénols présents dans les extraits (**Ribereau-Gayon, 1968**).

➤ Mode opératoire

Un volume de 0,2 ml de chaque extrait a été mélangé avec 1,5 ml de Folin-Ciocalteu (10 %). Après 5 minutes, on rajoute 1,5 ml d'une solution de carbonate de sodium (6 %). Le mélange a été incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 2h et l'absorbance est lue à 725 nm au spectrophotomètre. L'acide gallique est utilisé comme standard de référence (**annexe II.1**). Les

résultats sont exprimés en microgramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec ($\mu\text{g EAA/g ES}$) (Singleton et Rossi, 1965).

II.2.2.2. DOSAGE DES FLAVONOIDES

➤ Principe

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

➤ Mode opératoire

La teneur en flavonoïde des extraits a été déterminée selon la méthode de (Ibrahim et Hegazy., 2012). Un volume de 1 ml d'extrait a été additionné à 1 ml de chlorure d'aluminium à 2% (préparé dans le méthanol). Le mélange a été placé à l'obscurité pendant 10 min puis l'absorbance a été mesurée à 430 nm.

Les résultats ont été exprimés en μg équivalent de Quercétine par 1 g de matière sèche. Ces concentrations sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec de la Quercétine préparée dans le méthanol ($200 \mu\text{g /ml}$)(annexe II.2).

II.3. MESURE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

II.3.1. EVALUATION DU POUVOIR ANTIRADICALAIRE

II.3.1.1. LE TEST DE PIEGEAGE DU RADICAL DPPH

➤ Principe

Ce test est basé sur la mesure de l'aptitude d'un antioxydant à exercer un effet scavenger sur le radical libre DPPH* (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). Le radical DPPH* est réduit en son hydrazine correspondant lorsqu'il réagit avec un donneur d'hydrogène. La réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la solution d'une couleur violette à une couleur jaune, l'absorbance

est mesurée par spectrophotomètre à 517 nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité antiradicalaire (Milardovic *et al.*, 2006).

Le mécanisme est récapitulé dans le Figure 7

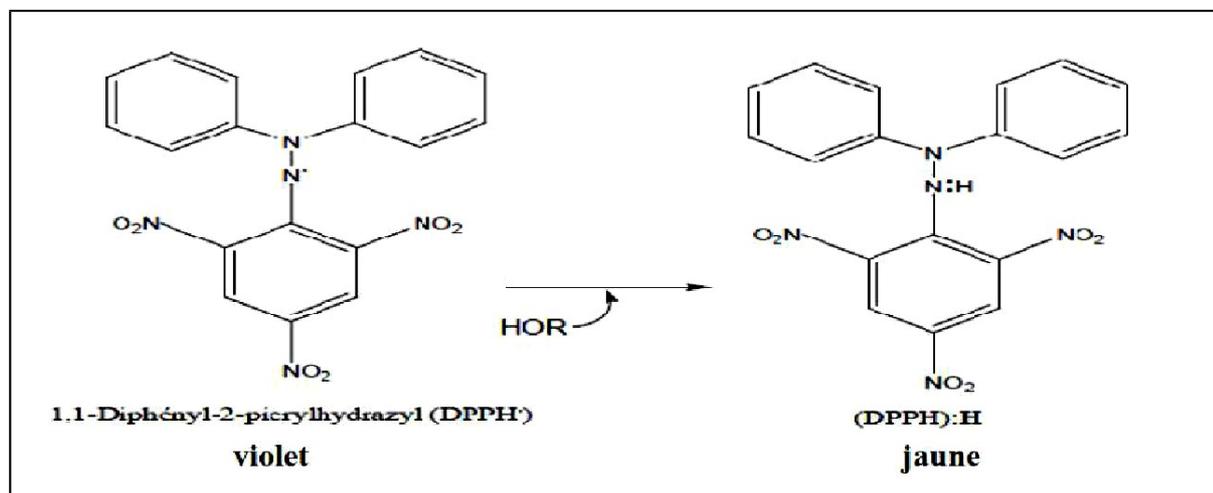


Figure 7 : piégeage du radical libre DPPH* (Parejo *et al.*, 2002)

➤ **Mode opératoire**

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L’effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Seung-cheol *et al.* (2004).

Un volume de 100µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 100µl du méthanol avec 1ml d’une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l’obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l’aide d’un spectrophotomètre. Des standards de référence (acide ascorbique et BHA) ont également été analysés en respectant la même procédure (annexe II.3).

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

$$\text{Pourcentage d' inhibition du radical DPPH} = \frac{|\text{témoin}| - |\text{échantillon}|}{|\text{témoin}|} \times 100$$

II.3.1.2. TEST D'ABTS

➤ Principe

L'activité antiradicalaire des extraits est déterminée par une méthode basée sur la réduction du radical ABTS^{•+} « 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) » qui est utilisé comme un radical libre pour évaluer l'activité antioxydant des échantillons. Ce radical cationique est facilement formé par oxydation en présence de persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleue (**Prouillac, 2006**).

L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cationique entraîne la réduction de ce radical et une diminution de l'absorbance. Cette diminution dépend de l'activité antioxydant des composés testés, du temps et de la concentration (**Re et al., 1999**).

➤ Mode opératoire

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} est évalué par la méthode de **Ramful et al. (2010)**.

La solution d'ABTS^{•+} préparé par mélange de 7 mM d'ABTS et de 2,45mM de persulfate de potassium incubé pendant 12-16h à l'abri de la lumière et à température ambiante avant l'utilisation. La solution d'ABTS est diluée avec l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,7(± 0,02) à 734 nm. 1,9 ml de la solution d'ABTS est additionné à 100 µl de l'extrait à différentes concentrations.

Après l'incubation pendant 7 min à l'obscurité et à température ambiante, On mesure la réaction de réduction de la solution d'ABTS à 734 nm, la capacité antioxydant des extraits testés, est exprimée par rapport aux concentrations de standard Trolox (TEAC) (**annexe II.4**), ce qui donne des indications utiles sur le potentiel antioxydant de l'extrait de plantes.

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

$$\text{Pourcentage d' inhibition du radical ABTS} = \frac{|\text{Contrôle}| - |\text{Extrait}|}{|\text{Contrôle}|} \times 100$$

Où : Abs Contrôle : Absorbance du témoin et

Abs Extrait : Absorbance de l'extrait.

II.3.1.3. TEST DE L'ACTIVITE DE PIEGEAGE DE L'OXYDE NITRIQUE (NO)

➤ Principe

L'activité de piégeage de l'oxyde nitrique peut être mesurée par la réaction de GRIESS (Nurlam *et al.*, 2012).

➤ Mode opératoire

Le mélange réactionnel contenant 4 ml de nitroprusside de sodium à 10 mM, de 1 ml d'une solution saline du tampon phosphate à 50 Mm (pH 7,4) et 1 ml de l'extrait à (50-100-250-500 µg/ml), l'acide gallique (50-100-200 µg/ml), ont été incubées à 25°C pendant 150 min. Après incubation, 0,5 ml de réactif de GRIESS (1% de sulfanilamide, 2% acide O-phosphorique et 0,1% d'acide NEDD) a été ajoutée en 0,5 ml de mélange réactionnel. Le mélange est incubé à l'abri de la lumière pendant 30minutes. L'absorbance est mesuré à 535 nm contre le blanc (Bumrela et Naik, 2011). Des standards de référence (acide ascorbique et BHA) ont également été analysés en respectant la même procédure (annexe II.5).

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

$$\text{Pourcentage d' inhibition du radical NO} = \left[1 - \left(\frac{|d| \text{ échantillon}}{|du| \text{ controle}} \right) \right] \times 100$$

II.3.2. MESURE DE L'INHIBITIN DE L'OXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE

- Principe

Le principe de la réaction est d'évaluer le taux des peroxydes présents dans le milieu réactionnel par le FeCl₂ et le Thiocyanate d'ammonium. Cependant, durant l'oxydation de l'acide linoléique, il y a formation du peroxyde qui à son tour assure l'oxydation du Fe⁺² en Fe⁺³, ce dernier se lie avec le Thiocyanate d'ammonium pour former un complexe ayant un maximum d'absorbance à 500 nm.

➤ Mode opératoire

L'inhibition de l'oxydation d'acide linoléique est mesurée selon la méthode de **Min (2012)**. 1 ml d'acide linoléique dans le méthanol (95 %) est mélangé avec 1ml d'extrait et 0,2 ml du tampon phosphate 50 mM (pH 7). Après incubation à 37°C pendant 72 h, 0,1 ml de la solution incubée est ajoutée à 2,425 ml d'éthanol (75 %), 25 µl de Thiocyanate d'ammonium et 25 µl de chlorure ferreux (dans HCL à 3,5 %). Après 3 minutes, l'absorbance est mesurée à 500 nm. Ce test est répété pendant 7 jours jusqu'à une stabilisation de l'absorbance de l'échantillon.

Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation d'acide linoléique est calculé comme suivant :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de l'ac linoléique} = \left[1 - \left(\frac{|d| \text{ 'échantillon}}{|du| \text{ controle}} \right) \right] \times 100$$

III.3.3. ANALYSES STATISTIQUE

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD et analysés par le test Anova, et pour la détermination des taux de signification (n=3), les valeurs de $p \leq 0,05$ sont considérées statistiquement significatives. Les valeurs IC₅₀ sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition \hat{f} (concentration)].

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. LE TAUX D'EXTRACTION

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

La méthode d'extraction par macération en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction des quatre échantillons (écorce de citron, pulpe de citron, écorce d'orange, pulpe d'orange), a permis d'obtenir respectivement des taux d'extraction de 18%, 49%, 33,6% , 0,8%, (**Figure N° 8**)

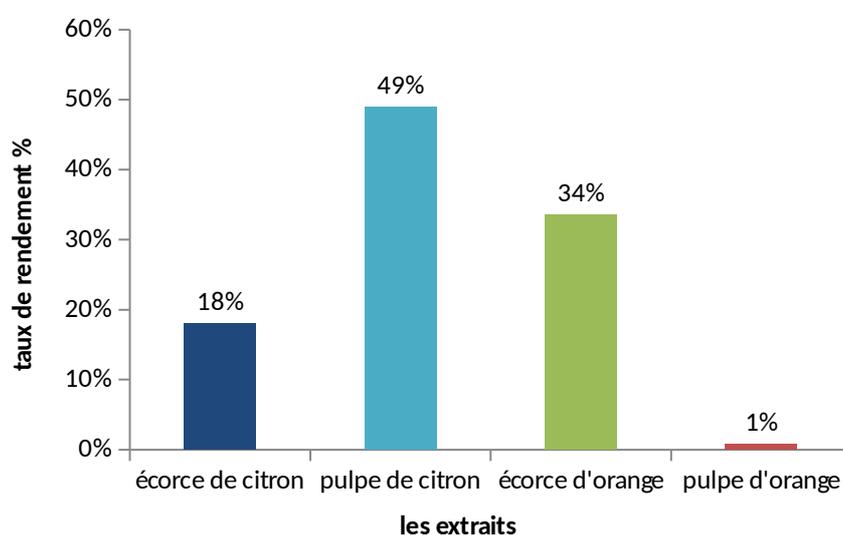


Figure 8 : Taux d'extraction des polyphénols des quatre échantillons de citrus

Bien que le matériel végétal est le même, une variabilité des rendements d'extraction des écorces et des pulpes d'orange et de citron, l'extraction de la pulpe de citron a donné le rendement le plus élevé (49%), suivie de celle de l'écorce d'orange (33,60 %), suivie de celle de l'écorce de citron (18%), et faiblement de la pulpe d'orange (0,80 %), cette variabilité du rendement des quatre extraits peut être due à la différence de la granulométrie des particules et le type de matériel végétal utilisé.

D'autre part, indépendamment du solvant utilisé, il a noté que l'espèce *citrus limon* présente les meilleurs taux d'extraction par rapport au l'espèce *citrus sinensis*

III.2. DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES

III.2.1. DOSAGE DES POLYPHENOLS

La couleur bleu après 2 h d'incubation confirme la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif Folin-ciocalteu. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le bleu foncé est fonction de la teneur en polyphénols.

Les teneurs en polyphénols totaux sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique $\mu\text{g/ml}$ (**annexe II.1**).

Les concentrations des polyphénols totaux obtenues sont présentées dans la **figure (9)**, ils sont exprimés en $\mu\text{g EAG/g ES}$.

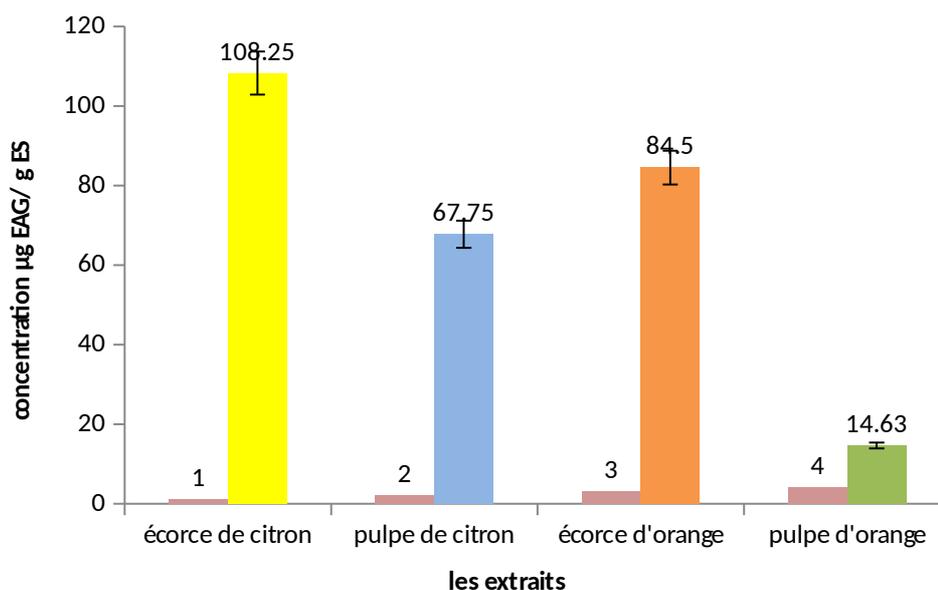


Figure 9: les teneurs en polyphénols totaux dans les quatre extraits de *citrus limon* et de *citrus sinensis*

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits éthanolique montre des résultats différentes qui sont de 108,25 ; 67,65 ; 84,5 et 14,63 μg EAG/ ES, correspondants aux extraits suivant respectivement : écorce de citron, pulpe de citron, écorce d'orange, pulpe d'orange.

Selon les résultats obtenus, la teneur en polyphénols totaux est significativement supérieure ($p < 0.05$) dans les extraits de citron que dans ceux d'orange. De plus, il est à noter que les écorces de citrus sont beaucoup plus riches en polyphénols que dans leur pulpe. Ces résultats sont en accord avec ceux démontré par d'autres travaux antérieurs sur la teneur totale de polyphénols de Citrus (**Gorinstein *et al.*, 2001**).

Toutefois, d'autre études ont montré que les teneurs en polyphénols totaux des extraits d'écorce et de la pulpe de citron et d'orange sont variables et non conformes avec nos résultats (**Ghasemi *et al.*, 2009** ; **Gerhard, K et Alexnder, H, 2009**) ; ceci peut être du à la nature du solvant utilisé, la méthode d'extraction et la température d'extraction.

III.2.2. DOSAGE DES FLAVONOÏDES

Une couleur jaunâtre est formée dans tous les extraits de *citrus limon* et *citrus sinensis* après l'addition de la solution de chlorure d'Aluminium (AlCl_3), cette coloration révèle la présence des flavonoïdes dans les extraits analysés.

Les résultats du dosage des flavonoïdes sont présentés dans la **figure (10)**, ils sont exprimés en μg EQ/g ES.

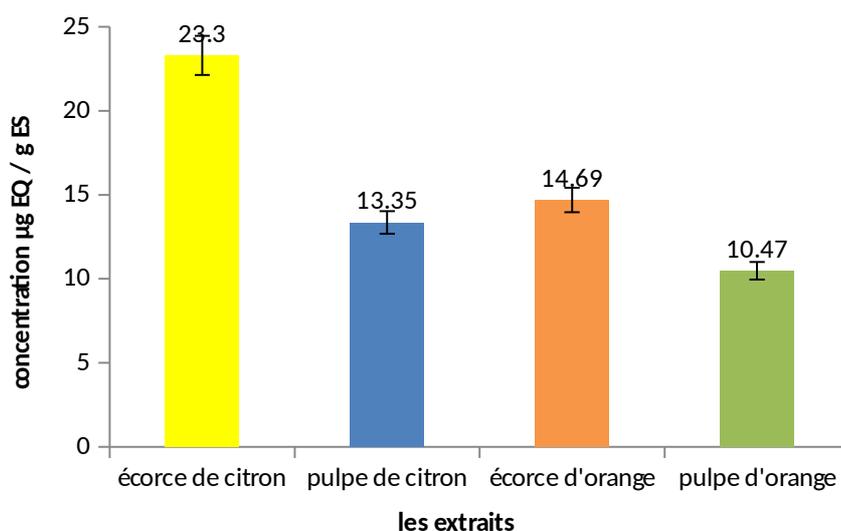


Figure 10 : Teneurs en flavonoïdes dans les parties écorce et pulpe de citron et d'orange.

Comparé aux autres extraits, l'écorce de citron a plus de quantité de flavonoïde de 23,3 $\mu\text{g/ml}$, suivi de l'écorce d'orange de 14,69 $\mu\text{g/ml}$, suivi de pulpe de citron de 13,35 $\mu\text{g/ml}$ et celle de pulpe d'orange de 10,47 $\mu\text{g/ml}$.

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

III.3. EVALUATION DE L'ACTIVITES ANTIOXYDANTE

III.3.1. EVALUATION DE POUVOIR ANTIRADICALAIRE PAR LE DPPH

Après 30 mn d'incubation de la solution DPPH-extrait (à différente concentration), la coloration violette vire vers une coloration jaune dans les quatre extraites, ce changement de couleur est dû à la réduction de DPPH, ce qui montre que les échantillons ont un effet scavenger de radical DPPH. Les résultats du pouvoir antiradicalaire par le DPPH des différents extraits de citrus sont rassemblés dans la **figure (11)**.

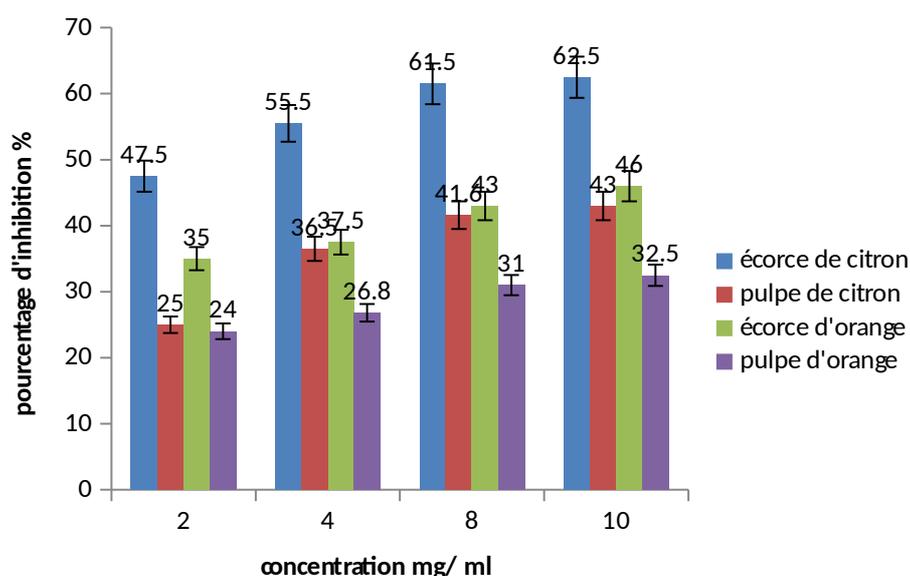


Figure 11 : Evaluation de pouvoir antiradicalaire DPPH en fonction des concentrations des extraits de *Citrus limon* et *Citrus sinensis*.

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

Tableau VI : les résultats des IC₅₀ pour le test DPPH

	IC ₅₀ (mg/ml)
Ecorce de citron	5,72
Pulpe de citron	10,35
Ecorce d'orange	9,69
Pulpe d'orange	15,2
Acide ascorbique	0,076
BHA	0,094

Selon ces résultats, il est à constater que quelque soit l'espèce, la partie écorce est celle qui a révélé une IC₅₀ la plus faible. Ceci pourrait justifier que les écorces de citron et d'orange sont significativement plus actives que les pulpes des deux espèces. D'autre part, l'écorce de citron est plus active que l'écorce d'orange. Toutefois, cette activité antioxydante est significativement ($p < 0,05$) importante par rapport aux standards utilisés qui ont donné des IC₅₀ égales à 0,076 mg/ml et 0,094 mg/ml pour acide ascorbique et le BHA respectivement.

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

Nos résultats sont en accord avec ceux déjà publiés qui ont montré que les écorces de citrus représentent la fraction la plus riche en polyphénols, laquelle a révélé un potentiel antioxydant puissant (**Bacco *et al.*, 1998** ; **Gorinstein *et al.*, 2001**). Cependant, **Ghasemi *et al.* (2009)** ont signalé que l'activité anti-radicalaire des écorces de citron et d'orange représentait des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 1,4 mg/ml et 1,1 mg/ml respectivement, qui sont significativement inférieures comparés à nos résultats étudiés.

III.3.2. ACTIVITE SCAVENGING DU RADICAL ABTS^{•+}

Afin de valider les résultats de l'efficacité antioxydante des extraits de citrus obtenus précédemment par le test anti-radicalaire du DPPH, nous avons utilisés un 2^{ème} test basé sur la capacité de piégeage du proton du radical cationique ABTS^{•+}.

Les pourcentages d'inhibition des extraits de citrus à l'ABTS sont représentés dans la figure 12.

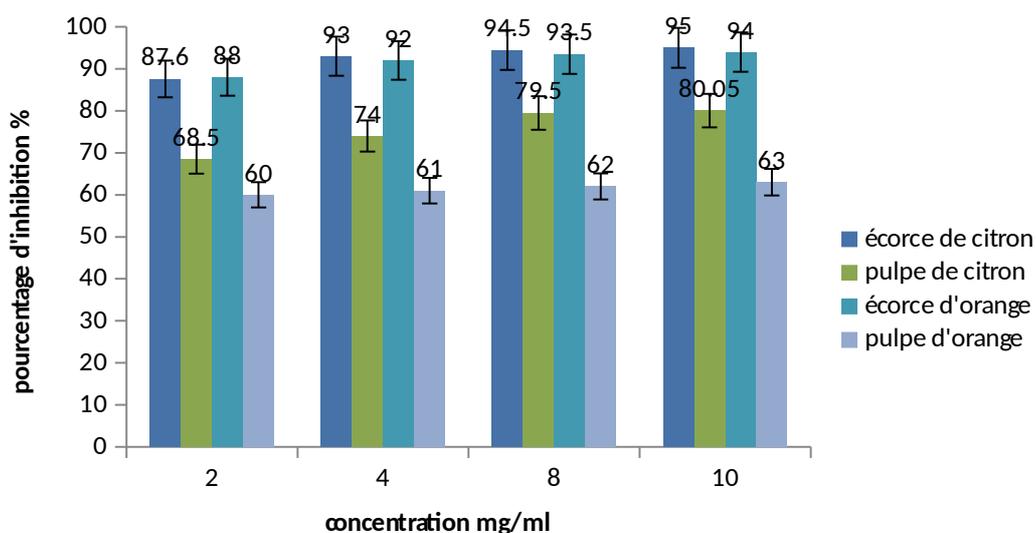


Figure 12 : Variation de l’inhibition de l’ABTS⁺ en fonction des concentrations des extraits.

Il en ressort que l’activité anti-radicalaire de l’ABTS est d’autant plus supérieure que la concentration est élevée. D’autre part, ces résultats indiquent que pour toutes les concentrations, l’écorce présente le plus grand effet inhibiteur que la pulpe. Pour une concentration minimale de 2 mg/ml l’écorce a révélé une inhibition équivalent à 88 % et 87,6 % respectivement pour le citron et l’orange. La pulpe a par contre montré une inhibition significativement ($P < 0,05$) inférieure (68,6 % ; 60 %) pour le citron et l’orange respectivement

La capacité antioxydante pour ce test (ABTS) a été exprimée en équivalent Trolox (TEAC) qui corespond à la concentration du Trolox en µg donnant la même activité qu’un milligramme de la substance testée, plus le TEAC est élevée plus l’extrait est efficace.

Pour pouvoir calculer le TEAC, une courbe d’étalonnage est réalisée avec le Trolox et les résultats obtenus sont donnés en équivalent µg/ml Trolox/ mg d’extrait.

Tableau VII : Les valeurs de Trolox des différents extraits de citrus.

	Concentration µg/ml Trolox par mg d’extrait
Ecorce de citron	0,213

Pulpe de citron	0,170
Ecorce d'orange	0,210
Pulpe d'orange	0,121

Pour les deux espèces de citrus, l'écorce présente le TEAC le plus élevé (0,213 µg/ml Trolox par mg d'extrait de citron ; 0,21 µg/ml Trolox par mg d'extrait d'orange), il est donc considéré comme étant le plus efficace pour l'inhibition cationique ABTS. Suivie de la pulpe avec un TEAC plus inférieure (0,170 µg/ml trolox par mg d'extrait ; 0,121 µg/ml trolox par mg d'extrait) respectivement pour le citron et l'orange.

L'extrait de l'écorce des deux espèces de citrus serait donc plus actif que celui de la pulpe. Ce résultat serait compatible avec la composition chimique déterminée pour les polyphénols où une prédominance de ces composés a été clairement identifiée dans l'extrait d'écorce que dans la pulpe, lequel expliquerait son pouvoir anti-radicalaire relativement élevé dans l'extrait d'écorce que dans la pulpe, lequel expliquerait son pouvoir anti-radicalaire relativement élevé dans l'extrait d'écorce par rapport à celui de la pulpe.

Ces travaux sont en accord avec des résultats déjà publiés (**Ortuno *et al.*, 2006 ; Halliwell, 2007**) selon lesquels les polyphénols constitueraient une bonne source d'antioxydant naturels. De plus, les travaux de **Gorinstein *et al.*, (2001)** confirme ces résultats et ont montré que le potentiel antioxydant total par piégeage du radical ABTS a été plus élevé dans les écorces de citrons que dans leur pulpe.

III.3.3. ACTIVITE DE PIEGEAGE DU RADICAL NO*

Les résultats figurant dans le Tableau VIII et la Figure 13 illustrent l'activité anti-radicalaire vis-à-vis du piégeage du radical libre NO ainsi que les IC₅₀ des différents extraits de citrus.

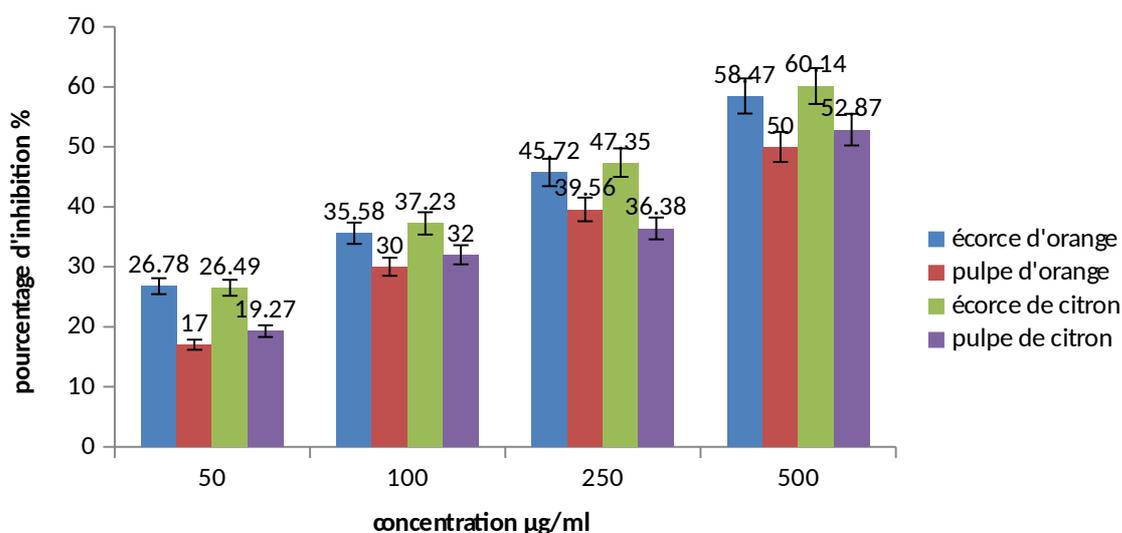


Figure 13 : pourcentage d’inhibition du radical NO en fonction de différentes concentrations des extraits de *citrus limon* et *citrus sinensis*

Les concentrations qui piègent 50 % des radicaux libres ou concentrations inhibitrices (IC₅₀) sont calculées et représentées dans le tableau VI. Les différences entre les extraits et les antioxydants standards (BHA et l’acide ascorbique) et entre les extraits eux-mêmes sont statistiquement significatives (p < 0,05).

Tableau VIII : Les valeurs IC₅₀ du piégeage du radical NO par les différents extraits de citrus et les standards.

	IC ₅₀ (µg/ml)
Ecorce de citron	333.67
Pulpe de citron	457.07
Ecorce d’orange	351.81
Pulpe d’orange	470.46
Acide ascorbique	125 ,96
BHA	178,24

Selon les valeurs d’IC₅₀, il en ressort que les extraits éthanolique d’écorce de citron et d’orange sont ceux qui ont présenté de grandes capacités de piégeage du radical NO. Les extraits de

pulpe des deux espèces de citrus ont marqué un effet moins important et sont significativement ($p < 0,05$) moins actifs que les extraits d'écorce.

Nos résultats sont en corrélation avec les travaux de **Shaik *et al.* (2015)** qui ont étudié l'activité de piégeage du radical NO de quelques extraits hydro-éthanolique de Citrus et qui ont montré que la partie écorce est celle la plus active que la pulpe. D'autre part, **Muthial *et al.* (2012)** sur les extraits de *citrus limetta*, ont trouvé que la valeur IC_{50} pour l'écorce est de 290 ± 0.44 $\mu\text{g/ml}$ et pour la pulpe est de 705.16 ± 0.56 $\mu\text{g/ml}$, justifiant que la partie écorce est potentiellement la plus active que celle de la pulpe, ceci est en accord avec nos résultats obtenus.

III.3.4. EVALUATION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine sont concernés. L'étude des mécanismes de la peroxydation lipidique et des moyens de la prévenir par les antioxydants connaît depuis les dernières décennies un regain d'intérêt du aux implications de ces phénomènes dans les domaines de la nutrition et de la santé.

La mesure de la peroxydation lipidique de l'acide linoléique est l'une des méthodes les plus utilisées pour la détermination de l'activité antioxydante.

Les mesures d'absorbances de l'acide linoléique en présence des différents extraits de deux variétés de citrus étudiées sont exprimées dans la figure 14

D'après cette figure, on constate que tous les échantillons ont montré une absorbance faible pendant le premier jour, ce qui explique que les échantillons n'ont aucune activité, puis elle commence à s'augmenter légèrement jusqu'au troisième jour où les extraits montrent une absorbance maximale.

A partir du troisième jour on constate une diminution de l'absorbance pour tous les extraits jusqu'à atteindre une valeur minimale du cinquième jour.

La cinétique d'inhibition de la peroxydation lipidique de l'acide linoléique par les extraits d'écorce et de pulpe de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* étudiés sont résumés dans la figure 15.

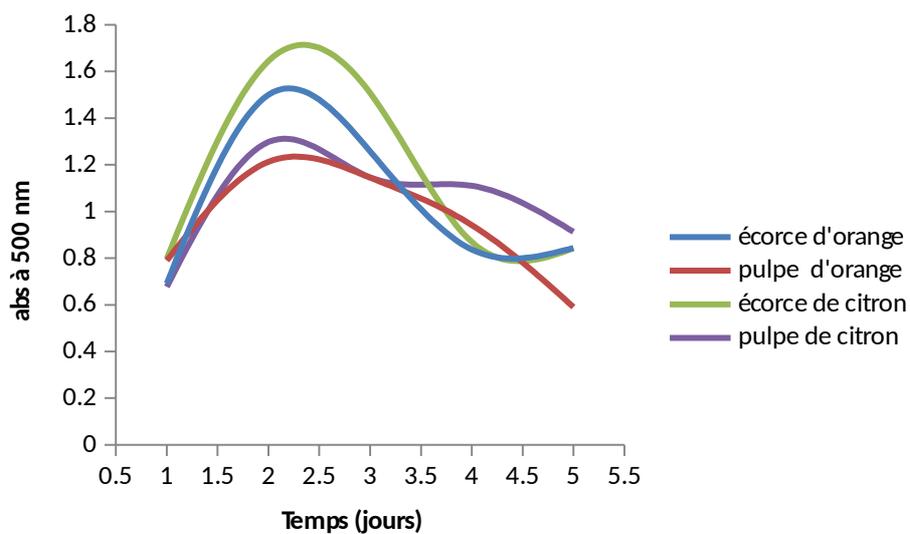


Figure 14 : les variations des absorbances de citrus en fonction de jours

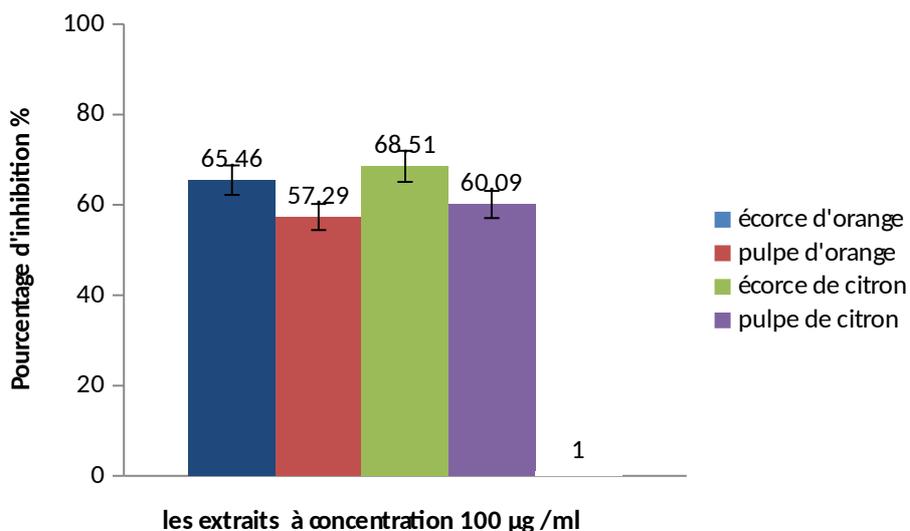


Figure 15 : histogrammes de l'inhibition de peroxydation lipidique de l'acide linoléique en présence des différents extraits de citrus.

Dans la présente étude, le taux d'oxydation a été estimé par la méthode colorimétrique au FTC qui permet d'évaluer le taux de peroxydes présents dans le milieu réactionnel.

La figure ci-dessus montre clairement que tous les extraits ont montré une activité inhibitrice de l'acide linoléique allant de 57,29 à 68,51 % à la concentration de 100 µg/ml. En effet, l'extrait écorce de *citrus limon* a montré de pourcentage d'inhibition plus élevés (68,51 %), suivi de l'écorce de *citrus sinensis* (65,46 %). Dans la pulpe des deux espèces, ce pourcentage est quasiment identique correspondant à 60,09 % pour *citrus limon* et 57,29 % pour *citrus sinensis*.

Ces résultats indiquent un bon effet inhibiteur de la peroxydation lipidique par les différents extraits qui serait probablement du à la présence des composés phénoliques dont la fraction majoritaire des flavonoïdes.

Des travaux similaires sur l'extrait méthanolique de *citrus limon* et *citrus pseudolimon* ont rapporté que ces espèces présentent un pouvoir inhibiteur de la lipo-peroxydation avec un pourcentage allant de 31 à 60 % (Sultana *et al.*, 2015). Il est bien établi que l'activité antioxydante serait fortement corrélée à la capacité des extraits à prévenir la peroxydation de l'acide linoléique.

CONCLUSION

CONCLUSION

La présente étude s'intéresse à l'extraction des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydant (anti-DPPH^{o+}, anti-ABTS^{o+} et anti-NO^{o+}) et l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des composés phénoliques extraits à partir des écorces et des pulpes de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* d'une part et la détermination de la teneur en composés phénoliques de chaque extrait (phénols totaux, flavonoïdes) d'autre part.

L'ensemble des résultats obtenus au cours des analyses quantitatives par spectrophotométrie nous a permis de trouver des teneurs en polyphénols totaux très variables entre les différents extraits allant de 14,63 µg EAG/g ES jusqu'à 108,25 µg EAG/g ES, le meilleur taux est enregistré par l'extrait écorce de *Citrus limon* (108,25 µg EAG/ g ES), et des teneurs en flavonoïdes qui varient entre 10,47 à 23,3 µg EQ/ g ES , dont les deux teneurs, la partie écorce des deux espèces possèdent des quantités plus élevées que la partie pulpe.

L'évaluation du potentiel antioxydant des deux fruits étudiés par le test DPPH à une gamme de concentration de 2-10 mg/ml a révélé que la plupart d'entre elles possède une activité antioxydante remarquable telle que l'extrait écorce de *Citrus limon* qui présente une IC₅₀ très faible (5,72 mg/ml) par rapport aux autres extraits.

L'évaluation du pouvoir antioxydant contre le radical ABTS^{o+} à une gamme de concentration 2-10 mg/ml, a montré que l'extrait écorce de *Citrus limon* possède une plus grande valeur de TEAC (0,213 µg/ml Trolox par mg d'extrait écorce de citron), par rapport aux autres extraits, donc ce dernier montre un bon effet inhibiteur contre le radical ABTS.

L'évaluation de l'activité antioxydante contre le radical NO à une gamme de concentration 50-500 µg/ml, a montré toujours que l'extrait écorce de *Citrus limon* exerce un bon effet inhibiteur contre le radical NO.

L'évaluation de l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique de l'acide linoléique, a révélé que tous les extraits ont une bonne activité inhibitrice allant de 57,29 à 68,51 % enregistré par tous les extraits.

Lors de ce travail, on a pu estimer un très bon effet sur l'activité antioxydante en particulier la peroxydation lipidique par les extraits des plantes étudiées. En perspectives, il serait intéressant de mener une étude sur d'autre espèce d'agrumes comme le *Citrus reticulata*, et utilisé d'autres

CONCLUSION

méthodes de caractérisation phytochimique plus précises telle que l'HPLC, LC-MS et LC-RMN pour identifier les molécules bioactives à partir de ces

Plantes médicinales. En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, il est aussi intéressant de définir le mécanisme d'action de ces substances végétale sur les microorganismes.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

A

- **Al-zoreky, N.S. (2009).** Antimicrobial activity of *pomegranate (punica grantum L.)* fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, **134**: 244-248.
- **Aruoma, O.I. (2003).** Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in food plants. *Mut. Res.*, **9(20)**: 523 - 524.

B

- **Bahouri, W., Mohamed, B. S., Soumaya., Ines, B., Marie-Genevière., Dijoux-franca., kamel, G., et leila, C.G. (2011).** Evaluation of antioxydant and antigenotoxic activity of two flavonoïdes from *Rhamnus alaternus L.* (Rhamnaceae), kaempferol 3-o-b isorhanisioside and rhamnocitrin 3-0-b isorhamnisioside. *Food and chemical toxicology*, **49**: 1167- 1173.
- **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Gazin, M., Gazing, J.C. ET Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimforsch Drug Research*, **49**: 1086-1108.
- **Bénédicte ET Michel, B. (2011).** *Agrumes comment les choisir ET cultiver facilement. Les éditions eugen ulmer*, 8 rue Blanche, Paris, N° d'édition: 440-01.p.127.
- **Berlett, B.S., Stadtman, E.R. (1997).** Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The journal of biological chemistry*, **272 (33)**: 20313-20316.
- **Berger, M.M. (2005).** Can oxydatif damage be treated nutritionally? *Clinical nutrition*, **24**: 172-183.
- **Bocco, A., Cuvelier, M.E. Richard, H., Berset, C. (1998).** Antioxydant Activity and Phenol Composition of Citrus Pell and Seed Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **46(6)**: 2123-23.
- **Bousbia, N. (2009).** *Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires.* Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des pays de Vaucluse et Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Bousbia, N., Vian, M.A., Ferhat, M.A., Meklati B.Y., Chemat, F. (2009).** A New process for extraction of essential oil from citrus peel: Microwave Hydrodiffusion and Gravity. *Journal of Food Engineering*, 90: 409- 413.
- **Bumrela, S., Naik, S., (2011).** Identification of β -carotene and β sitosterol in methanolic extract of *Dipteracanthus patulus* (Jacq) nees and their role in antimicrobial and antioxidant activity. *International journal of phytomedicine*, (3): 207p.

C

- **Cheesman K., Slater H. (1993).** An introduction to free radicals biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49: 481-493.
- **Choi, S., Hee-chul, K., Soo-youn, K., Joon-HO, H., Ji-Gweon, P., shin-hae, K., Sang-hun, H., Su-Hyun, ET Se-Jae, k. (2007).** Correlation between Flavonoid content and the in vitro inhibitory Activity of peel extracts from various citrus fruits. *Boil. Pharm. Bull.* 30(4): 772-778.
- **Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K. et al., (1998).** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod*, 61: 71-76.
- **Cotelle, N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*, 1: 569-590.
- **Cowan, M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 564-582.

D

- **Dacosta, Y. (2003).** *Les phytonutriments bioactifs*. Paris : Ed Yves Dacosta. P. 317.
- **Davier, K.J.A. (2000).** Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50: 279–289.
- **Del Rio, J.A., Fuster, M. D., Gomez, P., Porrás, I., Garcia-Lidon, A., ET Ortuno, A. (2004).** *Citrus limon* : a source of flavonoid of pharmaceutical interest. *Food chem*, 84:457-461.

E

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Ercan, B. ET Ilhami, G.U. (2011).** Polyphénol contents and *in vitro* antioxydant activities of lyophilised aqueous extract of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Research International*, **44**: 1482-1489.

F

- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques*, 108-115.
- **Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M. (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**: 549-554.
- **Fuji, J., Iuchi, Y., Matsuki, S., Ishi, T. (2003).** Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissue. *Asian Journal of Andrology*, 1-12.

G

- **Gardes-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh Z., Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *Mécanisme biochimique*, 91-96.
- **Gerhard, K et Alexander, H. (2009).** Nutritional-Physiological Properties of Citrus Fruit Peel and Seed. *Nutrition Security Forall*.
- **Ghasemi, K., Ghasemi, Y., and Mohammed, A.E. (2009).** Antioxydant Activity, Phénol and Flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm.*, **22 (3)**: 277-281.
- **Girotti, A.W. (1998).** Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, **39**: 1523-1542.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Gonzalez-molina, E., Dominguez-perles, R., Moreno, D.A. ET Garcia-viguera. (2010).** Natural bioactive compounds of *citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**: 327-345.
- **Gordon, M.H. (1990).** *The mechanism of antioxidant in vitro*. In: "Food antioxidants": Ed. HUDSON B.J.F. pp: 1-18.
- **Gorinstein, S., Martin-belloso, O., Park, Y.S et al (2001).** Composition of some biochemical characteristics of different citrus fruit. *Food Chem*, 47(3): 115-309.
- **Grun, I., Barbeu, W.E., Crowther, J.B. (1996).** Change in headspace and peroxide value of undeorized menhaden oil over 20 weeks of storage. *Journal of agricultural and food chemistry*,
- **Gulçin, I., Huyut, Z.B., Elmastas, M., Hassan, Y. ET Aboul-Eein, d. (2010).** Radical scavenging and antioxydant activity of tannic acid. *Arabian Journal of chemistry*. **3**: 43-53.
- **Gutteridge, J.M.C. (1995).** Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *CLIN CHEM*, **41/12**: 1819-1 828.

H

- **Halliwell, B. (2007).** Dietary polyphénol: good, bad, or different for your health?, *Cardiovasc Res*, **73(2)**: 47-341.
- **Halliwell, B., Clement, M.V., Long, H.L. (2000).** Hydrogen peroxide in the human body. *Federation of European Biochemical Societies*, **486**: 10-13.

I

- **Ibrahim, M.I. ET Hegazy, A.E. (2012).** Antioxydant activities of orange peel extract. *Departement of Food science and technology*, **18(5)**: 684-688.

J

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G., Hara, Y. (1998).** Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal*, **7**: 137-161.

K

- **Kawaguchi, K., Kikuchi, S., Hasunuma, R., Maruyama, H., Yoshikawa, T., ET Kumazawa, Y. (2004).** A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection. Induced endotoxin shock in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **27(5)**: 679-683.
- **Kim, D. k., Lee, C.Y. (2004).** Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**: 253–273.

L

- **Ladoh Yemeda, C.F., Dibong, S.D., Nyegue, M.A., Djembissi Talla, R.P., Lenta Ndjakou, B., Mpondo, E., Yinyang, J., Wansi, J.D. (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*. **84**: 7636– 7643.
- **Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004).** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **3**: 21-33.
- **Lillo, C., Unis. And Peter, R. (2008).** Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment*, **31**: 787-601.
- **Liu R. H. (2004).** Potential Synergy of Phytochemicals in cancer prevention: Mecanisme of action. *The Journal of Nutrition*. **134**: 34795-34855.
- **Loussert, R. (1989).** *Les agrumes*. 2.paris : production Edition Lavoisier. 157 p.

M

- **Manach, C., Scalbert, A., Morand C., Remesy C., Amenez L. (2004).** Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American journal of Clinical Nutrition*. **79**: 727-747.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Manthey, J.A., Guthrie, N., ET Grohmann, K. (2001).** Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, **8**, 135-153.
- **Matés, J.M. (2000).** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, **84**, **153**: 83–104.
- **Marfak, A. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de pesticides.** Thèse de doctorat, Faculté de pharmacie, Université de LIMOGES-Ecole Doctorale Science Biologie Santé, Décembre 2003, p. 220.
- **Miladovic, S., Ivekovic, D. et Bozidar, S.G. (2006).** A novel amperometric method method for antioxydant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, **68**: 175-180.
- **Min, Y.K., In-Jung., Hyo, Y.L., Dong-Sun, L., Soon, J.I., Ji, H.K., Ji, H.B., Ji, Y.K. , Youn, J.L., Seo, R.J., Jung, H.K., Seo, H.M. (2012).** Characterization of the antioxidant properties of citrus mutants induced by Gamma-rays. *Life Science Journal*. **9 (3)**: 1495-1500.
- **Muthiah, P.L., Umamaheswari, M., Asokkumar, K. (2012).** In vitro antioxidant activities of leaves, fruit and peel extracts of citrus. *International Journal of Phytopharmacy*, **2(1)**: 13-20.

O

- **Ortuno, A.A., Baidez, P., Gomez, M.C., Arcas, I., Del-Rio, J.A. (2006).** Citrus paradise and *citrus sinensis* flavonoids: their influence in the defense mechanism against penicillium digitatum. *Food Chem*, **98(2)**: 58-351.

P

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Padrini, F., Lucheroni, M.T. (1996).** *Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies.* Paris : Ed. De Vecchi. pp.11, 15, 61 et 111.
- **Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A; Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C. (2002).** Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and no distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem.* **50**: 90–6882.
- **Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary. *J. Agric. Food Chem*, **53**: 4290-4302.
- **Prouillac, C. (2009).** *Synthèse et évaluation de nouveaux composés organique et phosphorés contre les effets des rayonnements ionisants. Etude de leur mécanisme d'action in vitro.* Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III.

R

- **Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., 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**: 75-87.
- **Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O., Bourdon, E ET Bahorun, T. (2011).** Polyohénol composition, vitamin C content and antioxydant capacity of mauritian citrus fruit pulp. *Food Research International*, 44: 2088-2099.
- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ET Rice-Evans, C. (1999).** *Antioxydant activity applying and inapoved ABTS radical cation decolorization assay free radical biology and medicine*, **26**: 1231-1237.
- **Rebereau-Gayon, p. (1968).** *Notion générale sur les composes phénoliques. In : les composés phénoliques des végétaux.* Edition Dunod, 1-40.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Ronccone, R., Barbieri, M., Monzani, E., Casella, L. (2006).** Reactive nitrogen species generated by heme proteins: Mechanism of formation and targets. *Coordination Chemistry Reviews*, (sous press).

S

- **Sanchez-Moreno, C. (2002).** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int*, **8(3)**: 121– 137.
- **Seung-cheol, L., Seok-Moo, J., So-Young, K, Dong-Ryul, K., Seong-Chun, J., Nam, K.C., ET Ahn, D.U. (2004).** Effet of Heat Treatment on the Antioxydant Activity of Extracts from Citrus Peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 3389-339.
- **Shaik, M., Harekrishna, R., Shaik, A.R. (2015).** Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of *Citrus Medica*. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, **3(4)**: 810-816.
- **Singleton, V.L and Esau, P. (1969).** Phenolic substances in grapes and wine and their significance. *Advances in Food research*.
- **Singleton, V., ET Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phénolics with phosphomotungstungstics acid reagent. *Am J Enol Viticulture*, **16**: 144-158
- **Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H. (1996).** *Fruit*. In “*Food composition and nutrition tables*”. Ed. CRC. pp: 892, 893, 928, 929.
- **Sultana, B., Anwar, F., Mushtaq, M. and Alim., M. (2015).** Citrus residues: A potential source of phenolics with high antioxidant values. *International Food Research Journal*, **22(3)**: 1161-1163.
- **Szabo, C. (2003).** Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 140-141,105-112.

T

- **Tripoli, E., Guardia, M., Gimmanco, S., DiMajo, D. ET Giammanco, M. (2007).** Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*, **104**: 466-479.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Tumbas Vesna, T., Cetkovic Gordana, S., Djilas Sonja, M., Canadanovic-Brunet Jasna, M., Vulic, K., Zeljko, K.J., Skerget, M. (2010).** Antioxydant activity of mandarin (citrus reticulate) peel. *BIBLID*, **40**: 195-203.

V

- **Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004).** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266: 37-56.
- **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact*, **160**: 1-40.
- **Valnet J. (2001).** La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot. pp: 207-281.

W

- **Webber, H.J., Reuther, W., ET Batcholor, L.D. (1967).** The citrus industry, volume 1: History, world distribution, botany and varieties. Edition. University of California press.

Site internet:

Anonyme. www.Iycos. Fr. Consulté le 18 janvier 2007.

ANNEXES

Annexe I : matériels et produits chimiques

1- Matériel du laboratoire

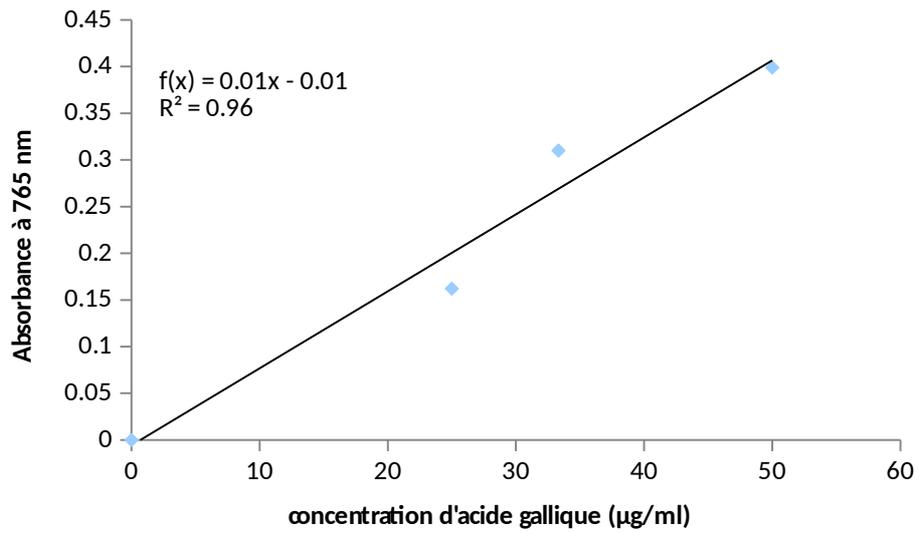
- La verrerie : tube à essai, bécher, erlenmeyer, flacon.
- L'appareillage
- Balance de précision (RADW AG^R (PS 600/C/2 et AS 220/C/2)).
- Etuve (WTC binder) et Etuve d'Incucell.
- Spectrophotomètre
- Ph mètre
- Autre : spatule, micropipettes (100 et 1000 µl), papier d'aluminium, papier absorbant, papier filtre, boîte de pétrie, tube à essais, anse en platine.

2- Les produits chimiques et les solvants

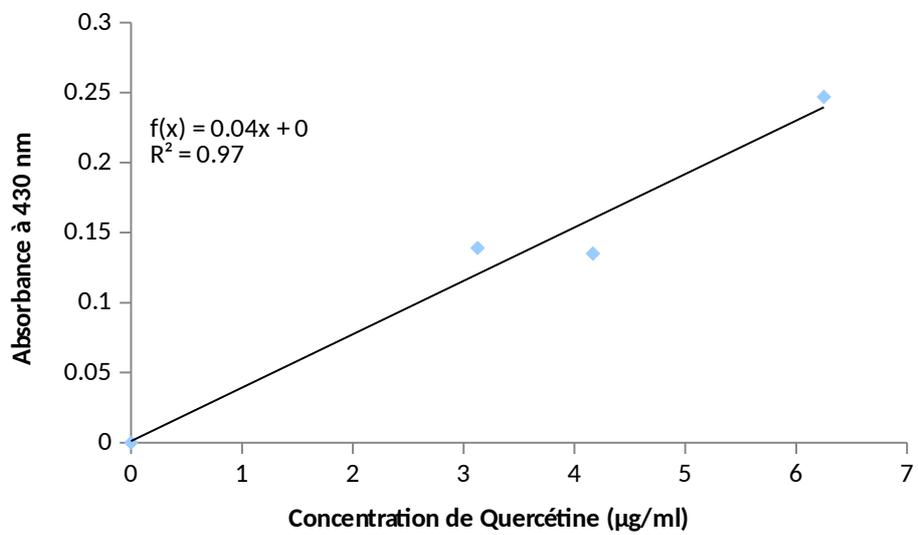
- Réactif de folin-ciocalteu (FCR).
 - Carbonate de sodium (Na₂CO₃).
 - Trichlorure d'aluminium (AlCl₃) et Acétate de sodium
 - Eau distillée, Ethanol, Méthanol.
 - Le DPPH
 - L'ABTS et persulfate de potassium
 - Réactif de GREISS
 - Thiocyanate de d'ammonium
 - Acide l'linoléique
- Les standards utilisés :
- Acide gallique
 - Quercitine
 - Vitamine C (Acide ascorbique) et BHA
 - TROLOX

Annexe II : les courbes d'étalonnage

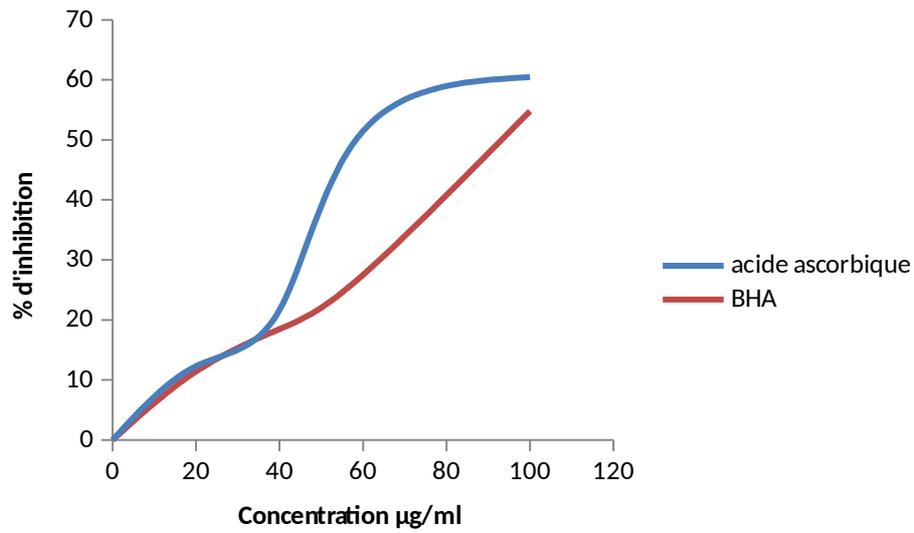
1. Courbe d'étalonnage (acide gallique) du dosage des polyphénols totaux



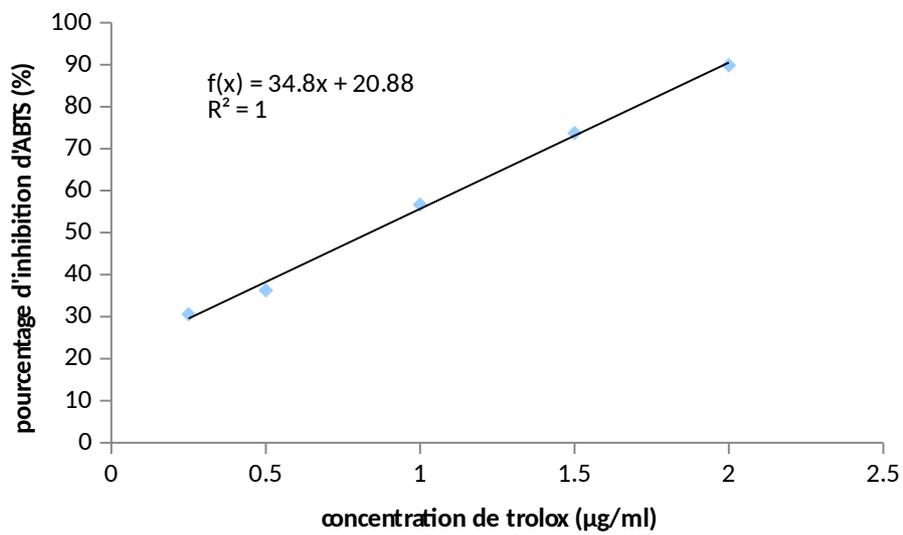
2. Courbe d'étalonnage (Quercétine) du dosage des flavonoïdes

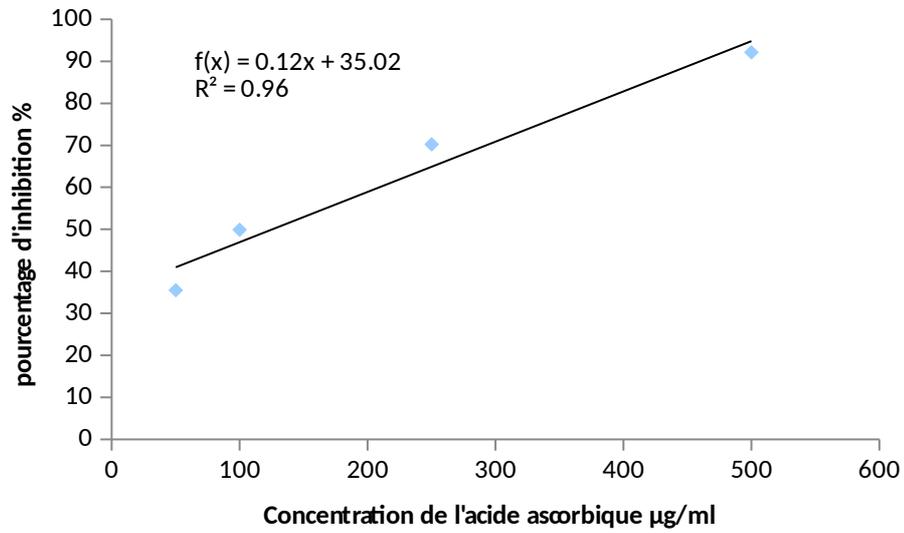
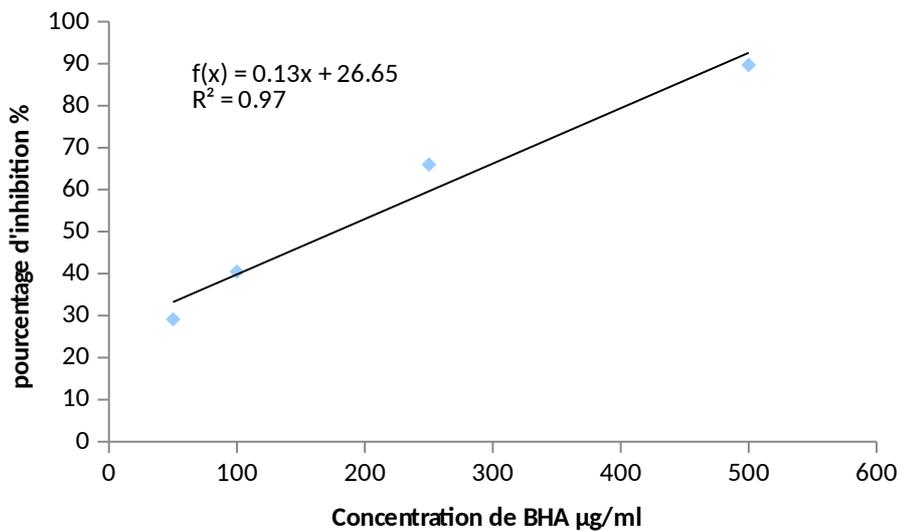


3. Courbe d'étalonnage de réduction du radical DPPH



4. Courbe d'étalonnage de réduction de la réduction du radical ABTS^{•+}



5. Courbe d'étalonnage de la réduction du radical NO (acide ascorbique et BHA)**a. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique****b. Courbe d'étalonnage de BHA**

Résumé : Les citrus comme d'autres fruits et légumes sont une source importante de différents antioxydants (polyphénols, caroténoïdes, acide ascorbique...etc) qui peuvent inhiber les effets néfastes des radicaux libres sur l'organisme humain. Des extraits éthanoliques des écorces et des pulpes de *citrus limon* et de *citrus sinensis* ont été testés pour leurs activités antioxydantes et leurs effets inhibiteurs de la peroxydation lipidique. Les composés phénoliques (polyphénols totaux et les flavonoïdes) extraits par le solvant d'extraction (éthanol) présentent des variations selon l'extrait et la variété. L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* a révélé des capacités antioxydantes chez tous les extraits. Les activités les plus potentielles par le mécanisme de piégeage des radicaux libres par la méthode de DPPH ont été prouvées par l'extrait écorce de *citrus limon* ($IC_{50} = 5,72$ mg/ml) lequel possède une activité très importante, et par la méthode d'ABTS, le plus grand TEAC était $0,213 \mu\text{g/ml}$ Trolox par mg d'extrait pour l'écorce de *citrus limon*. Pour le test de piégeage du radical NO l'extrait écorce de *citrus limon* a faible IC_{50} était $333.67 \mu\text{g/ml}$, on montre toujours que la partie écorce de *citrus limon* a un meilleur effet anti-radicalaire par rapport aux autres extraits. Pendant l'inhibition de la peroxydation lipidique de l'acide linoléique, tous les extraits ont présenté une bonne activité inhibitrice.

Mots-Clés : Citrus, polyphénols, activité antioxydante, DPPH, ABTS, NO, peroxydation lipidique

Abstract: Citrus as other fruit and vegetables are an important source of various antioxidants (polyphenols, carotenoids, ascorbic...etc) that can inhibit the harmful effects of free radicals on the human body. Ethanol extracts of peel and pulp of fruit belonging to *Citrus limon* and *Citrus sinensis* were tested for their antioxidant activities and their inhibitory effects of lipid peroxidation. Phenolic compounds (total polyphenols and flavonoids) extracted by the extraction solvent (ethanol) exhibit variations according to the extract and variety. The evaluation of the *in vitro* antioxidant power revealed antioxidant capacity in all variety. The most potential activities by DPPH method have been shown by *Citrus limon* peel extract ($IC_{50} = 5,72$ mg/ml) which has a very important activity, and by the method ABTS, the largest TEAC was $0,213 \mu\text{g/ml}$ per mg of extract to the peel of *Citrus limon*. For the trapping test radical NO, extract Citrus peel has low IC_{50} was $333.67 \mu\text{g/ml}$, it still shows that the peel of *Citrus limon* has a better anti-radical effect compared to other extract. Indeed, inhibition of linoleic acid revealed that samples exhibited good inhibitory activity.

Key words: Citrus, polyphenols, antioxidant activity, DPPH, ABTS, NO, lipid peroxidation

ملخص : الحمضيات مثل الفواكه والخضروات وغيرها تعتبر مصدرا هاما من مختلف المواد المضادة للاكسدة (البوليفينول، الكاروتينات وحمض الاسكوربيك ... الخ) التي يمكن أن تحول دون الآثار الضارة الناجمة عن الجذور الحرة في الجسم البشري. تم اختبار مقتطفات الإيثانول من اللحاء والحمضيات ليمون والحمضيات اللب صينية لنشاط المضادة للاكسدة والتأثيرات المثبطة لبيروكسيد الدهون. مركبات الفينول (مجموع البوليفينول والفلافونويد) المستخرجة من المذيب (الإيثانول) تختلف حسب المستخلص و النوع. تقييم في المختبر مضاد للاكسدة وكشف القدرة المضادة للاكسدة في كل المقتطفات. أكثر الأنشطة المحتملة من خلال آلية محاصرة من الجذور الحرة التي كتبها طريقة DPPH وقد ثبتت من الطمي قشور الحمضيات استخراج ($IC_{50} = 5.72$ ملغ / مل) التي لديها نشاط مهم جدا، وطريقة ABTS، كان أكبر TEAC 0.213 غرام / مل Trolox في ملغ من مستخلص لحاء ليمون الحمضيات. لمحاصرة اختبار جذري NO استخراج الطمي قشور الحمضيات لديها كان منخفضا IC_{50} 333.67 ميكروغرام / مل، فإنه لا يزال يدل على أن قشور ليمون الحمضيات لها تأثير أفضل لمكافحة الراديكالية مقارنة بالمقتطفات أخرى. لتثبيط بيروكسيد الدهون لحمض اللينولييك، فان جميع العينات لها نشاط كايح جيد.

كلمات المفتاحية : الحمضيات، البوليفينول، المضادة للاكسدة، NO، ABTS، DPPH، بيروكسيد الدهون