



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physicochimique

Mémoire de Master

Discipline : Science de la Nature et de la Vie

Option: Biochimie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante des
extraits de feuilles
de *Citrus limon***

Présenté par :

M^{lle}: LAGGOUN Tounes

M^{lle}: LOUNIS Amel

Membre de jury :

Présidente : D^r KHETTAL B.

Promoteur : M^r BASLI A. K.

Examineurs :- M^{lle} ADRAR S.

- M^r TACHERFIOUT M.

Grade et lieu :

M.C.A (UAMB).

M.A.A (UAMB).

M.A.B (UAMB).

M.A.B (UAMB).

Année :2012- 2013

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Dieu le tout puissant de nous avoir guidé vers le chemin du savoir et de nous avoir donné de la santé et de la patience pour réaliser ce travail.

Nous remercions

Notre promoteur M^r BASLI A. K, pour avoir accepté de nous encadrer ainsi que pour ses conseils et ses orientations.

On tient aussi

à exprimer notre gratitude au Dr KHETTAL B.

pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury.

« Dr, c'est un grand honneur pour nous qu'une grande comme vous soyez la présidente de notre jury ».

Nous tenons à remercier vivement

M^{elle} ADRAR S. et M^r TACHARFIUT M.

pas seulement pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner notre travail, mais aussi pour leurs aides si précieuses au niveau de laboratoire, pour leurs conseils et leurs orientations qui nous ont permis de s'affranchir des écueils rencontrés tout au long de la période de la réalisation de notre étude.

« M^{elle}, M^r, nous vous sommes très reconnaissantes ».

Nous adressons aussi nos remerciements à M^r BRJBI N. et à tous les enseignants qui ont contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Un grand merci s'adresse aussi

aux attachées du laboratoire Biologie moléculaire En particulier M^{me} ISSAADI F. et M^{lle} BELHADI S. sans elles notre travail sera plus difficile que ça, aussi pour le technicien de laboratoire BP M^r BOUCHENOVA F.

Merci à toute personne qui nous a aidé dans la réalisation de ce travail.

Dédicace

Nombreuses sont les personnes à qui je voudrais dédie ce travail et que je souhaite remercier non seulement pour m'avoir soutenue et aidé à réaliser ce travail mais aussi pour avoir donné un sens à ma vie. Je sais bien que sans eux rien n'aurait été possible.

*A mon âme, au plus cher être dans mon existence, à ma chère mère **FATIMA***

***Maman**, je ne trouve pas aujourd'hui les mots exacts pour vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour nous. Votre souci primordial a toujours été la réussite de tes enfants. Que vos sacrifices, vos peines et vos privations trouvent leur récompense dans l'aboutissement de ce modeste travail qui est le fruit de votre amour, de votre persévérance, de votre courage, de votre patience, de vos bénédictions et surtout votre éducation. Je voudrais à travers ce modeste travail, vous rendre un hommage mérité et vous dire combien je suis fière de vous. Que dieu vous protège et vous garde en bonne santé.*

A la mémoire de mes deux pères que Dieu les accueille dans son vaste paradis.

A vous mes très chères grandes mères : immasalîha et immabouha, je vous souhaite une longue vie pleine de santé.

A mon très cher frère mohandseghir et à mes adorables sœurs souâd et salima, je vous aime énormément, je vous souhaite toute la joie du monde. « Dieu merci pour ces trois trésors ».

A vous mes oncles paternels « dadda Omar et vava Razik » C'est une grâce d'être née dans une famille où l'Amour règne, les mots me manquent pour vous exprimer au quel point je tiens à vous, vous m'avez pas laissé un jour sentir l'absence de mon père, merci pour votre amour, vos encouragements ; aussi un grand merci à vos femmes « Malîka et Rachida » je suis très chanceuse d'avoir des tantes comme vous, merci pour votre amour, vos conseils et vos encouragements, je vous aime très fort.

A mes tantes naima et karima et à leurs familles.

A vous mes oncles maternels « khali rabeih, khali karim et khali razik », à vos femmes « Rahima, linda et dalila », à ma tante Djamilâ et à sa famille.

A vous cousins et cousines, je vous aime et je vous souhaite une belle vie pleine de succès.

A mes amies: Hadjila, Nassima, Nesrine, Hakîma, Lila, Nihad, Assia, Zineb, Affaf, Siham...

A mes copines de chambre durant mes 5 ans de résidence à la cité universitaire : Soussou, Saida, Ladjida, Naima, Nesrine, Hakîma, Monono, Simou, kôkô, Samia, Linda, Yamina, Tata, Houa, Zouzou, Wassila, Dalila, Nawal, Kahina et Lydia.

A mes voisins et voisines.

A tous mes enseignants de primaire jusqu' à l'université en particulier mon instituteur Ait Moula Mahandtiab.

A toute la promotion Biochimie Appliquée (2013).

*A **AMEL** et à toute sa famille.*



TOUNES

Dédicace

Je dédié ce travail

A la mémoire de celui qui me manque beaucoup; mon très cher Père que la clémence de Dieu soit sur lui et l'accueillait dans son vaste paradis, qui ma laissée un immense vide, que rien ne pourrait le remplacer. Mon cher père même si t'es pas la mais ton existence est éternel dans mon cœur.

A celle qui a consacré leur existence pour bâtir la mienne en m'offrant une éducation digne de confiance et qui m'a soutenu nuits et jours pendant tous mon parcours: A prunelle de mes yeux ma chère Mère, a qui je témoigne toute mon affection que dieu la protège et la garde en bonne santé incha Allah.

A ma grande sœur Mounira qui m'a conduit au chemin de la réussite qui n'a jamais cessé de me soutenir et sans qui, je ne serai pas arrivée à mes fins et à son marie Lamri et sa belle famille.

A mon cher frère Mohamed Amine qui guide toujours mes pas: son soutien sur tous les plans ne m'a jamais fait défaut. Mouh je te souhaite une très belle vie et une très bonne continuité dans tes études.

A une personne qui m'est très chère, A ma précieuse et adorable sœur Chaimapour son soutien, son assistance, son dévouement et surtout son amour, a qui je souhaite beaucoup de réussite.

A mon petit frère Acheraf le chouchou de la maison que j'aime beaucoup.

A ma chère tante Katiba et son marie Salim pour leurs amour et leurs support continu et pour leurs encouragement, consentis dans le soucie de ma réussite. Sans oublier leurs enfants: Nada, Nihade et Mohamed Zehir.

A mon cher grand père Slimen pour leurs encouragements, que Dieu le protège et le garde.

A ma cousine Hamamma et mes cousins Amer, Ibrahim, Mustapha et leurs familles.

A mes oncles Moussa, Djamel, Rabeh, Mabrouk et leurs familles.

A toutes mes belles sœurs et copines qui m'a toujours aidé et soutenu en particulier mes chères Fouazia, Hada, Zouzou, Nabila et leurs familles, sans oublier Koukou, Nounou et Warda.

A ma très chère et adorable amie et sœur Tounes avec laquelle j'ai partagé ce travail, pour son aide, sa gentillesse et pour sa générosité et qui a été toujours à mes cotés «Puisse Allah le tout puissant pérenniser notre lien d'amitié» ainsi que toute sa famille.

A mes enseignants et tous les étudiants de notre promotion Master II Biochimie Appliquée 2013 surtout Afef, Amel, Assia, Sihem et Zineb.

A tous ceux qui me sont chers et qui mon aidé pour réaliser ce travail de pris ou de loin.

A tous, je vous souhaite tous le bonheur du monde et que votre soleil éclaire tant et brille d'amour au quotidien.



AMEL

*La vie nous réserve parfois de grandes souffrances,
mais chacune d'elles nous aide à grandir ;
il faut juste apprendre à en tirer
le meilleur.*

Paulo Coelho

Sommaire

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I: Le stress oxydant et les antioxydants	3
I. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	3
I.1. Définition.....	3
I.2. Les principales espèces réactives de l'oxygène	4
I.3. Les sources des ERO dans l'organisme.....	4
I.4. Rôle des ERO	8
I.4.1. Rôle physiologique	8
I.4.2. Rôle physiopathologique des ERO ou « stress oxydatif ».....	8
I.4.2.1. Définition	8
I.4.2.2. Conséquences biochimiques du stress oxydatif	8
I.4.2.3. Conséquences pathologiques du stress oxydatif	10
II. Les antioxydants	11
II.1. Définition	11
II.2. Mode d'action	11
II.3. Rôle des antioxydants	11
II.4. Classification des antioxydants	12
II.4.1. Les antioxydants enzymatiques	12
II.4.2. Les antioxydants non enzymatiques	13
Chapitre II: Les composés phénoliques	16
I. Définition des polyphénols.....	16
II. Biosynthèse des composés phénoliques.....	16
III. Classification des composés phénoliques	18
IV. Rôles et intérêts des composés phénoliques.....	22
IV.1. Au niveau de la plante.....	22
IV.2. Chez l'Homme.....	22

Chapitre III: Généralité sur Citrus limon	25
I. Historique	25
II. Répartition géographique	25
III. Classification	26
IV. Description botanique.....	26
V. Composition biochimique de citron.....	27
VI. Usage thérapeutique traditionnel	28
VII. Activités biologiques liées aux polyphénols	28
Partie pratique	
Chapitre IV: Matériel et méthodes	31
I. Description et collecte de matériel végétal	31
II. Préparation du matériel végétal pour l'extraction	31
III. L'extraction des polyphénols	32
IV. Dosage des composés phénoliques	34
IV.1. Dosage des polyphénols totaux	34
IV.2. Dosage des flavonoïdes	34
IV.3. Dosage des tanins condensés " proanthocyanidines "	35
V. Evaluation de l'activité antioxydante.....	36
V.1. Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test DPPH	37
V.2. Evaluation du pouvoir réducteur	38
V.2.1. Test de ferricyanure de potassium	38
V.2.2. Test de phosphomolybdate d'ammonium.....	38
VI. Caractérisation des extraits de feuilles de <i>Citrus limon</i> par chromatographie sur couche mince (CCM)	39
VI.1. Principe de la CCM	39
VI.2. Mode opératoire	39
VII. Etude statistique	41
Chapitre V: Résultats et discussion	42
I. Taux d'extraction.....	42
II. Dosage des composés phénoliques.....	43

II.1. Dosage des polyphénols totaux	43
II.2. Dosage des flavonoïdes.....	45
II.3. Dosage des tanins condensés.....	46
III. Evaluation de l'activité antioxydante	48
III.1. Evaluation de pouvoir antiradicalaire par le DPPH.....	48
III.2. Pouvoir réducteur.....	50
III.2.1. Réduction de fer.....	50
III.2.2. Réduction de phosphomolybdate d'ammonium.....	52
IV. Caractérisation des extraits de feuilles de <i>Citrus limon</i> par chromatographie sur couche mince (CCM).....	54
Conclusion et perspectives.....	59
Références bibliographiques.....	61
Annexes.	

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AG : Acide gallique.

AlCl₃: Trichlorure d'aluminium.

ATP: Adénosine triphosphate.

BHA: Butyl hydroxyanisole.

BHT: Butyl hydroxytoluène.

CAT: Catalase.

DHLA: Acide dehydrolipoïque.

DPPH: 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

E. Eth: Extrait éthanolique.

E. Méth: Extrait méthanolique.

E. Chlo : Extrait chloroformique.

ERO : Espèce réactive de l'oxygène.

Fe²⁺ : Fer ferreux.

Fe³⁺ : Fer ferrique.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

SOD : Superoxyde dismutase.

G₆PD: Glucose -6-phosphate- déshydrogénase.

GPx : Glutathion peroxydase.

GR : Glutathion réductase.

GSH : Glutathion.

GSSG : Glutathion-disulfure.

HDL : high density lipoprotein.

HIV : Human Immuno-deficiency Virus

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HOCL : Acide hypochlorique.

HO₂⁻ : Radical perhydroxyle.

H₃ PW₁₂ O₄₀ : Acide phosphotungstique.

H₃ PM₁₂ O₄₀ : Acide phosphomolybdique.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50 % de radical DPPH.

LDL : Low density lipoprotein.

LA : Acide lipoïque,

LOO•: Radical peroxyde lipidique.

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

Mg EC/g ES : Milligramme d'équivalent catéchine par gramme d'extrait sec.

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

Mo₈ O₂₃ : Oxyde de molybdène.

Na₂ CO₃ : Carbonate de sodium.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NO• : Monoxyde d'azote.

O°: Oxygène radicalaire libre.

OH• : Radical hydroxyle.

¹O₂ : Oxygène singulet.

O₂⁻ : Anion superoxyde.

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

PEP : Phosphoénolpyruvate.

PL: Polyphénols.

R°: Radical libre.

R_f: Rapport frontal.

RH : Acide gras polyinsaturé.

RL : Radical libre.

RO• : Radical alkoxyde.

ROO• : Radical peroxyde.

ROOH : Hydroperoxyde.

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise.

TCA : Acide trichloracétique.

UV : Ultra-violet.

W₈ O₂₃ : Oxyde de tungstène .

Liste des figures

Figure N°1: La cascade de formation des ERO.....	7
Figure N°2 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire.....	9
Figure N°3 : Etapes de la défense enzymatique contre les ERO.....	13
Figure N°4 : Réaction d'élimination des radicaux lipidiques par les vits E et C.....	14
Figure N°5: Les vois de biosynthèse des composés phénoliques.....	17
Figure N°6: Structures des acides hydroxybenzoïques.....	19
Figure N°7: Structures des acides hydroxycinnamique.....	19
Figure N°8: Squelette de base des flavonoïdes.....	20
Figure N°9: Structure chimique des tanins.....	21
Figure N°10 : Chélation des ions métalliques par les Flavonoïdes.....	24
Figure N°11 : Répartition géographique du citrus limon à travers le monde.....	25
Figure N°12 : Photographie des feuilles de citrus limon.....	31
Figure N°13 : Formation de l'adduit de vanilline.....	36
Figure N° 14 : Photographie de la cuve utilisée pour la CCM.....	41
Figure N°15: Taux d'extraction des polyphénols des feuilles de <i>Citrus limon</i>	42
Figure N°16 : La coloration apparue lors de dosage des polyphénols totaux.....	43
Figure N°17 : Les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits des feuilles de <i>Citrus limon</i>	44
Figure N°18 : Les teneurs en flavonoïdes dans les extraits des feuilles de <i>Citrus limon</i>	45
Figure N°19 : Les teneurs en tanins dans les extraits des feuilles de <i>Citrus limon</i>	46

Figure N°20 : L'évaluation de pouvoir antiradicalaire en fonction des concentrations des extraits.....	48
Figure N°21: Valeurs des IC ₅₀ obtenues pour les extraits et les standards.....	49
Figure N°22: L'évaluation de la réduction de fer ferrique par le BHA et les extraits des feuilles de <i>Citrus limon</i>	51
Figure N°23: Représentation graphique de l'évaluation de la réduction de Mo ⁺⁶ par les extraits des feuilles de <i>Citrus limon</i>	52
Figure N°24 : Pourcentage de réduction de Mo ⁺⁶ par les extraits et les standards.....	53
Figure N°25 : Chromatogramme des extraits des feuilles de <i>Citrus limon</i> à l'œil nu.....	55
Figure N°26: Chromatogramme des extraits des feuilles de <i>Citrus limon</i> observé sous une lampe UV à 365nm.....	56

Liste des tableaux

Tableau I: Les principales ERO rencontrées dans les systèmes biologiques.....4

Tableau II: Les principales classes de composés phénoliques.....18

Tableau III: Les caractéristiques botaniques des différents organes du citronnier.....26

Tableau IV : Les différents systèmes de migration utilisés pour la CCM.....40

Tableau V : Les rapports frontaux des standards.....57

Tableau VI: Les R_f des taches issues des extraits des feuilles de *Citrus limon*.....57

Introduction



« Que ton alimentation soit ta première médecine »

Hippocrate.

Introduction

Les plantes ont toujours émerveillé l'homme par la beauté de leurs couleurs, la forme de leurs fleurs ou de leurs fruits. Il les considère comme des compagnes fidèles vers lesquelles il se retourne en raison des bienfaits qu'elles procurent et pour leur grande utilité, ce sont de vraies panacées et de véritables pharmacies naturelles.

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales qui sont considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques douées des différentes activités biologiques y compris l'activité antioxydante et qui peuvent être l'arme permettant de faire face au stress oxydant qui est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution. Parmi ces composés phytochimiques qui suscitent un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs : les composés phénoliques.

L'intérêt des composés phénoliques en tant que antioxydants naturels utilisés pour la conservation des aliments ou dans différentes préparations pharmaceutiques ou cosmétiques est en croissance continue à fin de remplacer les antioxydants synthétiques qui sont limités par leur éventuelle toxicité mais aussi pour faire face au stress oxydatif qui est la cause principale des différentes maladies tels que le cancer et les maladies cardiovasculaires. De ce fait, une recherche de nouvelle source d'antioxydants naturels qui pourraient être efficaces et sains s'avère extrêmement indispensable dans le souci de substituer les composants de synthèse.

Citrus limon, plante de la famille des Rutacées dont le fruit « citron » est très connu pour ses effets thérapeutiques, où se trouve une composition non négligeable de composés bioactifs. En effet, les feuilles de *Citrus limon* portent aucune attention particulière à l'égard des chercheurs, mis à part quelques études préliminaires. C'est dans ce contexte que nous avons entrepris ce travail dans le but de doser les composés phénoliques des feuilles de *Citrus limon* ainsi que l'évaluation de leur activité antioxydante espérant être une nouvelle source de polyphénols.

Notre travail est divisé en deux parties: la première partie est une étude bibliographique constituée de trois chapitres : le premier chapitre est consacré à l'étude

du stress oxydatif , en particulier la notion des radicaux libres biologiques, le système de défense antioxydant et les cibles du stress oxydant. Le second chapitre traite les polyphénols ; leur classification et leurs rôles biologiques, enfin, dans un dernier chapitre de la première partie, un survol bibliographique sur la plante « *Citrus limon* » et sa place en médecine traditionnelle.

La seconde partie est constituée de deux chapitres : le premier est consacré à décrire le matériel et les méthodes utilisés lors du travail expérimental qui porte sur le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tannins) extraits par différents solvants, l'évaluation de l'activité antioxydante par différents tests et en fin une analyse des différents extraits phénoliques par la méthode de chromatographie sur couche mince. Le deuxième chapitre de cette partie expose l'ensemble des résultats obtenus et la discussion.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Le stress oxydant et les antioxydants

Chapitre I : Le stress oxydant et les antioxydants

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est la source de la production des espèces réactives de l'oxygène et y compris les radicaux libres, la surproduction de ces espèces est à l'origine de l'apparition de stress oxydatif cause principale dans l'apparition de plusieurs maladies.

- On désigne quoi par “ espèces réactives de l'oxygène ” et quel est leur rôle dans l'organisme ?
- C'est quoi le stress oxydatif et quels sont ses effets ?
- Est-ce que notre organisme est doté d'un système de défense contre ce dernier ?

I. Les espèces réactives de l'oxygène(ERO)

I.1. Définition

Une espèce réactive de l'oxygène ERO (ou Réactive Oxygen Species : ROS en anglais) est un radical oxygéné ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} ...) ou une molécule pouvant produire des radicaux libres (H_2O_2 ...). Ces espèces chimiques très instables et très réactives sont produites d'une manière continue asein de notre organisme dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques(**Garait, 2006**).

- **Les radicaux libres (RL)**

Les radicaux libres sont des atomes ou molécules qui contiennent un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche orbitale la plus externe, ce qui leurs confère une grande instabilité et une forte réactivité(**Gardes-Albert et al.,2003**).Ils cherchent la stabilité par appariement avec des électrons arrachés sur les molécules les plus proches, ce qui va entrainer une réaction en chaine où la neutralisation d'un radical passe par la création d'un autre (**Berger, 2006**). Ceci explique que la production d'un premier radical libre peut causer d'importantes lésions dans une cellule (**Garait, 2006**).

Les radicaux libres sont issus du métabolisme physiologique mais ils peuvent aussi être produits lors de « déviations » du métabolisme cellulaire (**Garait, 2006**).

I.2. Les principales espèces réactives de l'oxygène

Parmi toutes les espèces réactives de l'oxygène susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer trois groupes (**Favier, 2003**) :

- Les radicaux primaires, qui constituent un ensemble restreint de composés radicalaires qui dérivent directement de l'oxygène par des réductions à un électron.
- Les radicaux secondaires, se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.
- Les espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène qui sont douées d'une réactivité semblable aux RL et qui peuvent être des précurseurs de ces derniers.

Les principales ERO rencontrées dans les systèmes biologiques sont montrées dans le tableau I(**Belkheiri, 2010**).

Tableau I: Les principales ERO rencontrées dans les systèmes biologiques (**Belkheiri, 2010**).

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
O_2^- : Anion superoxide $OH\cdot$: Radical hydroxyle HO_2^- : Radical perhydroxyle $RO\cdot$: Radical alkoxyde $ROO\cdot$: Radical peroxyde $NO\cdot$: Monoxyde d'azote	1O_2 :Oxygène singulet H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène $ROOH$: Hydroperoxyde $HOCl$: Acide hypochlorique $ONOO^-$: Peroxynitrite

Il existe deux sources pour la production des ERO : endogène et exogène (**Salvayre et al., 2003**).

I.3.1. Sources endogènes

- **La mitochondrie**

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1)) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présent dans le

complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale ; $O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2 H_2O$ (1).

Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron, réaction (2)) conduisant à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$): $O_2 + 1 e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ (2).

La mitochondrie est considérée comme la principale source d'ERO, elle produit en effet 90% des ERO cellulaires (Gardes-Albert *et al.*, 2003).

- **La NADPH oxydase**

La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes . En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $O_2^{\cdot-}$. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Piotrowski et Marczak, 2000).

- **L'auto-oxydation des petites molécules**

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source des ERO, le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l' $O_2^{\cdot-}$. Ainsi, l'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives, notamment lors de la maladie de Parkinson (Kanoun, 2011).

- **La xanthine oxydase**

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie, lors de cette oxydation, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\cdot-}$ selon la réaction :



- **Le réticulum endoplasmique lisse**

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ERO. Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum (Servais, 2004).

- **Les peroxysomes**

Les peroxysomes sont une importante source de production d'H₂O₂ cellulaire, ce dernier est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d'H₂O₂ produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase (Garait, 2006).

I.3.2. Sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres parmi eux :

-Les rayonnements : sont par différents mécanismes des sources de RL, qu'il s'agisse des rayons ionisants X ou gamma, ou des rayons ultraviolets capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation de photosensibilisants (Favier, 2003).

-Le sport intensif ou mal géré (Pincemail et al., 1998).

-Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (2NO), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse des RL, ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (Milane, 2004).

-L'ingestion excessive d'alcool est suivie de la formation des radicaux libres selon divers mécanismes : la xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d'O₂⁻. L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH-cytochrome réductase, et du cytochrome P450. De même, les

concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère(SchisleretSingh,1989).

-La fumée de cigarette joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires : elle contient NO et NO₂, renferme de fortes concentrations en composés insaturés et stimule, par son action irritante, les macrophages des alvéoles pulmonaires(Milane,2004).

-Certain médicament tels que les antibiotiques anticancéreux (les anthracyclines) sont également capables de générer des ERO. La formation de ces espèces serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité (Sinha et al., 1989).

- Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) mais aussi le fer génèrent en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) des radicaux hydroxyles très réactifs par une réaction appelée réaction de Fenton. Les particules inhalées telles que l'amiante et/ou la silice sont aussi des sources de RL (Milane,2004).

- Le stress psycho-social (MacheNkouadou, 2010).

- Une alimentation pauvre en fruits et légumes (Pincemail et al., 1998).

❖ Tel que soit la source de production, les ERO se forment en cascade (figure N°1)

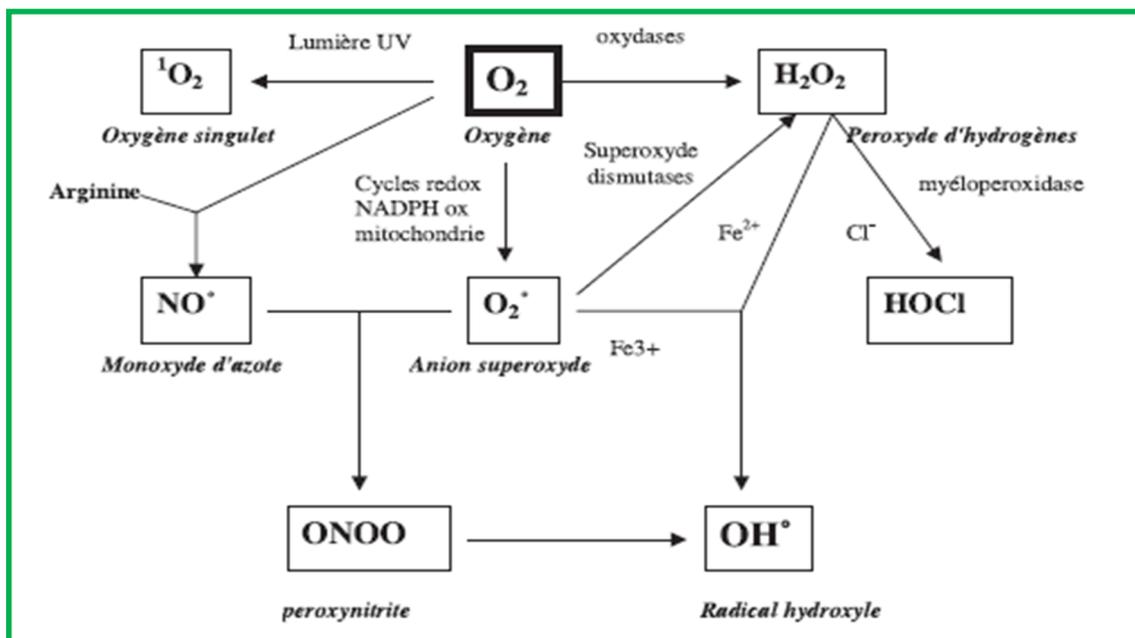


Figure N° 1:La cascade de formation des ERO(Favier, 2003).

I.4. Rôle des ERO

Les ERO peuvent avoir un rôle physiologique ou pathologique en fonction de leur concentration. Dans les circonstances quotidiennes normales, les ERO sont produits en permanence en faible quantité et jouent un rôle physiologique très important mais en très grande quantité, les ERO deviennent très pathogènes (**Haleng et al., 2007**).

I.4.1. Rôle physiologique

Les ERO sont des molécules indispensables à la vie, ils remplissent de très nombreuses fonctions utiles qui, à part la phagocytose, ont été découvertes récemment. Ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule et la régulation des gènes par le phénomène appelé contrôle redox des gènes (**Favier, 2003**).

I.4.2. Rôle physiopathologique des ERO ou « stress oxydatif »

Dans certaines conditions, la production des ERO peut devenir très intense, dans ce cas elles vont transformer d'espèces indispensables à la vie aux espèces très pathogène, leur principal effet pathogène est la genèse du stress oxydatif qui est à l'origine des différentes maladies.

I.4.2.1. Définition

Le stress oxydant (oxydatif) correspond à un déséquilibre entre la génération ERO et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (**Haleng et al., 2007**). Ce déséquilibre entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire (**Bouldjadj, 2009**).

I.4.2.2. Conséquences biochimiques du stress oxydatif

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) (**Favier, 2003**).

- **Oxydation de l'ADN**

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque des RL, cinq classes principales des dommages oxydatifs médiés par $\text{OH}\cdot$ peuvent être générées. Parmi elles: les bases oxydées, les sites abasiques et les cassures de brins.

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement les guanines, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8 oxo guanine, 8 nitroguanine, 8 oxo adénine, 5 hydroxy cytosine, 5 hydroxy méthyl uracile, thymine diol, oxazolone ...

Le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (figure N°2) (Favier, 2003).

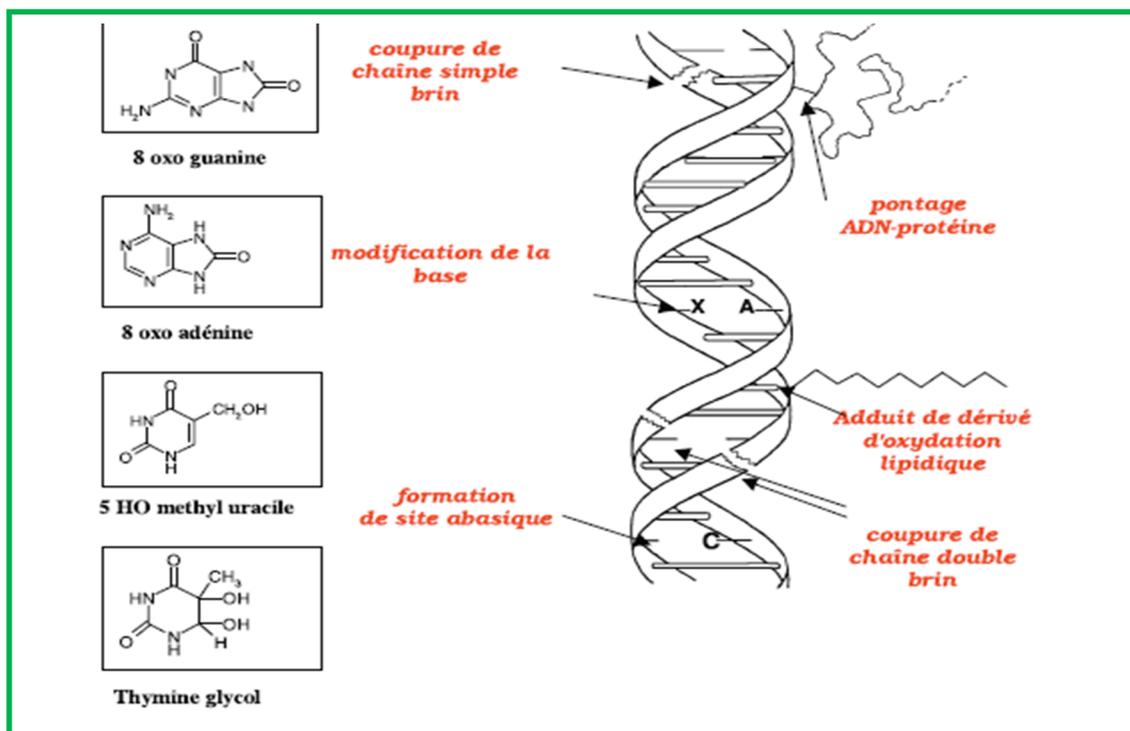


Figure 2 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (Favier, 2003).

- **Oxydation des lipides**

Le radical hydroxyle est à l'origine de la peroxydation lipidique des acides gras et plus. Ce processus oxydatif altère essentiellement les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires, en particulier les acides arachidoniques, linoléiques et linoléniques.

La peroxydation lipidique provoque une désorganisation des membranes (cellulaire, HDL, LDL), entraînant une inactivation des systèmes enzymatiques membranaires, une diminution de la fluidité et une perte de la perméabilité sélective, pouvant conduire à la mort de la cellule (**Bonnot, 2009**).

- **Oxydation des protéines**

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique) (**Haleng et al., 2007**).

- **Oxydation des lipoprotéines :**

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. Les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose) (**Favier, 2003**).

I.4.2.3. Conséquences pathologiques du stress oxydatif :

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution, il mettra en jeu des espèces radicalaires différentes.

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des ERO, parmi ces maladies on cite : le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, l'œdème pulmonaire et le vieillissement accéléré.

Il est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel le diabète, maladie d'Alzheimer, rhumatismes et maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

- ❖ L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses contre la surproduction d'ERO, ces systèmes sont désignés par le terme «**antioxydants**»

II. Les antioxydants

II.1. Définition

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat (**Abuja et Albertini, 2001**), et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire (**Durackova et al., 2008**).

II.2. Mode d'action

Les antioxydants peuvent jouer leur rôle à différents niveaux du processus oxydatif :

- En prévenant la formation des ERO.
- En chélatant les catalyseurs des réactions d'oxydation tels que les ions métalliques.
- En piégeant les ERO.
- En bloquant leurs (ERO) propagations soit par la libération d'un atome d'hydrogène par une structure aromatique (polyphénols ...), soit par la libération d'un électron.
- En éliminant les biomolécules endommagées par oxydation, ainsi que d'autres types de réactions (**Huang et al., 2005**).

II.3. Rôle des antioxydants

En plus de leur rôle biologique très important comme molécules de défense contre le stress oxydatif, les antioxydants sont très utiles pour l'industrie. Ils sont utilisés :

- Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc.
- En métallurgie, pour protéger les métaux de l'oxydation.
- Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.
- Dans l'industrie -teinturerie - par exemple pour éviter l'oxydation des colorants au soufre lors de la teinture.
- Dans les produits pharmaceutiques et cosmétique afin d'éviter leur dégradation (**Mache Nkouadou, 2010**).

II.4. Classification des antioxydants

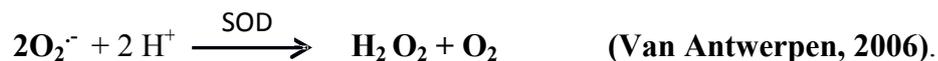
Les antioxydants peuvent être classés en deux principaux groupes : les antioxydants enzymatique et non enzymatique (VenkatRatnam et al., 2006).

II.4.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO, on note principalement la superoxyde dismutase(SOD), la catalase(CAT) et les glutathions (peroxydase 'GPx' et reductase' GR') (VenkatRatnam et al., 2006).

- **Les superoxydesdismutases (SOD)**

La famille des superoxydes dismutases comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont le rôle est la dismutation des anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives H₂O₂ et O₂,selon la réaction:



L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre, zinc et manganèse (Goudable et Favier, 1997).

- **Les catalases**

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en libérant de l'oxygène et de l'eau, elles sont localisées surtout dans les peroxysomes:



- **Les glutathions peroxydases et réductases**

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d' une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools, une réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG), quant à la glutathion réductase (GR), elle a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG (Marfak, 2003).

Les étapes de la défense enzymatique contre les ERO sont illustrées dans la figure N°3.

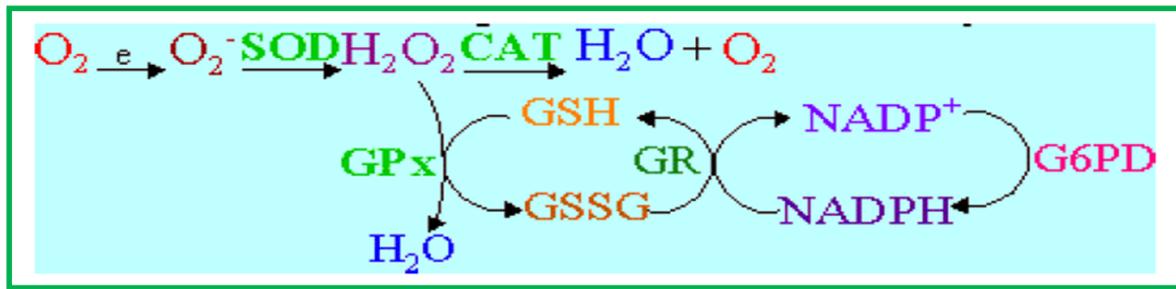


Figure N°3: Etapes de la défense enzymatique contre les ERO (Wilson et Salamatia,2003).

II.4.2. Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant principalement les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C, les caroténoïdes et les polyphénols (Venkat Ratnam et al., 2006).

- **La vitamine E**

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les α -, β -, γ - et δ -tocophérols et tocotriénols (Curtay et Robin, 2000). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein de la membrane biologique riche en acides gras polyinsaturés (RH) où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique (Pincemail et al., 1998).

- **La vitamine C (acide ascorbique)**

La vitamine C ou acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur, la plupart des mammifères sont capables de la synthétiser dans leur foie ou dans leurs reins, contrairement à l'homme qui doit l'assurer par l'alimentation. La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des ERO (HO^{\cdot} ou $O_2^{\cdot -}$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique (figure N°4) en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques (Haleng et al., 2007).

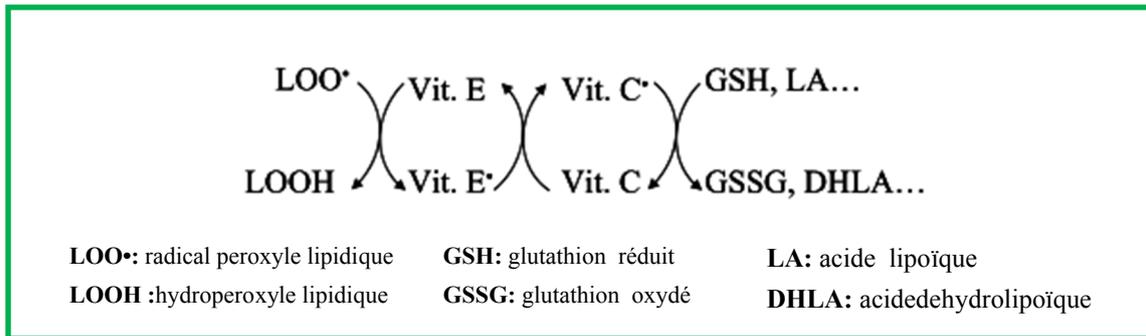


Figure N°4: Réaction d'élimination des radicaux lipidiques par les vits E et C(Garait, 2006).

- **Les Caroténoïdes**

Ces composés sont des pigments liposolubles de couleur jaune, orange à rouge. Ils exercent différentes fonctions biologiques, dont certaines, préviennent ou contrôlent efficacement la génération des radicaux libres (Curtay et Robin, 2000), en particulier le β -carotène, un précurseur de la vitamine A, il a un effet antioxydant très puissant (Pelli et Lyly, 2003).

- **Glutathion**

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation (Stamler et Slivka, 1996). En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHPX. Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vitamine C ou la vitamine E (Gerard-Monnier et Chaudière, 1996).

- **Les oligoéléments**

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique : la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium (Garait, 2006).

- **Les composés phénoliques**

Un très grand nombre de données expérimentales a permis de définir des propriétés antioxydantes très importantes des composés phénoliques ainsi que leur implication dans la prévention des maladies liées au stress oxydatif (**Rock, 2003**). Ils sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus prooxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique, de plus, ils ont une activité chélatrice des métaux tels que le cuivre et le fer à l'état libre (**Curtay et Robin, 2000**).

L'intérêt des polyphénols comme antioxydants naturels devient de plus en plus très important à cause des diverses études expérimentales montrant la toxicité des antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) (**Yu et al, 2000**).

Chapitre II
Les composés
phénoliques

Chapitre II : Les composés phénoliques

A côté des métabolites primaires (glucides, protéides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment d'autres métabolites dits « secondaires », dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme. Ces métabolites font l'objet de nombreuses recherches, notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme antioxydants.

I. Définition des polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. Ils constituent l'un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures présents dans tous les organes de la plante (**Lugasi et al., 2003**).

Les polyphénols sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques et possèdent d'autres fonctions (alcoolique, carboxylique...). Ils regroupent un vaste ensemble de substances chimiques présentant toutes un point en commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004**).

II. Biosynthèse des composés phénoliques

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont :

II. 1. La voie de l'acide shikimique

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde. La première réaction de cette voie est la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate pour former au bout de plusieurs réactions enzymatiques l'acide chorismique, celui-ci se transforme en acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine) qui, par désamination, donne des acides cinnamiques, producteurs de la majorité des acides phénoliques (figure N°5) (**Richter, 1993**).

II. 2. La voie de l'acide acétique

Les systèmes aromatiques sont aussi formés par condensation répétée d'unités acétate (**Richter, 1993**). Cette voie donne naissance aux flavonoïdes dont le squelette de base est une chalcone qui a une origine biosynthétique mixte : d'une part 3 molécules d'acétyl Co A pour le cycle A et d'autre part une molécule de *p*-coumaryl CoA pour le cycle B et l'hétérocycle C (figure N°5) (**Macheix et al., 2005**).

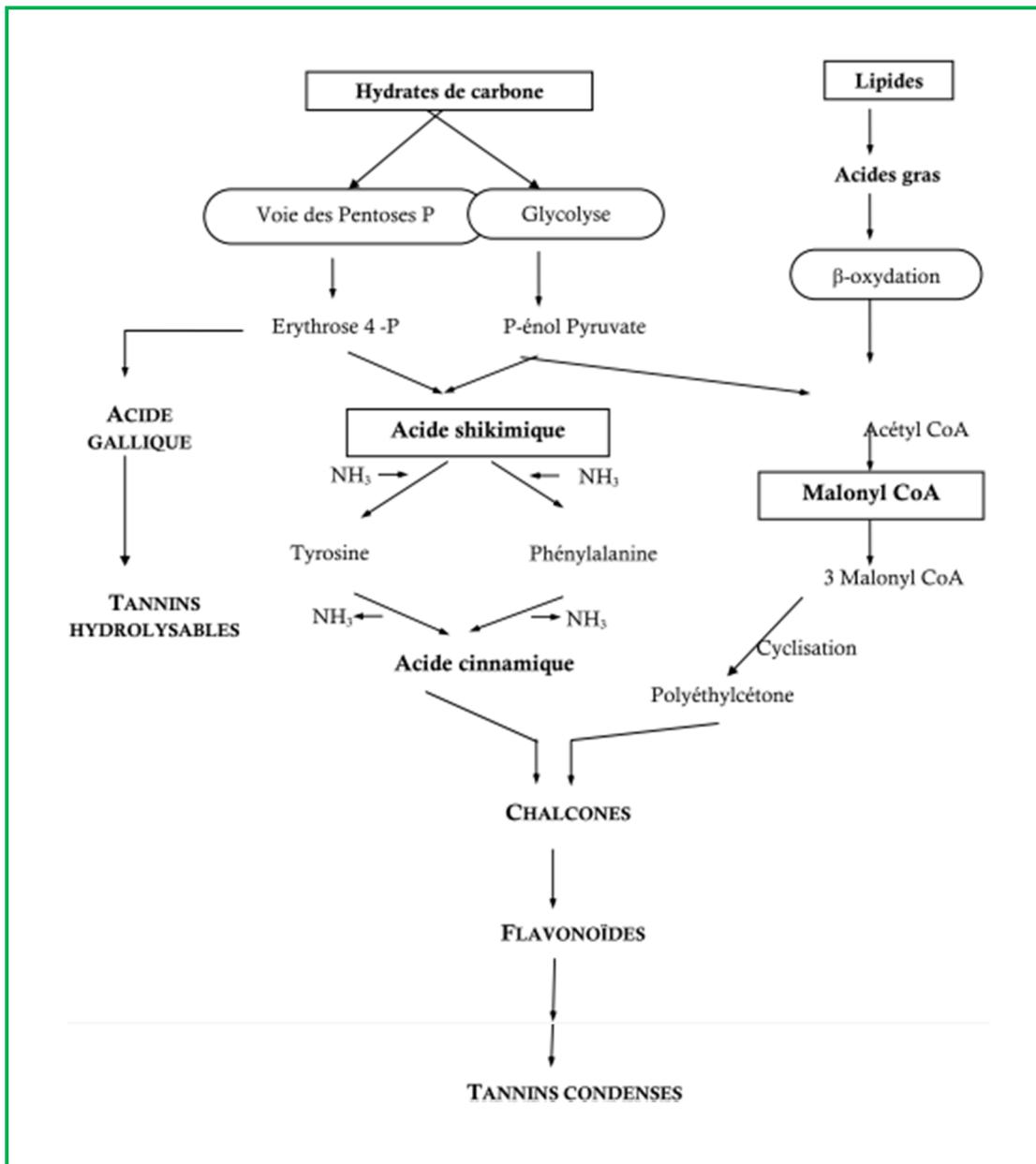
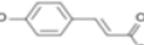
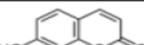
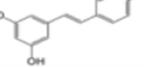
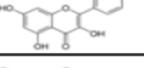
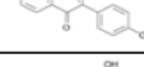
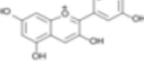
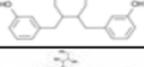
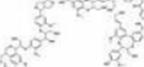
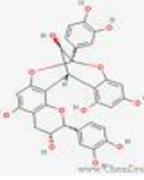


Figure N°5: Les vois de biosynthèse des principaux groupes des composés phénoliques (**Macheix et al., 2005**).

III. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes, qui se différencient d'abord par: la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation) et, enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides et protéines) (Macheix *et al.*, 2005; Beta *et al.*, 2005). Les différentes classes de polyphénols sont regroupées dans le tableau II.

Tableau II: Les principales classes de composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005)

COMPOSES PHENOLIQUES				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Origine
C6	<u>Phénols simples</u>	Hydroquinone		Busserole
C6-C1	<u>Acides hydroxybenzoïques</u>	Acide p-hydroxybenzoïque		Epices, fraises
C6-C3	<u>Acides hydroxycinnamiques</u>	Acide p-coumarique		Tomates, ail
	<u>Coumarines</u>	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	<u>Naphtoquinones</u>	Juglone		Noix
C6-C2-C6	<u>Stilbénoides</u>	Trans-resvératrol		Raisin
	<u>Flavonoïdes</u>	Kaempférol		Fraises
	<u>Isoflavonoïdes</u>	Daidzéine		Graines de soja
(C6-C3) ₂	<u>Anthocyanes</u>	Delphinidol		Raisin Cabernet-Sauvignon
	<u>Lignanes</u>	Entérodiol		Bactéries intestinales
(C6-C3) _n	<u>Lignines</u>			Bois, fruits à noyaux
(C6-C3-C6) _n	<u>Tanins condensés</u>	Procyanidol		Raisins, kaki

III.1. Acides phénoliques

Ils regroupent deux classes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Vattem *et al.*, 2005).

- **Acides hydroxybenzoïques**

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type (C₆-C₁) (figure N°6). Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides (Macheix *et al.*, 2005; Bellebcir, 2008).

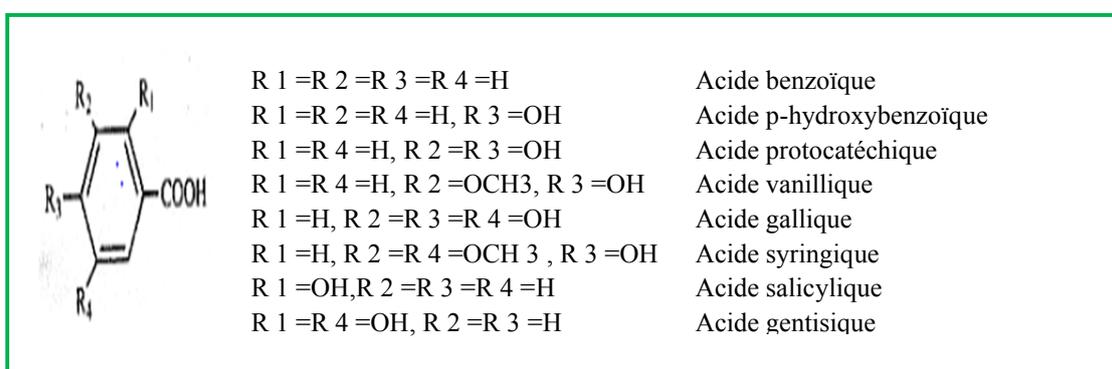


Figure N°6: Structures des acides hydroxybenzoïques (Laguerre *et al.*, 2007).

- **Acides hydroxycinnamiques**

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique grâce à des substitutions au niveau du cycle aromatique (figure N°7) (Psotova *et al.*, 2003).

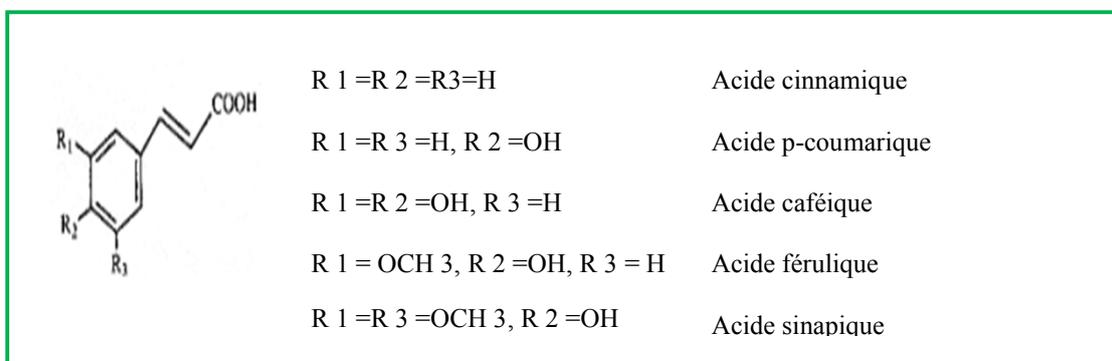


Figure N°7: Structures des acides hydroxycinnamique (Laguerre *et al.*, 2007).

III.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants dans l'alimentation humaine, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. On les trouve d'une manière très générale localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles (**Marfak, 2003**).

Ces composés possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones C₆-C₃-C₆, constitué de deux noyaux aromatiques A et B reliés par un hétérocycle oxygéné cycle C (figure N°8) (**Terrier et al., 2009**).

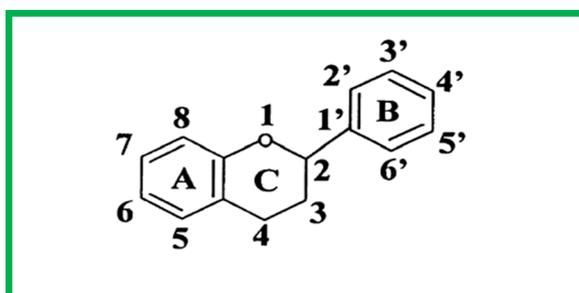


Figure N°8: Squelette de base des flavonoïdes(**Heim et al., 2002**).

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés, selon **Hanet al.,(2007)**, ils sont principalement divisés en:

- **Anthoxanthins:** un groupe de composés incolores divisé en plusieurs catégories, y compris les flavones, les flavonols, les flavanes, les flavanols, les isoflavones et leurs glycosides;
- **Anthocyanines:** des dérivés glycosylés des anthocyanidines, présents dans les fleurs colorées et les fruits.

II.3. Tannins

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Daltons, et qui présentent à côté des réactions classiques des polyphénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (**Zimmer et Cordesse, 1996; Han et al.,2007**).

Selon un critère de structure, les tanins sont divisés en deux groupes : les tanins condensés et les tanins hydrolysables (figure N°9) (Zimmer et Cordesse, 1996):

- **Les tanins condensés**

Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ol dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères. Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (Krause et al., 2005).

- **Les tanins 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 (enzymatique), 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 élлагique (Krause et al., 2005).

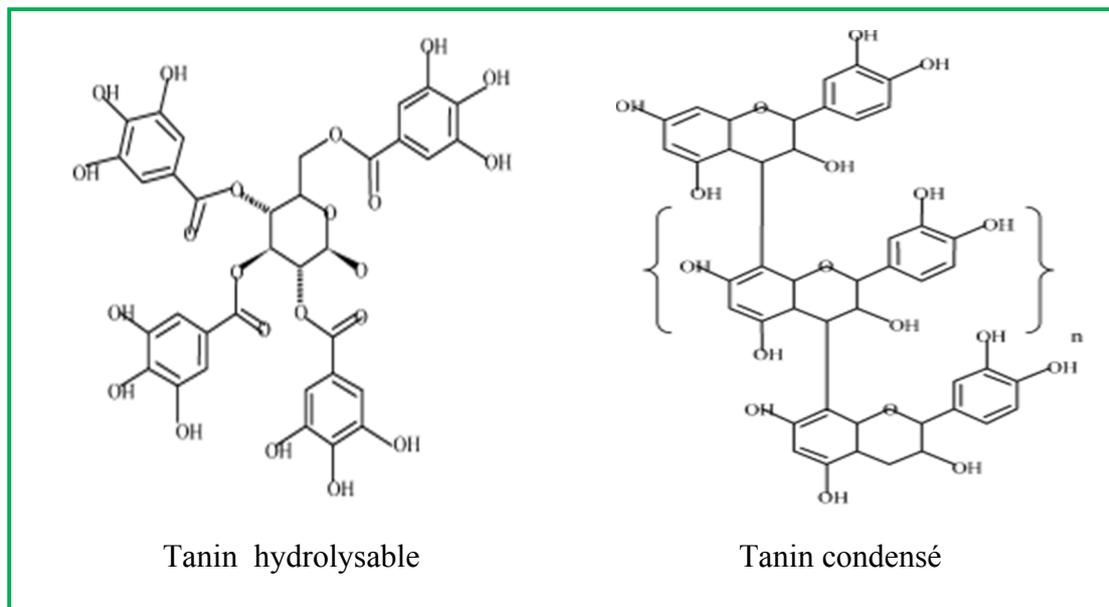


Figure N°9: Structure chimique des tanins(Krause et al., 2005).

II.4. Lignines

Les lignines sont des polymères aromatiques de poids moléculaire élevé (entre 10 000 et 20 000 Daltons), résultent de la polymérisation tridimensionnelle de

trois unités phénoliques de base dénommées monolignols qui sont des alcools coumariliques, coniféryliques et sinapyliques. Elles renforcent les propriétés mécaniques des tissus de soutien des tiges et des troncs, elles participent à la défense des plantes en constituant une barrière moléculaire efficace contre les microorganismes pathogènes (Colomma, 2006).

IV. Rôles et intérêts des composés phénoliques

Les progrès des techniques analytiques et des approches moléculaires ont permis aujourd'hui de confirmer et de préciser la diversité et l'importance des composés phénoliques:

IV.1. Au niveau de la plante

Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV (Vattem et al., 2005; Kanoun, 2011).

Les polyphénols constituent des éléments essentiels dans les interactions des plantes avec leur environnement (Cheynier, 2005; Lapornik et al., 2005; Macheix et al., 2005). Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques: croissance, différenciations, organogenèse, dormance des bourgeons et floraison (Barboni, 2006).

IV.2. Chez l'Homme

La consommation des polyphénols joue un rôle bénéfique à l'égard de la santé humaine, notamment en la protégeant contre les risques de nombreuses maladies telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires (Tripoli et al., 2007; Del-Rio et al., 2004):

IV.2.1. Activité antivirale

Les polyphénols exercent des effets inhibiteurs contre des virus multiples, plusieurs études ont montrées leurs efficacités contre le rétrovirus HIV responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA), le virus d'influenza, et le virus de la grippe A (Spedding et al., 1989; Choi et al., 2009).

IV.2.2. Activité antimicrobienne

Les polyphénols sont les principaux antimicrobiens des plantes ayant des modes d'action divers, des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'une grande catégorie de micro-organismes procaryotes et eucaryotes(virus, bactéries, champignons,...etc.) (Cowan, 1999).

IV.2.3. Activité anti –inflammatoire et effet sur le système immunitaire

De nombreux travaux semblent indiquer que certains flavonoïdes comme la quercétine, possèdent des propriétés anti–inflammatoires, et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Milane, 2004).

IV.2.4. Activité anti-cancérigène

L'action anti-cancérigène des polyphénols a été étudiée chez de nombreuses espèces moléculaires. Les polyphénols limitent le développement de tumeurs induites par exposition à des agents carcinogènes. Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, poumon, peau...)(Tripoli et al., 2007; Del-Rio et al., 2004), et à tous les stades de la cancérogenèse. Au stade d'initiation, ils agissent comme agents bloquants en empêchant l'activation de procarcinogènes. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agents supprimeurs de tumeurs (Han et al., 2007).

IV.2.5. Activité antioxydante

Les composés phénoliques jouent un rôle très important dans la neutralisation et l'adsorption des RL (Moosmann et Behl, 1999). Ces composés peuvent inhiber le stress oxydatif par :

- **Piégeage des radicaux libres:**

Une des propriétés des polyphénols la mieux décrite est leur capacité à piéger les RL. Cette activité est essentiellement due à la facilité des groupes hydroxyles du noyau aromatique à céder des électrons aux RL. En d'autre terme, ces substances stabilisent leurs ERO par la grande réactivité de leur groupement hydroxyles avec le composé radicalaire, les radicaux deviennent inactifs selon la réaction suivante:



Où : R°:est un radical libre, O°: est un oxygène radicalaire libre et,PL: polyphénols

- **Chélation des cations métalliques**

Les polyphénols sont également capables de chélater les ions métalliques pro-oxydants, comme le fer ou le cuivre, qui peuvent renforcer les effets délétères par la production des radicaux hydroxyles en réduisant le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (figure N°10) (Brown, 1998).

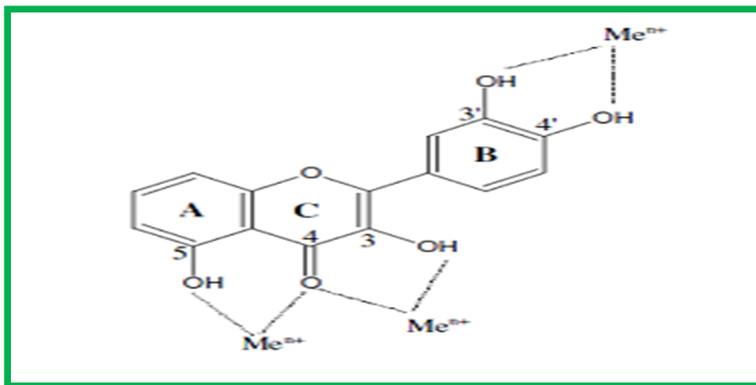


Figure N°10 : Chélation des ions métalliques par les Flavonoïdes (Brown, 1998).

- **Inhibition de la peroxydation lipidique**

Les polyphénols peuvent inhiber ou retarder l'oxydation des lipides ou d'autres molécules par inhibition de la phase d'initiation et de propagation dans la chaîne d'oxydation (Shrififaret *et al.*, 2008).

- **Propriétés inhibitrices d'enzymes**

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase, de la phospholipase A2 et des enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase (Fernandez *et al.*, 2005).

Chapitre III

Généralités sur Citrus limon

Chapitre III : Généralités sur *Citrus limon*

I. Historique

Le citronnier ou *Citrus limon* est un arbuste originaire du sud-est asiatique, cultivé sur le littoral de la Méditerranée et dans toutes les régions du globe à climat semi-tropical (**Dubois, 2006**), C'est un agrume qui est issu d'une hybridation naturelle entre le Cédrat, la Lime et le pamplemousse (**Ladaniya, 2008**).

Le citron s'est d'abord appelé « **limon** », terme emprunté à l'italien « limone », qui venait lui-même de l'arabo-persan « limûn ». Le mot est apparu dans la langue française en 1351. Le terme « **citron** », né en 1398, est dérivé du latin *citrus*. Il a graduellement remplacé « limon » dans la langue populaire (**Dugo et Di-Giacomo, 2002**).

Dès le début de Moyen Age, il a été utilisé sur les bateaux arabes puis, à partir de la fin du XII siècle sur les bateaux européens car c'est le seul moyen connu à l'époque (avec l'oignon) pour éviter le scorbut (**Ladaniya, 2008**).

II. Répartition géographique

Les citronniers se trouvent dans des climats tropicaux et subtropicaux. Ils prospèrent dans les endroits où la température est entre 16°C et 29°C mais ils peuvent résister jusqu'à environ 5°C, les citronniers n'ont pas une phase dormante, les fleurs et les fruits mûrs peuvent exister au même temps (**Nerovique et al., 2011**).

Les citronniers sont cultivés partout dans le monde, ils sont développés autour de la mer Méditerranée dans les pays comme l'Italie, l'Espagne, le Portugal, la Turquie, le Liban, le Chypre et les pays de l'Afrique de nord. Ces pays mènent également le monde en citron s'élevant et exportant. D'autres cultivateurs et exportateurs principaux des citrons incluent l'Australie, l'Afrique du Sud, les Etats Unis et d'autres pays (**Dugo et Di-Giacomo, 2002**).

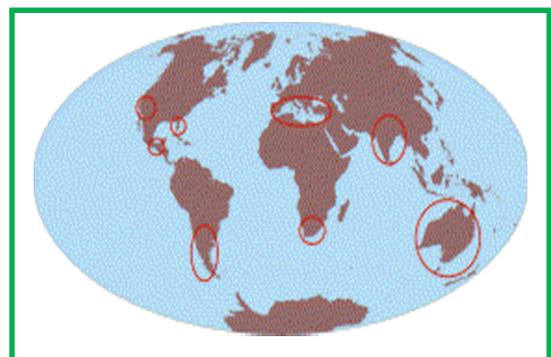


Figure N°11 : Répartition géographique du citrus limon à travers le monde (**Anonyme, 2012**).

III. Classification

Selon **Nerovique et al. (2011)**, le citronnier est une plante angiosperme appartenant à :

L'ordre : des Térébinthales

Classe : des Dicotyledones,

Famille : des Rutaceae,

Genre: *Citrus*

Espèce : *Citrus limon*

IV. Description botanique

Le citronnier, *Citrus limon*, est un arbuste plus ou moins épineux de 5 à 10 m de haut, cette plante est l'une des agrumes les plus vigoureuses, de croissance rapide, elle produit de nombreuses branches et fructifie abondamment, mais la fructification de l'hiver est la plus importante (**khan, 2007**). Les caractéristiques botaniques des différents organes du citronnier sont résumées dans le tableau III.

Tableau III: Les caractéristiques botaniques des différents organes du citronnier (**Nerovique et al., 2011**).

Organes	Caractéristiques botaniques	Photographie (source internet)
Feuilles	Feuilles persistantes, oblongues lancéolées, ordinairement de couleur vert foncé, avec un limbe nettement articulé et un pétiole non ailé.	
Fleurs	Fleurs à pétales blanc violacé, axillaires réunies en petits groupes.	
Fruits	Les fruits sont de forme ovale, avec un mamelon apparent à leurs extrémités. La peau est appelée écorce elle est jaune à maturité du fruit. La pulpe, de coloration jaune ou verdâtre.	

V. Composition biochimique de citron

Le citron est une source très importante de divers composés bioactifs, tels que, les vitamines (principalement la vitamine C), les minéraux, les fibres alimentaire, les huiles essentielles et les caroténoïdes (**González-Molina *et al.*, 2010**). De plus, des études récentes ont montré aussi que le citron est une source très riche en composés phénoliques, qui sont considérés comme des puissant antioxydants et suggérés pour être responsable de la prévention à l'égard de plusieurs maladies (**Tripoliet *et al.*, 2007**).

V.1. Les polyphénols de citron

Le citron est très riche en composés phénoliques tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes qui constituent la classe la plus dominante (**Tripoliet *et al.*, 2007**).

V.1.1. Les acides phénoliques

Deux types d'acides phénoliques existent dans le citron (**González-Molina *et al.*, 2010**):

- **Les acides benzoïques** : tels que l'acide protocatechique, l'acide p-hydroxybenzoïque et l'acide vanillique.
- **Les acides hydrocynamiques** : tels que l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide p- coumarique.

V.1.2. Les flavonoïdes

Les flavanones, les flavones et les flavonols sont les trois principaux types de flavonoïdes de *citrus limon* (**Ghasemiet *et al.*, 2009**) :

- **Les flavanones**

Cesont les composés majeurs de citron ($\approx 90\%$), ils sont présents sous forme glycoside ou aglycone :

-Les formes glycosides se divisent en deux types: les neohesperidosides (naringine, néohespéridine, neoeriocitrine) et les rutinosides (hespéridine, narirutine et eriocitrine) (**González-Molina *et al.*, 2010 ; Peterson *et al.*, 2006**).

- L' hespéridine et la naringénine sont les formes aglycones les plus importantes.

- **Les flavones**

Les principaux flavones de citron sont : l'apégénine, la lutéoline, la diosmète et la diosmine, ce dernier possède des applications pharmacologiques très importantes (**Del-Rio et al., 2004**).

- **Les flavonols**

Les flavonols les plus abondants dans le citron sont le kampferol, la myricétine, la quercétine et la rutine (**Calomme et al., 1996**).

VI. Usage thérapeutique traditionnel

Depuis longtemps, le fruit et les feuilles de *Citrus limon* ont été utilisés pour le traitement de quelques maladies telles que le rhume, la grippe, l'angine, la fièvre, les varices et les hémorroïdes, c'est un antiscorbutique et un important désinfectant qui a déjà été utilisé pour la préparation du champ opératoire et en dermatologie pour combattre certaines affections de la peau, aussi comme un antidote pour divers poisons et spécialement les morsures des scorpions et les piqûres des insectes. Par ailleurs, *Citrus limon* a été employé pour empêcher les nausées et les vomissements pendant la grossesse, pour arrêter les saignements nasaux et pour éviter l'ivresse, il est utile contre les thromboses et les embolies. C'est également un tonique de l'organisme et un stimulant de l'appétit (**Del-Rio et al., 2004 ; Arias et Ramon-Laca, 2005**).

Citrus limon est aussi très utilisé en cosmétique, il adoucit et hydrate la peau, fortifie les ongles fragiles, fait briller les cheveux tout en atténuant les pellicules (**Anonyme, 2012**).

VII. Activités biologiques liées aux polyphénols

Les propriétés thérapeutiques de *Citrus limon* ont été toujours associées à leur teneur en vitamine C, et ce n'est que récemment qu'a été montré que leurs polyphénols et principalement les flavonoïdes jouent un rôle très important dans cet égard (**Del-Rio et al., 2004**).

Plusieurs études ont démontré que les flavonoïdes de *Citrus limon* possèdent des activités biologiques très importantes telles que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-oxydante, anticancéreuse, action vasodilatatrice, action contre les maladies cardiovasculaires, antiproliférative... (**Del-Rio et al., 2004; Tripoliet al., 2007**).

VII.1. Activité anti-inflammatoire

Plusieurs études ont démontré que les flavonoïdes des agrumes avaient des propriétés anti-inflammatoires. Ils sont capables d'inhiber les kinases et phosphodiesterases essentiels pour l'activation et la transduction du signal cellulaire. Ils ont également une incidence sur l'activation de certain nombre de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, y compris les lymphocytes T et B (Manthey *al.*, 2001).

VII.2. Activité vasodilatatrice

Par sa teneur en hespéridine, diosmine et d'autres flavonoïdes, ayant une action similaire à la vitamine P, le citron renforce la résistance capillaire et améliore la circulation veineuse (Fuster, 1997).

VII.3. Activité antiallergique

Citrus limon a 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 (González-Molina *et al.*, 2010).

VII.4. Activité antimicrobienne

Plusieurs études expérimentales ont montré que les flavonoïdes de *Citrus limon* 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 (Tripoliet *al.*, 2007).
- Hespéridine, l'aglycone d'hespéridine, possède une activité antimicrobienne modérée contre *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* (Kawaguchi *et al.*, 2004).

VII.5. Activité anticancéreuse

Récemment, l'influence des flavonoïdes de citron sur le cancer a été mise à jour (González-Molina *et al.*, 2010), l'activité anticancéreuse des citroflavonoïdes peut se produire par deux effets selon Tripoliet *al.* (2007) :

- **Effet antimutagène:** des études récentes ont montré que la naringénine et la rutine ont un effet photo-protecteur contre les UV, à l'origine des différentes mutations de l'ADN.

•**Effet antiprolifératif:** les citroflavonoïdes sont démontrés qu'ils pouvaient ralentir la prolifération de plusieurs lignées de cellules cancéreuses et diminuer la croissance des métastases. Ces propriétés pourraient servir à l'élaboration de thérapies antitumorales.

VII.6. Action contre les maladies cardiovasculaires

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré qu'un apport régulier en flavonoïdes de *Citrus limon* est associé à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires. Les flavonoïdes contribueraient à améliorer la vasodilatation coronarienne, à diminuer le taux de cholestérol dans le sang, à diminuer l'agrégation des plaquettes sanguines et à prévenir l'oxydation des LDL cause principale de l'athérosclérose qui est à l'origine des maladies cardiovasculaires (Kurowska et al., 2000; Cha et al., 2001).

VII.7. Activité antioxydante

Les citroflavonoïdes 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 (Tripoliet 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 superoxyde dismutase, catalase et de glutathion peroxydase (Tripoliet 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 ; Ghasemi et al., 2009).

•**Inhibition de la lipopéroxydation :** 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 (González-Molina et al., 2010).

Partie pratique

Matériel et méthodes

Chapitre IV : Matériel et Méthodes

I. Description et collecte de matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur les feuilles de *Citrus limon* appelées localement citronnier, que nous avons récolté durant le mois de Février 2013 au niveau de la ville d'El-kseur, située à quelque Km de la ville de Bejaia.

L'échantillonnage a été réalisé de manière aléatoire à partir d'un seul arbre, dans un endroit propre et loin de la pollution.

Les échantillons de feuilles prélevés à partir d'un citronnier sain, bien développé et ne présentant aucune lésion, ont subi une série de traitements en vue de réaliser l'extraction et le dosage des différentes classes de polyphénols ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante.



Figure N°12 : Photographie des feuilles de *Citrus limon*.

II. Préparation du matériel végétal pour l'extraction

II.1. Séchage

- **Principe**

Dans les cellules végétales, certaines enzymes telles que les polyphénols oxydases et les glycosidases peuvent provoquer des modifications des composés phénoliques des plantes.

Un séchage adéquat du végétal peut remédier à ces pertes en éliminant ces activités enzymatiques et conserver ainsi le matériel végétal (Owen et Johns, 1999).

- **Mode opératoire**

Les feuilles de *Citrus limon* sont lavées et débarrassées de la poussière et d'autres particules puis soumises à un séchage dans une étuve à 40°C, le séchage complet est confirmé par la stabilisation du poids de l'échantillon.

II.2. Broyage et tamisage

Après le séchage, les feuilles de *Citrus limon* sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique afin d'avoir une poudre fine qui sera ensuite tamisée par un tamiseur électrique composé de plusieurs tamis à différents diamètres.

Seule la poudre dont le diamètre est inférieur à 250µm va servir pour la préparation de l'extrait, parce que plus le diamètre des grains est petit plus la surface d'échange entre celle-ci et le solvant d'extraction est grande, plus le rendement d'extraction est meilleur (**Diallo et al., 2004**).

La poudre ainsi obtenue est ensuite conservée dans un récipient en verre, fermé hermétiquement et stocké à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité, pour des prochaines utilisations.

III. L'extraction des polyphénols

L'obtention d'un principe actif à partir des végétaux nécessite souvent une extraction. Dans cette étude une extraction de type solide/liquide (par macération) a été réalisée selon la méthode de **Owen et Johns (1999)**, avec quelques modifications. Le procédé d'extraction est réalisé comme suit :

III.1. La macération

- **Principe**

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

L'extraction a lieu par pénétration du solvant dans la cellule végétale, phénomène provoquant leur gonflement et la rupture des liaisons moléculaires de faible énergie. Les

extractibles sont alors dissouts et diffusent progressivement des cellules vers le solvant (Royer et *al.*, 2010).

- **Mode opératoire**

Plusieurs solvants peuvent être utilisés pour l'extraction des composés phénoliques, trois solvants purs de polarité différente sont utilisés dans cette étude : le méthanol, l'éthanol et le chloroforme.

- 10 g de la poudre sont ajustées à 100 mL de chaque solvant.
- Les mélanges sont soumis à une agitation, à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 48 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. L'agitation des particules dans le solvant permet leur maintien en suspension et l'homogénéité du milieu.

III.2. Filtration et évaporation

- Après macération, les mélanges ont été filtrés à l'aide d'un papier filtre.
- Les filtrats sont mis dans des béchers ensuite séchés à l'étuve à 40°C jusqu'à l'évaporation totale du solvant d'extraction.
- La pesée de l'extrait a été prise après évaporation totale du solvant et stabilisation du poids de bécher.
- Le taux d'extraction est quantifié comme suit :

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

Où

- **P₀**: Poids du bécher vide (g) ;
- **P₁**: poids du bécher après évaporation (g) ;
- **E** : poids de l'échantillon (10g de poudre).

La matière extraite est reconstituée à l'aide du méthanol.

IV. Dosage des composés phénoliques

IV.1. Dosage des polyphénols totaux

La détermination quantitative des polyphénols totaux contenus dans les trois extraits : méthanolique, éthanolique et chloroformique des feuilles de *Citrus limon* est réalisée par spectrophotométrie, selon la méthode de **vélioglu et al., (1998)**, 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 est utilisé comme oxydant, il est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation des polyphénols, le Folin est réduit en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) et ça en présence de carbonate de sodium. L'intensité de la coloration est proportionnelle aux taux des polyphénols présents dans les extraits (**Ribereau-Gayon, 1968**).

- **Mode opératoire**

200 μ L de chaque extrait (0,5mg /mL) a été additionné par 1,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 5 minutes, 1,5 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 6% ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 60 minutes. L'absorbance est mesurée à 725 nm contre un blanc où le volume de l'échantillon est remplacé par un volume équivalant de méthanol.

La concentration en composés phénoliques a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue par l'acide gallique comme standard (annexe I.1). Les résultats sont exprimés en mg EAG/g ES. (Où : EAG = équivalent acide gallique ; ES= extrait sec).

IV.2. Dosage des flavonoïdes

- **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 des flavonoïdes contenue dans les trois extraits des feuilles de *Citrus limon* est déterminé selon la méthode colorimétrique du trichlorure d'aluminium réalisée par Quettier-Deleu et al., (2000) in Djeridane et al., (2006). 1 mL d'extrait à concentration de 0,5 mg /mL est mélangé avec 1 mL d'une solution de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2%, après 10 mn d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 430nm, contre un blanc de méthanol.

La quantité des flavonoïdes contenus dans les extraits est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (annexe I.2). Les résultats sont exprimés en mg EQ /g ES. (EQ : équivalent de la quercétine).

IV.3. Dosage des tanins condensés « proanthocyanidines »

L'estimation de la teneur des proanthocyanidines dans les extraits des feuilles de *Citrus limon* est réalisée selon la méthode de Sun et al., (1998) in Adedapo et al., (2008) en utilisant la vanilline qui est un aldéhyde relativement stable.

- **Principe**

La réaction de la vanilline en impliquant sa fonction aldéhyde avec le flavanol méta-substitué (catéchine) forme un adduit dans un milieu acide. La coloration rouge produite après la formation de l'adduit possède une absorption maximale aux environs de 500nm et elle est proportionnelle au taux des tanins condensés présent dans les extraits (Price et al., 1978).

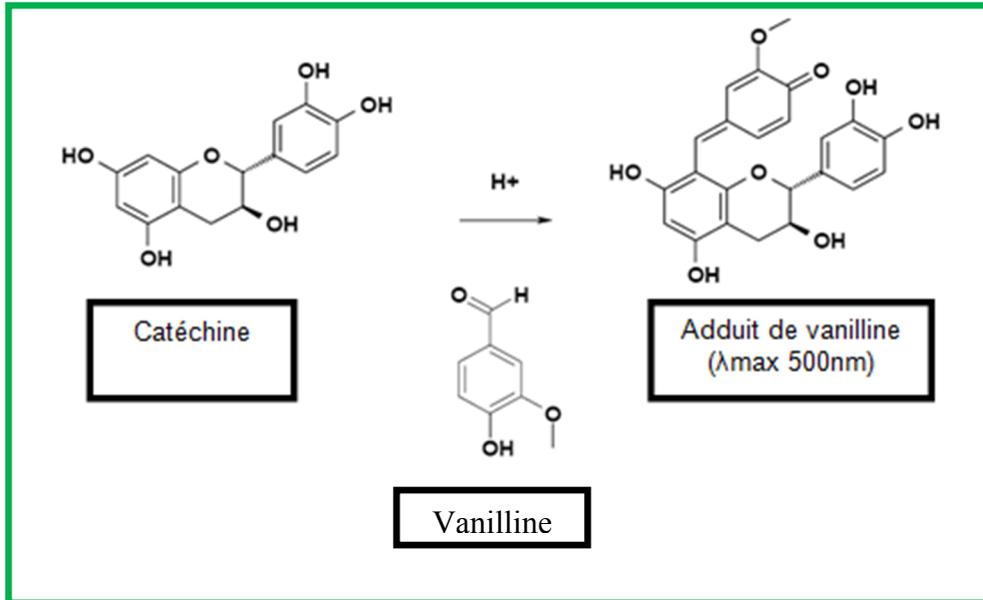


Figure N°13 : Formation de l'adduit de vanilline (Price *et al.*, 1978).

- **Mode opératoire**

Un volume de 0.5 mL de la solution de chaque extrait de concentration (1 mg/mL) a été mélangé avec 3 mL de la solution du vanilline-méthanol à 4%, et 1.5 mL d'acide hydrochlorique (HCl). Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 minutes. L'absorbance est mesurée à 500 nm contre un blanc où la solution de la vanilline est remplacée par un volume équivalent de méthanol.

La concentration des proanthocyanidines contenus dans les extraits est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la catéchine (annexe I.3).

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de catéchine (EC) par gramme d'extrait sec (mg EC/g ES).

V. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans ce cadre, l'étude s'est intéressée à l'évaluation des activités antioxydantes d'extraits de feuilles de Citronnier en vue de leur valorisation en tant qu'antioxydants. Cette étude a porté sur la détermination de pouvoir antiradicalaire en utilisant le radical « DPPH » et par la détermination du pouvoir réducteur qui est basé sur la mesure de la capacité des polyphénols des extraits à réduire les ions métalliques.

IV.1. Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test 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 (2,2-diphényl-1-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 spectrophotométrie à 517 nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité antiradicalaire (Milardovic et al., 2006).

- **Mode opératoire**

L'effet scavenger du DPPH est exprimé selon la méthode utilisée par **Sohretgluetal.,(2007)**: 1 mL de la solution DPPH de 0,1 mM (préparé dans le méthanol) a été ajouté à 03 mL de l'extrait à différentes concentrations(5, 10, 15, 20, 25 ,30, 35µg /mL) , après 30 mn d'incubation à l'obscurité , l'absorbance a été mesurée à 517nm contre un contrôle contenant le même volume de DPPH et le méthanol à la place de l'extrait.

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

$$\% \text{ d' i n h i b i t i o n } = \frac{\text{A b s o n a n c e (A b s c o n t r o l e) - (A b s c o n t r o l e + A b s o n a n c e)}}{\text{A b s c o n t r o l e}} \times 100$$

A titre de comparaison, deux standards ont été utilisés : l'acide ascorbique et la catéchine

L'IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH°. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

V.2. Evaluation du pouvoir réducteur

La détermination du pouvoir réducteur des trois extraits des feuilles de *citrus limon* est réalisée en utilisant deux tests : test de ferricyanure de potassium et celui du phosphomolybdate d'ammonium.

V.2.1. Test de ferricyanure de potassium :

- **Principe**

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure de potassium en fer ferreux (Fe^{2+}). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits (Chung *et al.*, 2002).

- **Mode opératoire**

Le pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *Citrus limona* été déterminé selon la méthode de Yen et Chen (1995) rapportée par Amarowicz *et al.* (2004) : 0.5 mL de chaque extrait à différentes concentrations (20, 40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dilué dans le méthanol est mélangé avec 1 mL de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) suivi de 1 mL de Ferricyanure de Potassium ($\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1%. Après agitation, le mélange est soumis à l'incubation à 50°C pendant 20 min. 1 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% est additionné au mélange et centrifugé à 3000 t/m pendant 10 min. Un volume de 1 mL du surnageant est ajouté à 1 mL d'eau distillée, puis 200 μL de chlorure ferrique (FeCl_3) à 0.1% est ajouté au mélange. Le mélange homogénéisé préalablement, est incubé pendant 10 min à l'abri de la lumière, ensuite l'absorbance est lue à 700 nm. Le Butylhydroxyanisole (BHA) est utilisé comme contrôle.

V.2.2. Test de phosphomolybdate d'ammonium

- **Principe**

Ce test a été employé pour déterminer la capacité antioxydante, basée sur la réduction de l'ion Mo^{+6} en ion Mo^{+5} par les polyphénols contenus dans les extraits et formation d'un complexe phosphate- Mo^{+5} de couleur verdâtre, en milieu acide, dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits (Prieto *et al.*, 1999; Baskaret *et al.*, 2007).

- **Mode opératoire**

Le test est réalisé selon la méthode adaptée par **Meot-Duros et Magne (2009)**. 0.5 mL de chaque extrait à différentes concentrations (10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$) dilué dans le méthanol est mélangé avec 2 mL de la solution de phosphomolybdate d'ammonium, après incubation du mélange à 95°C pendant 90 mn, l'absorbance est lue à 695nm.

VI. Caractérisation des extraits de feuilles de *Citrus limon* par chromatographie sur couche mince (CCM)

VI.1. Principe de la CCM

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, utilisée pour la séparation et l'identification des différents constituants d'un mélange. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption où deux phases sont introduites :

- La phase stationnaire : qui est un adsorbant maintenu sur une plaque en verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.
- La phase mobile : constituée d'un solvant ou d'un mélange de solvants qui progresse le long de la phase stationnaire.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

VI.2. Mode opératoire

VI.2.1. Préparation de la phase stationnaire (préparation des plaques)

Les plaques utilisées dans cette étude sont en verre de 20x20 cm : à l'aide d'un étaleur manuel les plaques ont été recouvertes d'une couche fine de silice (40 g de la silice dans 100 mL d'eau distillé) à une épaisseur de 0,5mm, elles ont été séchées à l'air libre puis réactivées à 100°C pendant une heure, la phase stationnaire sera prête pour l'utilisation.

Deux lignes ont été tracées sur la plaque : une de départ et l'autre de la fin de la migration en respectant un espacement d'environ 2 cm entre chaque ligne et les bords de la plaque.

Les échantillons à analyser ainsi que les standards sont déposés à l'aide d'une micropipette sous forme de spots (de volume de 5 μ L) sur la ligne de départ avec un espacement de 2cm entre l'un et l'autre.

Sept spots ont été déposés: quatre pour les standards (acide gallique, acide tannique, quercitrine et rutine) et trois pour les extraits (éthanolique, méthanolique et chloroformique).

VI.2.2. Préparation de la phase mobile (les systèmes de solvant)

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes de solvants ont été employés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations. Les systèmes qui ont fait l'objet de notre étude sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : Les différents systèmes de migration utilisés pour la CCM :

Système	proportions en volume	Références
1) Acétate d'éthyle / Méthanol / Eau distillée	100v : 135v : 10v	(Kolai, et al., 2007)
2) Toluène / Acétone / Acide formique.	18v / 3v / 3v	(Akroum, 2006)
3) Toluène / Acétone / Acide formique.	60v / 60v / 10v	(Adrar, 2009)

VI.2.3. Développement des plaques

Après avoir déposé 5 μ L de chaque extrait et des standards sur la ligne de dépôt, les plaques de CCM sont placées verticalement dans une cuve (figure N°14) contenant la phase mobile appropriée, le niveau de cette dernière ne doit pas atteindre la ligne de dépôt. La cuve est fermée avec son couvercle, l'éluant migre lentement le long de la plaque jusqu'au trait de fin de migration en entraînant les composants déposés.

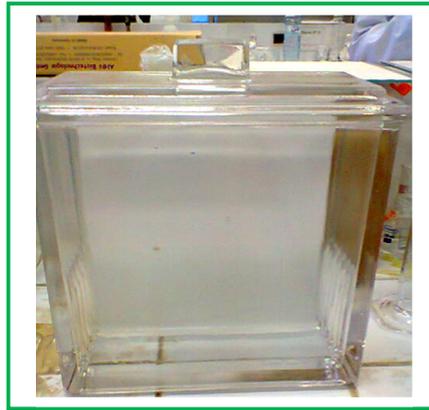


Figure N° 14 : Photographie de la cuve utilisée pour la CCM.

VI.2.4. Visualisation des plaques

A la fin de la migration, les plaques ont été séchées puis visualisées :

- À l'œil nu,
- Sous une lampe UV à 253,7nm et à 365nm,
- Après pulvérisation par : AlCl_3 (2%) pour les plaques du 1^{er} et 2^{ème} système, et avec la vanilline sulfurique pour celle du 3^{ème} système.

La visualisation est accompagnée par des photographies des plaques ainsi que, par le calcul des rapports frontaux (R_f) de chaque extrait et standard afin d'identifier la nature des molécules et ça selon la formule suivante :

$$R_f = d / D$$

Avec :

d : la distance parcourue par la molécule

D : la distance parcourue par la phase mobile (dire le front du solvant)

Le R_f est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support « phase stationnaire » donné (**Lagnika, 2005**).

VII. Etude statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé. Les moyennes et les écarts types sont calculés avec Excel de Microsoft Office 2007 et les résultats ont été exprimés sous la forme: moyenne \pm écarts-types.

Les valeurs IC_{50} ont été calculées en utilisant le logiciel Origin8.

Résultats et discussion

Chapitre V: Résultats et discussions

I. 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 (Levizou *et al.*, 2004).

La méthode d'extraction par macération en utilisant le méthanol, l'éthanol et le chloroforme comme des solvants d'extraction, a permis d'obtenir respectivement des taux d'extraction de 14,98 %, 11,16 % et 2,69 % (Figure N°15).

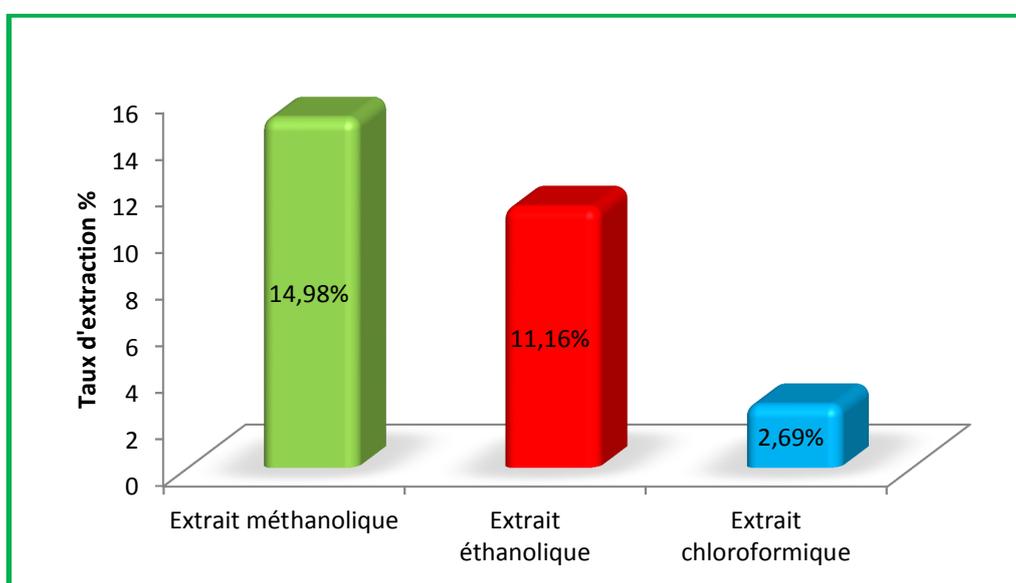


Figure N°15: Taux d'extraction des polyphénols des feuilles de *Citrus limon*.

Bien que le matériel végétal est le même, une variabilité des rendements d'extraction des feuilles de *Citrus limon* par les trois solvants est observée, l'extraction par le méthanol a donné le rendement le plus élevé (14,98 %), suivie de celle de l'éthanol (11,16) qui ne présente pas une grande marge de différence. L'extraction par le chloroforme présente le plus faible rendement (2,69 %) qui est environ 6 fois inférieur à celui de méthanol, cette variabilité de rendement des trois extraits peut être due à la différence de polarité des solvants utilisés ou à la différence de solubilité des constituants biochimiques de la plante dans ces solvants.

D'autre part, le méthanol s'est avéré le meilleur solvant d'extraction pour la majorité des polyphénols (Vercauteren *et al.*, 1998 ; Cowan, 1999).

En effet, le rendement d'extraction des feuilles de *Citrus medica* selon **Minichini et al (2011)**, est de 8,2%. Alors que, **Tachakittirungrod et al. (2007)** ont obtenu un rendement de 7.42 % pour celui des feuilles de *Citrus hystrix*.

La différence trouvée entre ces résultats et ceux obtenus dans la présente étude peut être expliquée par la différence de l'espèce végétal étudiée, de la méthode d'extraction, de la nature de solvant utilisé et au rapport solvant / matière sèche.

II. Dosage des composés phénoliques

II.1. Dosage des polyphénols totaux

Au cours du dosage des polyphénols totaux des trois extraits des feuilles de *Citrus limon*, une coloration bleue est apparue après 60 mn de l'ajout du réactif Folin-ciocalteu et de carbonate de sodium, ceci témoigne la présence d'une quantité significative de polyphénols totaux dans les extraits des feuilles de *Citrus* (Figure N°16).



Figure N°16: La coloration apparue lors de dosage des polyphénols totaux.

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 I.1).

Les concentrations des polyphénols totaux obtenues sont présentées dans la figure N°17, ils sont exprimées en mg EAG/ g ES.

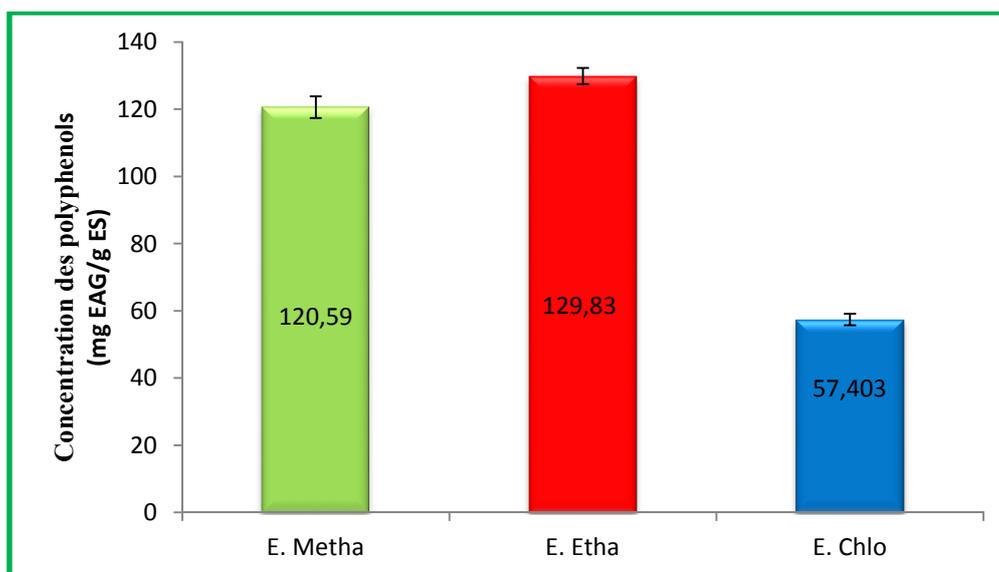


Figure N°17: Les teneurs en polyphénols totaux dans les extraits des feuilles de *Citrus limon*.

La teneur en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique et éthanolique montre des résultats assez proches qui sont de $129,83 \pm 3,245$ et $120,59 \pm 2,458$ mg EAG/g ES respectivement, au contraire, l'extrait chloroformique a révélé une teneur faible par rapport aux deux premiers extraits ($57,406 \pm 1,665$), elle est environ deux fois plus inférieure à celle de l'extrait éthanolique.

Cette différence de concentration en polyphénols totaux dans les trois extraits peut être expliquée par plusieurs paramètres tels que la nature des composés phénoliques et leurs degrés de solubilité dans le solvant utilisé, Selon **Naczki et Shahidi (2004)**, les extraits phénoliques de plantes sont généralement des mélanges des différentes classes de composés phénoliques qui sont solubles dans le solvant utilisé. La solubilité de ces composés est gouvernée par le type de solvant (polarité), le degré de polymérisation des composés à diffuser ainsi que leurs interactions avec d'autres constituants et la formation de complexes insolubles.

Aucune étude sur l'analyse quantitative des composés phénoliques totaux des feuilles de *Citrus limon* n'a été entreprise, les résultats de la présente étude seront alors comparés à ceux trouvés avec d'autres espèces appartenant au même genre (*Citrus*).

Selon les résultats de **Minichini et al. (2011)**, la teneur moyenne en polyphénols totaux des feuilles de *Citrus medica* L. est de $401,6 \pm 5,1$ mg EAG /g ES qui est relativement plus élevée que les teneurs trouvées par cette étude, cette différence est probablement due à la

composition chimique qui se diffère entre les deux espèces, l'origine et l'âge de la plante, la période de la récolte, aux facteurs environnementaux et aux conditions d'extraction.

Les analyses quantitatives des polyphénols des écorces de *citrus limon* réalisées par **Agarwal et al. (2012)** ont montré que l'extrait méthanolique a une teneur de **112,52mg EAG /g ES** ce qui montre que les teneurs en polyphénols totaux des feuilles et des écorce de *Citrus limon* sont quasiment rapprochées.

II.2. Dosage des flavonoïdes

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

Les teneurs en flavonoïdes sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercitrine $\mu g/ml$ (annexe I.2).

Les concentrations des flavonoïdes obtenues à partir des trois extraits de feuilles de *Citrus limon* sont présentées dans la figure N°18, ils sont exprimées en mg EQ/ g ES.

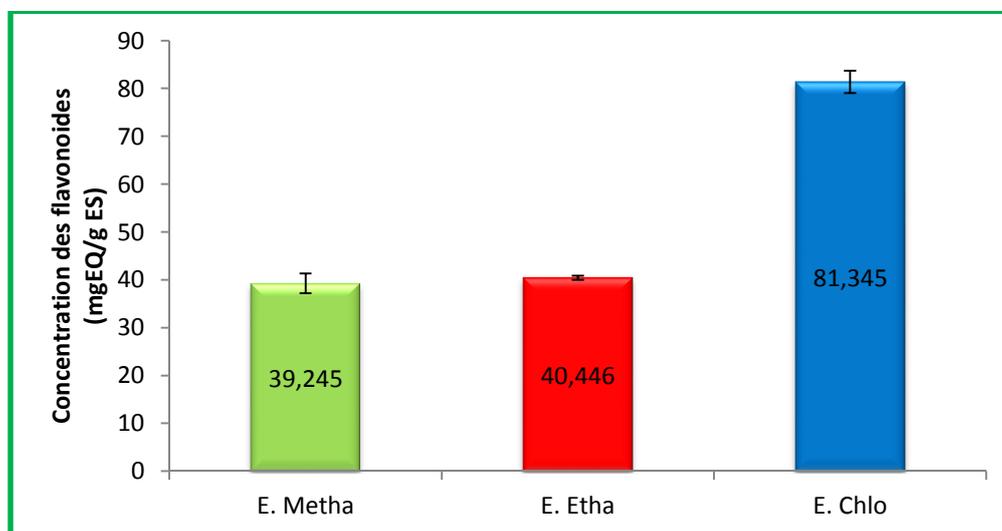


Figure N°18: Les teneurs en flavonoïdes dans les extraits des feuilles de *Citrus limon*.

Le taux de flavonoïdes dans les extraits méthanolique et éthanolique est quasiment identique, alors que pour celui de l'extrait chloroformique une différence très large a été notée. Ces résultats révèlent l'effet important du type de solvant sur le taux d'extraction des flavonoïdes.

Comparé aux deux autres solvants utilisés, le chloroforme a permis d'extraire la quantité la plus élevée des citroflavonoïdes avec $81,345 \pm 2,341$ mg EQ/ g ES. Ceci peut être expliqué par le fait que ces composés sont moins polaires, et se caractérisent par une solubilité dans les solvants apolaires, comme le témoigne les travaux de **Verykokidou et Voyo (1986)**, qui ont révélé que les flavonoïdes les moins polaires sont solubles dans des solvants comme l'éther et le chloroforme.

Selon **Minichini et al. (2011)**, la teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique des feuilles de *Citrus medica* est de $97,5 \pm 2,8$ mg EQ/ g ES, elle est deux fois plus élevée que celle trouvée dans la présente étude ($40,446 \pm 0,428$ mg EQ/ g ES). Cette différence est peut être due à la différence de l'espèce étudiée.

II.3. Dosage des tanins condensés

Après 15 mn d'incubation de mélange extrait- vanilline - acide hydrochlorique, les absorbances sont lues à 500 nm, à l'aides de ces dernières, la concentration des proanthocyanidines contenus dans les extraits est déterminée, et cela en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la catéchine (annexe I.3).

Les résultats du dosage des tanins condensés obtenus à partir des trois extraits de feuilles de *Citrus limon* sont montrés dans la figure N°19, ils sont exprimés en mg EC/g ES.

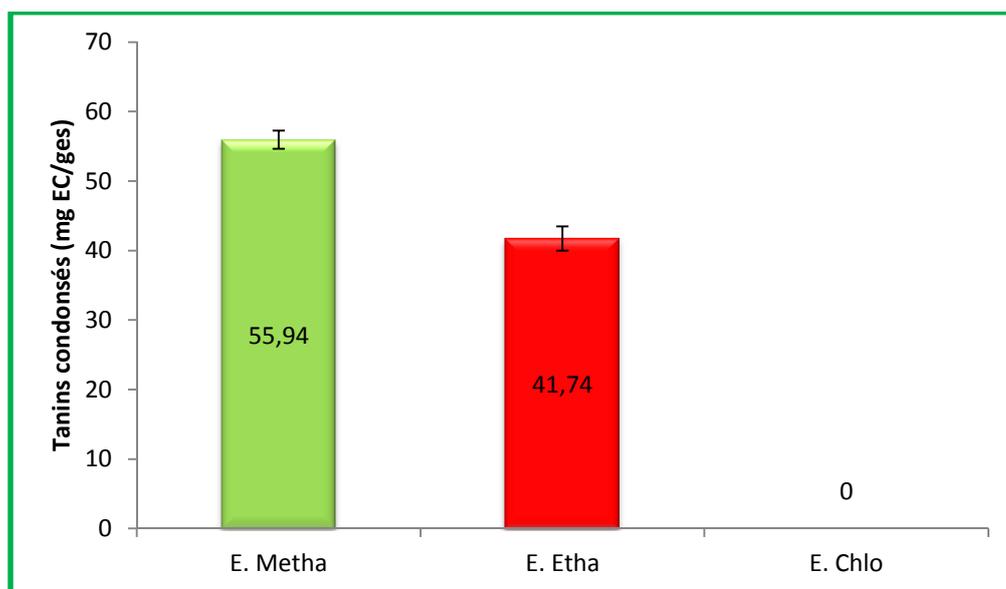


Figure N°19: Les teneurs en tanins condensés dans les extraits de feuilles de *Citrus limon*.

Selon ces résultats, le taux des proanthocyanidines diffère selon le solvant d'extraction utilisé. Le méthanol présente une extraction optimale de **55,94 ± 1,323** mg EC/g ES suivie de celle de l'éthanol avec **41,74 ± 1,745** mg EC/g ES. Cette différence du taux d'extraction des proanthocyanidines par rapport au solvant utilisé est probablement due aux caractéristiques physicochimiques des solvants qui ne sont pas identiques y compris la polarité.

Le taux d'extraction de chloroforme est nul ce qui révèle la non solubilisation des proanthocyanidines dans le chloroforme, cela est probablement due aux propriétés des tanins qui sont des composés hydrosolubles, alors que le chloroforme est un solvant apolaire.

Nos résultats sur la teneur en proanthocyanidines des feuilles de *Citrus limon* ne sont pas en rapport avec ceux de **Karabulut et al. (2007)** qui ont montré pour la même espèce récoltée au nord de la Turquie, une teneur de **10,1** mg EC/g ES. Cette différence est probablement due à la différence de l'endroit et la période de la récolte, à l'âge de la plante, aux facteurs environnementaux et aux conditions d'extraction.

En effet selon ce même auteur, des teneurs en tanins condensés pratiquement variables chez d'autres espèces de *Citrus* étudiées, elles sont de 10,2 mg EC/g ES pour *Citrus senensis*, 7,4 mg EC/g ES pour *Citrus deliciosa*, 6,9 mg EC/g ES pour *Citrus grandis* et de 5,9 mg EC/g ES pour *Citrus aurantium*. Cette différence de teneur est peut-être due à la différence des espèces.

En comparant avec les grains de *Vitis vinifera* et les feuilles de *Camellia sinensis*, deux plantes qui sont connues par leur richesse en tanins, la teneur en proanthocyanidines rapportée par **Saidani Tounsi et al., (2009)** pour ces grains est de **37,15** mg EC/g ES et celle trouvée par **Luximon-araamma et al., (2005)** pour *Camellia sinensis* est de **43** mg EC/g ES, ces deux teneurs sont en rapport avec celles obtenues pour les feuilles de *Citrus limon* et plus précisément l'extrait éthanolique (**41,74** mg EC/g ES).

Tous ces résultats révèlent que les feuilles de *Citrus limon* sont une source non négligeable des proanthocyanidines.

III. Evaluation de l'activité antioxydante

III.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 trois extraits, ce changement de couleur est le résultat de la réduction de DPPH, ce qui montre que les trois extraits des feuilles de *Citrus limon* ont un effet scavenger de radical DPPH.

Les résultats de l'activité antiradicalaire des feuilles de *Citrus limon* sont exprimés en pourcentage d'inhibition de DPPH, par rapport aux différentes concentrations des extraits.

L'évaluation de l'activité scavenger des trois extraits de feuilles de *Citrus* ainsi que celle des antioxydants de référence utilisés (BHA, acide ascorbique) est représentée dans la figure (20) et annexe (II.1) respectivement.

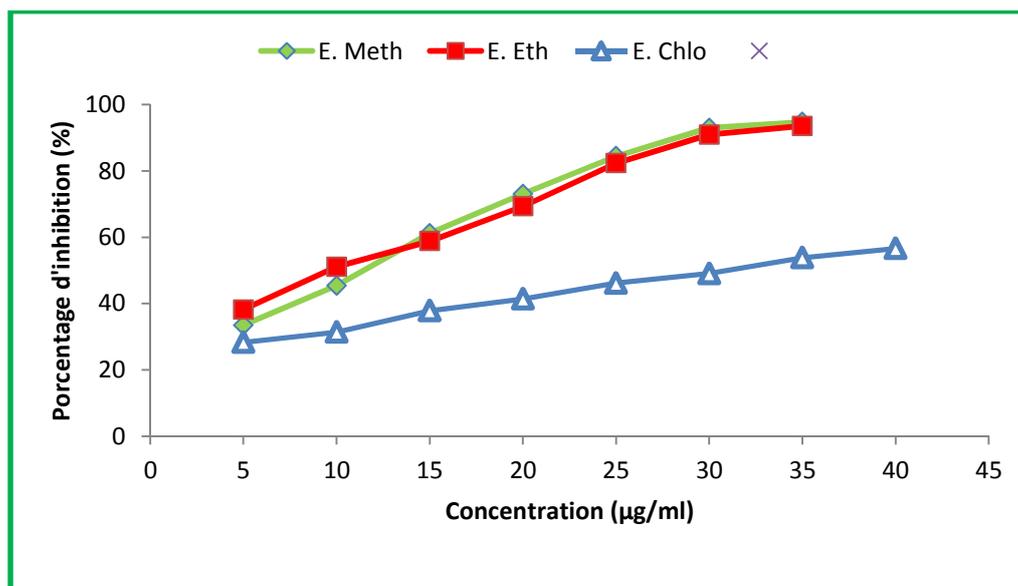


Figure N°20: Evaluation de pouvoir antiradicalaire en fonction des concentrations des extraits.

La représentation graphique de l'activité antiradicalaire des extraits a montré une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire, cela indique que l'activité antiradicalaire augmente au fur à mesure de l'accroissement de la concentration d'antioxydant utilisé, et la phase stationnaire signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire.

Les standards utilisés (BHA et acide ascorbique) présentent une activité antiradicalaire plus élevée que celle des extraits, ils présentent à des très faibles concentrations des pourcentages d'inhibition très élevés.

Selon **Dawidwicz et al. (2006)** il est difficile d'établir une corrélation et d'obtenir un même résultat entre des composés purifiés et des extraits bruts, puisque il est possible d'avoir des interactions entre les différents composés de l'extrait.

Les extraits méthanolique et éthanolique des feuilles de *Citrus limon* présentent une activité antiradicalaire similaire très importante, le pourcentage d'inhibition est presque 100% à une concentration qui ne dépasse pas 35 μ g/mL. L'activité antiradicalaire de l'extrait chloroformique est inférieure à celle des deux premiers extraits, pour une même concentration (35 μ g/mL) il présente un pourcentage d'inhibition de 53,84.

Pour une meilleure valorisation de pouvoir antiradicalaire le calcul de l'IC₅₀ de chaque extrait est introduit. L'IC₅₀, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH[•]. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande (**Pokorny et al., 2001**).

Les valeurs des IC₅₀ trouvées pour les extraits testés ainsi que les standards utilisés sont représentées dans la figure N°21.

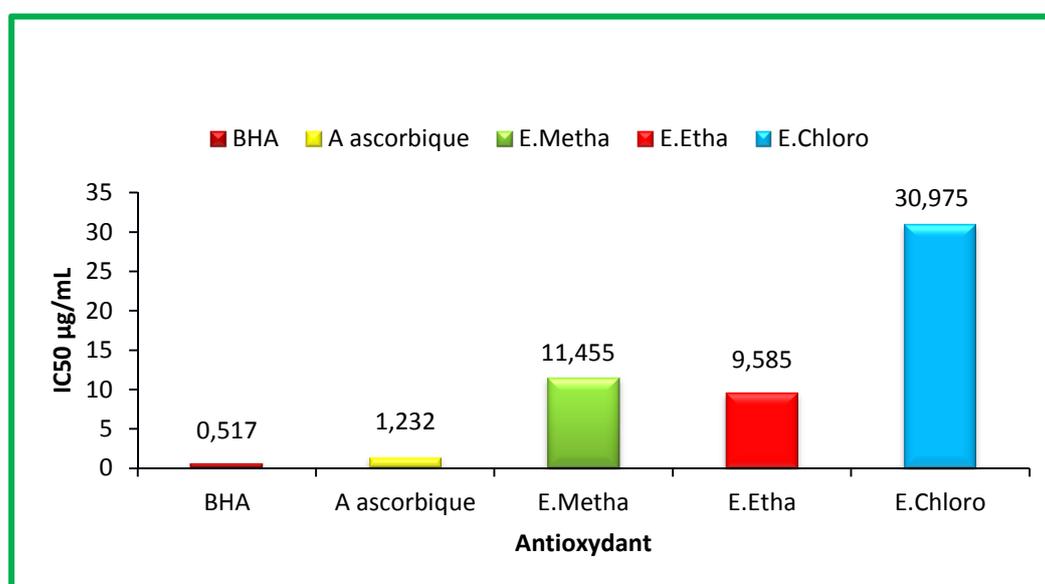


Figure N°21: Valeurs des IC₅₀ obtenues pour les extraits et les standards.

Selon ce résultat, l'antioxydant synthétique " BHA " est considéré comme un puissant antiradicalaire, il réduit 50% de DPPH pour une concentration qui ne dépasse pas 0,98 µg /mL suivi de l'acide ascorbique qui présente aussi une IC₅₀ très faible donc une activité antiradicalaire forte, les IC₅₀ de ces deux standards sont largement inférieures à celles des extraits ce qui leur confère une activité antiradicalaire très forte par rapport à celles des extraits.

Les trois extraits des feuilles de *Citrus limon* présentent des IC₅₀ différentes, l'extrait éthanolique représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ de l'ordre de **9,585** µg /mL suivi par l'extrait méthanolique avec une IC₅₀ de **11,455** µg/mL.

L'activité antiradicalaire de ces deux extraits pourrait s'expliquer par la présence des tanins et des citroflavonoïdes. En effet les flavonoïdes et les tanins sont des piègeurs de radicaux libres (**Diallo, 2005**).

L'extrait chloroformique montre une faible activité antiradicalaire comparé aux deux premiers extraits avec une IC₅₀ de **30,975** µg/mL, elle est environ trois fois plus grande que celle de l'extrait éthanolique, la faible activité antiradicalaire est probablement due à l'absence des tanins dans cet extrait, par contre les deux premiers extraits les contiennent.

Les IC₅₀ obtenues par **Muthiah et al. (2012)** pour l'extrait éthanolique de fruit de *Citrus limon* ainsi que celui de son écorce sont de **104,33 ± 1,45** µg/mL et **143,33 ± 0,88** µg/mL respectivement, deux valeurs qui sont largement éloignées de celle trouvée dans la présente étude ce qui révèle que les feuilles de *Citrus limon* possèdent un pouvoir antiradicalaire plus puissant que celui de l'écorce.

III.2. Pouvoir réducteur

III.2.1. Réduction de fer

La réduction de fer ferrique (Fe⁺³) est un test souvent employé pour évaluer la capacité réductrice d'un échantillon donné, cette aptitude de réduction est un indicateur significatif de son activité antioxydante.

Au cours du dosage, la couleur jaune du ferricyanure de potassium vire vers une couleur verte dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque extrait. La présence

d'antioxydants dans les extraits des feuilles de *Citrus limon* testés entraîne la réduction du complexe fer ferrique (Fe^{+3}) en sa forme réduite fer ferreux (Fe^{+2}).

Les résultats de l'évaluation de pouvoir réducteur des extraits et celui de standard est illustrés dans la figure N°22.

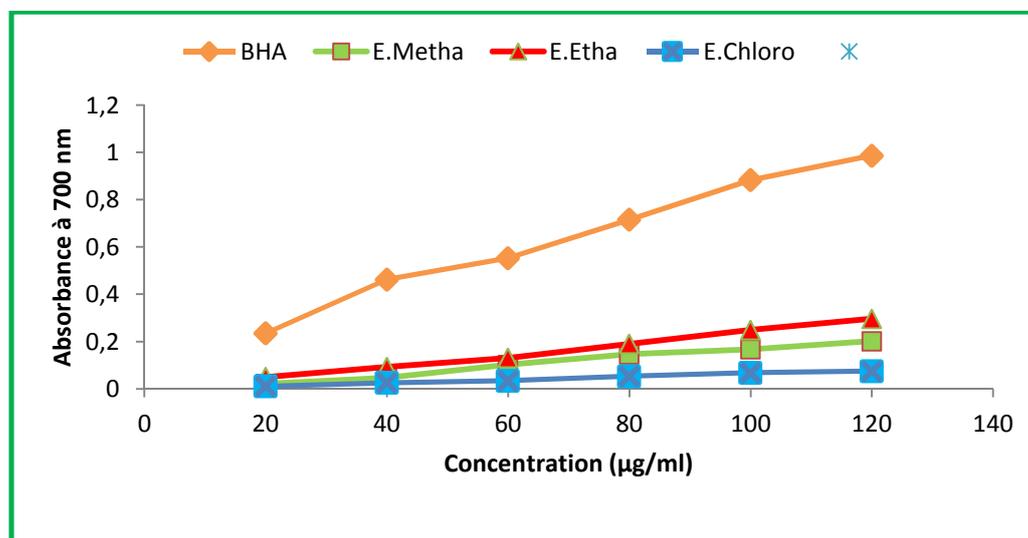


Figure N°22: Réduction de fer ferrique par le BHA et les extraits des feuilles de *Citrus limon*.

D'après cette représentation graphique, on remarque en premier lieu que les extraits des feuilles de *Citrus limon* ne possèdent pas un grand pouvoir réducteur comparé à la BHA. Aussi, il est important de noter que l'activité réductrice de fer dépend de la concentration des extraits, plus la concentration est élevée plus le pouvoir réducteur augmente.

L'extrait éthanolique a été considéré comme l'extrait le plus puissant, du fait qu'à une concentration de 120 µg/mL, son absorbance a été de 0,296 nm, suivi l'extrait méthanolique avec une absorbance de 0,202 nm. En effet, le pouvoir réducteur le plus faible a été signalé dans l'extrait chloroformique.

Cette différence dans la capacité réductrice est probablement due à la différence du teneur en polyphénols qui se diffère d'un extrait à un autre.

Le pouvoir réducteur obtenu dans notre extrait éthanolique est plus puissant que celui trouvé par **Muthiah et al. (2012)** qui sont travaillés sur l'extrait éthanol-eau des feuilles de *Citrus limon* récoltées en Inde durant le mois de Juin. Cet extrait atteint à la concentration de 100µg/mL, une absorbance de $0,027 \pm 0,002$ nm, alors que, à une même concentration l'absorbance de notre extrait est de $0,249 \pm 0,006$ nm.

Cette différence peut être due à l'endroit et la période de la récolte, aux facteurs environnementaux, aux conditions d'extraction et à la différence de la polarité des solvants utilisés.

III.2.2. Réduction de phosphomolybdate d'ammonium

Après avoir mélangé chaque extrait à différentes concentrations (10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$) avec la solution de phosphomolybdate d'ammonium et après incubation du mélange pendant 90 mn, une coloration verte est apparue dans les différentes concentrations de chaque extrait avec des intensités variables, cette coloration est due à la réduction de l'ion Mo^{+6} en ion Mo^{+5} et formation d'un complexe phosphate- Mo^{+5} , les absorbances ont été lues à 695 nm, ces dernières sont utilisées dans le calcul de pourcentage de réduction.

L'évaluation de pouvoir réducteur en fonction des différentes concentrations des extraits et celles des standards utilisés est montrée dans la figure (23) et annexe (II.2) respectivement.

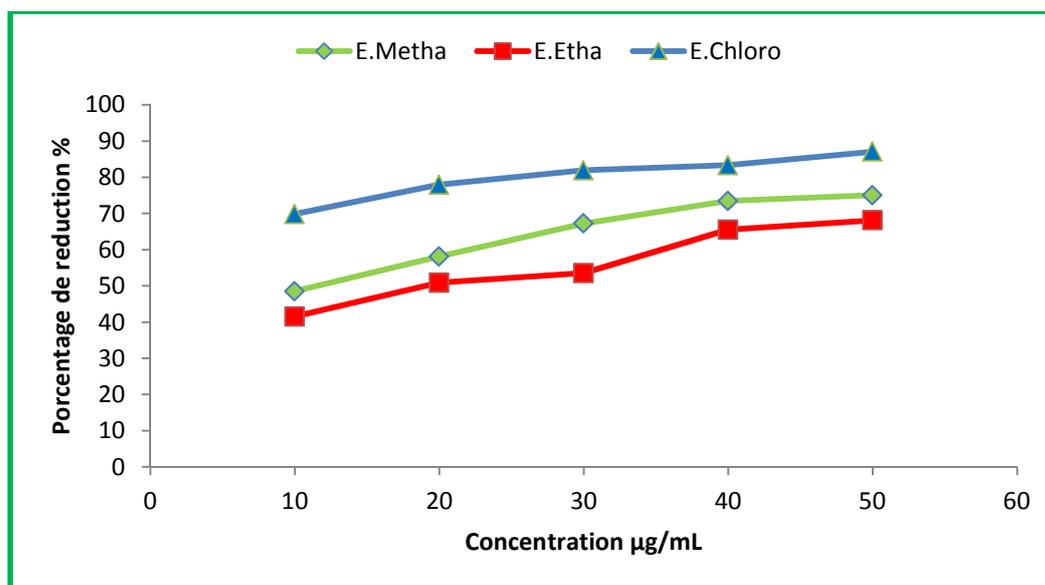


Figure N°23: Représentation graphique de l'évaluation de la réduction de Mo^{+6} par les extraits des feuilles de *Citrus limon*.

Les résultats représentés dans les figures montrent que l'augmentation de la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons (extraits ou standards).

Une différence dans la capacité réductrice est observé entre les trois extraits, l'extrait chloroformique s'est avéré le plus actif, il a pu réduire 87,07% de Mo^{+6} à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ alors que, à une même concentration l'extrait méthanolique et éthanolique ont montrés environ 70% de réduction. Cette différence d'activité réductrice est probablement due à la différence de contenu flavonoïdique de chaque extrait, sachant que l'extrait chloroformique a été montré préalablement comme l'extrait le plus riche en flavonoïdes.

A titre de comparaison ente la capacité réductrice des extraits et celle des standards utilisés, les pourcentages de réduction des standards et des extraits à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ sont présentés dans la figure N°24.

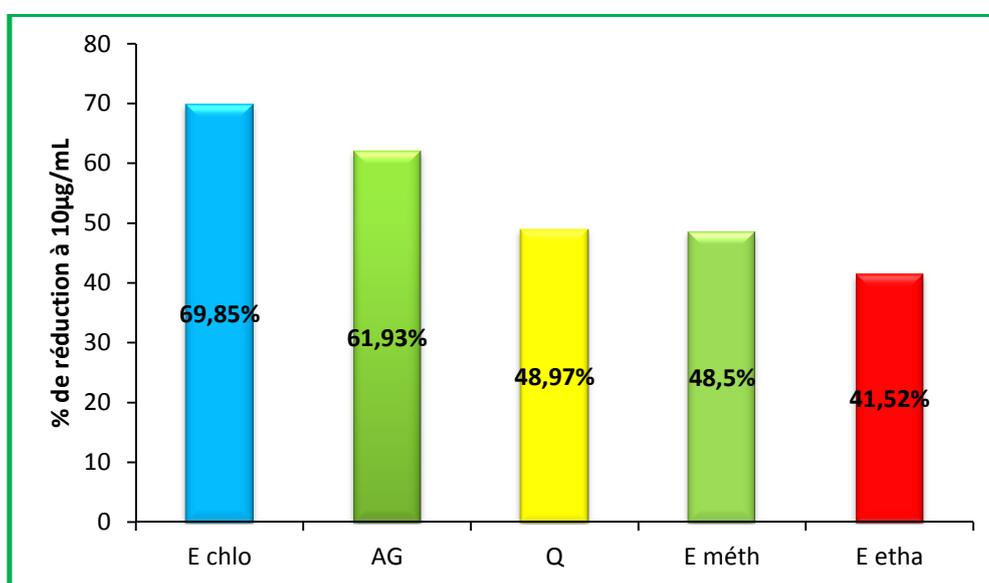


Figure N°24 : pourcentage de réduction des extraits et ceux des standards.

L'activité réductrice des extraits éthanolique et méthanolique est inférieur à celle de l'acide gallique mais elle est presque la même avec celle de la quercétine alors que l'extrait chloroformique est plus réducteur que les deux standards utilisés. Cela peut être dû à la richesse de l'extrait en antioxydants y compris l'acide gallique, la quercétine et d'autre flavonoides (voir les résultats de la CCM qui mentionnent la présence de la quercétine et l'acide gallique dans l'extrait chloroformique).

L'évaluation de l'activité antyoxidante des extraits des feuilles de *Citrus limon* par le biais des trois tests (test DPPH, réduction de fer et de phosphmolybdate) révèle la présence d'une bonne corrélation linéaire entre les teneurs en composés phénoliques totaux de ces

feuilles et leurs activité antiradicalaire ($R=0,98$) ainsi que leur pouvoir réducteur ($R_1=0,94$; $R_2=0,96$) (annexe IV).

Ces résultats suggèrent que les composés phénoliques contribuent d'une manière significative à la capacité antioxydante des feuilles de *Citrus limon*. Plusieurs études ont montré l'existence de cette corrélation entre le pouvoir antioxydant et la concentration des polyphénols totaux d'une plante donnée (Cai et al., 2004; Zheng & Wang, 2001).

IV. Caractérisation des extraits de feuilles de *Citrus limon* par chromatographie sur couche mince (CCM)

Pour une séparation et une caractérisation des composés phénoliques simples principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques des extraits des feuilles de *Citrus limon* on a eu recours à l'utilisation de chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est une méthode de séparation rapide et simple à mettre en œuvre.

Après avoir déposé 5 μ L de chaque extrait et des standards (acide gallique, acide tannique, la quercitrine et la rutine) sur la ligne de dépôt, les plaques de CCM sont placées verticalement dans la cuve contenant le système de solvant appropriée, sachant que trois systèmes ont été utilisés :

- 1- Acétate d'éthyle / Méthanol / Eau distillée (100v : 135v : 10v).
- 2- Toluène / Acétone / Acide formique (18v / 3v / 3v).
- 3- Toluène / Acétone / Acide formique (60v /60v / 10v).

Le système de solvant migre lentement le long de la plaque jusqu'au trait de fin de migration en entraînant les composants déposés.

Après la fin de la migration, les plaques sont séchées puis visualisées, seul le deuxième système (Toluène / Acétone / Acide formique : 18v / 3v / 3v) qui a permis d'obtenir une très bonne séparation chromatographique (figure N°25).



Figure N°25: Chromatogramme des extraits des feuilles de *Citrus limon* à l'œil nu.

AG : acide gallique, AT : acide tannique, Q : quercétine, R : rutine, EE : extrait éthanolique,
EC : extrait chloroformique, EM : extrait méthanolique.

Les taches sont pas bien visible à l'œil nu, pour une bonne visualisation deux lampes UV sont utilisées, l'une à une longueur d'onde de 253,7 nm et l'autre à 365nm, cette dernière a donné des résultats plus clairs que la première. Alors que, la pulvérisation avec le trichlorure d'aluminium n'a pas amélioré la visualisation.

Le chromatogramme des extraits des feuilles de *Citrus limon* observé sous une lampe UV à 365nm est bien illustré dans la figure N°26 :

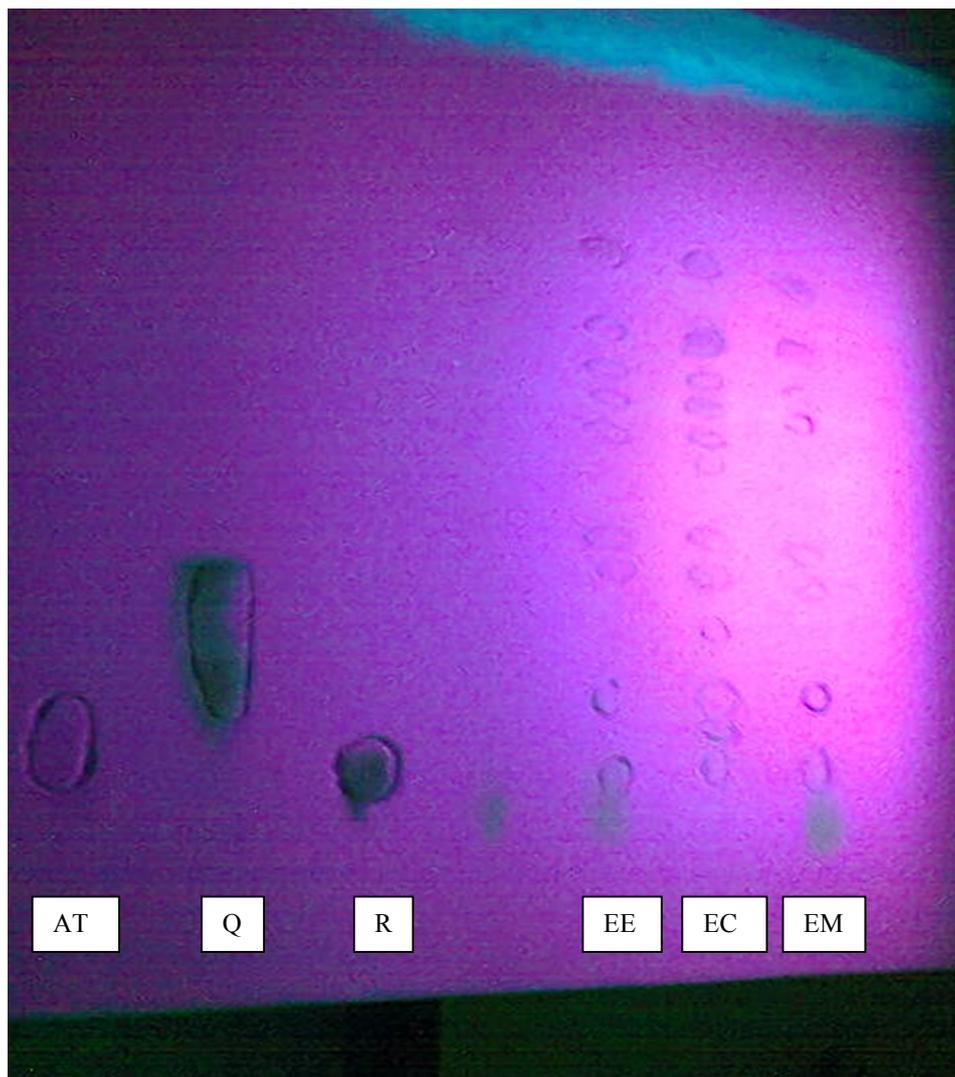


Figure N°26 : chromatogramme des extraits des feuilles de *Citrus limon* observé sous une lampe UV à 365nm

La visualisation de chromatogramme des extraits des feuilles de *Citrus limon* avec une lampe UV à une longueur d'onde de 365nm a permis de mettre en évidence d'autres tâches qui ne sont pas visibles à la lumière de jour, les tâches sont nombreuses et proches l'une de l'autre, un tel résultat témoigne de la richesse de ces extraits en composés phénoliques.

Le nombre de tâches diffère d'un extrait à un autre, l'extrait chloroformique possède 12 tâches suivi de l'extrait méthanolique avec 9 tâches puis de l'extrait éthanolique avec 8 tâches. Sachant que la différence dans le nombre de tâches reflète la différence dans la composition en flavonoïdes de chaque extrait, cela montre que l'extrait chloroformique est le plus riche en flavonoïdes, ce qui confirme les résultats trouvés dans le dosage des flavonoïdes (Voir figure N°18 préalablement démontrée p: 45).

Les rapports frontaux (Rf) de chaque tache issue des standards utilisés ainsi que celles des extraits sont montrés dans le tableau V et VI respectivement.

Tableau V: les rapports frontaux des standards.

Taches	A gallique	A tannique	Quercétine	Rutine
Rf	0,115	0,095	0,155	0,068

Tableau N° VI: Les Rf des taches issues des extraits des feuilles de *Citrus limon*.

Tache	Rf	E. éthanolique	E. chloroformique	E. méthanolique
Tache 1	0,068	+	+	+
Tache 2	0,115	-	+	-
Tache 3	0,155	+	+	+
Tache 4	0,223	-	+	-
Tache 5	0,284	+	+	+
Tache 6	0,318	+	+	+
Tache 7	0,412	-	+	-
Tache 8	0,439	+	+	-
Tache 9	0,473	+	+	+
Tache 10	0,506	+	+	+
Tache 11	0,554	+	+	+
Tache 12	0,642	+	+	+

+: présence / -: absence

Par le biais des rapports frontaux des témoins utilisés, nous avons pu mettre en évidence la présence de la rutine qui est un Flavone glycoside et la quercétine qui est un flavonol dans les trois extraits des feuilles de *Citrus limon*, aussi la présence de l'acide

gallique qui est un acide phénol dans l'extrait chloroformique. Cependant, il nous a paru difficile de faire l'identification des autres taches par manque de standards et de littérature sur cette plante. Il serait alors intéressant d'approfondir cette identification par utilisation d'outils plus performants telle la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse ou à la RMN, afin de pouvoir caractériser ces composés bioactives à intérêt biologique.

Conclusion et perspectives



*« Une mauvaise herbe est une plante
dont on n'a pas encore trouvé les vertus »
Ralph Waldo Emerson.*

Conclusion et perspectives

La présente étude avait pour objectifs le dosage des différentes classes de composés phénoliques des feuilles de *Citrus limon* ainsi que l'évaluation de leurs activités antioxydante.

Dans ce but une extraction par macération en utilisant trois solvant (éthanol, méthanol, chloroforme) a été réalisée dont le plus grand rendement est observé dans l'extrait éthanolique avec 14,98%.

Les résultats des différents dosages ont permis de mettre en évidence la richesse des extraits de feuilles de citrus limon en différentes classes de composés phénoliques (les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les proanthocyanidines), les teneurs en ces composés se diffère d'un extrait à un autre ce qui révèle l'effet de choix de solvant sur le taux d'extraction.

L'ensemble des extraits étudiés a révélé des propriétés antioxydantes intéressantes, notamment l'activité scavenger de DPPH et la réduction de phosphomolybdate, qui peuvent atteindre respectivement **94,74%** et **87,07%**.

Une très bonne corrélation linéaire est obtenu entre les teneurs en composés phénoliques totaux des feuilles de citrus limon et leur activité antiradicalaire ainsi que leur pouvoir réducteur, ce qui révèle que les composés phénoliques de ces feuilles contribuent à leur activité antioxydante.

L'analyse des différents extraits par une chromatographie sur couche mince affirme la richesse des feuilles de *Citrus limon* en composés phénoliques, ainsi, de la rutine, la quercétine et l'acide gallique ont été détectés dans ces feuilles.

Au terme de cette étude, il serait nécessaire de signaler que les feuilles de *Citrus limon* sont une bonne source de composés phénoliques qui a montré efficacement son potentiel antioxydant naturel qui pourrait être utilisé comme un substituant dans la conservation alimentaire ou encore se protéger contre les radicaux libres qui sont liés à l'origine de l'apparition de nombreuses maladies.

Dans cette perspective et dans le but de compléter cette étude qui est préliminaire et superficielle :

Il serait intéressant de procéder à une caractérisation qualitative plus poussée, des extraits des feuilles de *Citrus limon* par la détermination des structures et des propriétés chimiques de leurs composés phénoliques.

Il serait également intéressant de réaliser d'autres études pour évaluer le potentiel antioxydant *in vivo* et pour s'assurer de la non toxicité de ces feuilles.

Des études plus profondes sur d'autres propriétés biologiques (antivirale, anti-inflammatoire, antimicrobienne...) s'avèrent aussi très importantes à effectuer.

Des études sur la biodisponibilité et le mode d'utilisation de ces métabolites secondaires méritent d'être menées afin d'envisager la formulation d'un médicament doué d'une activité antioxydante qui peut être une alternative des médicaments synthétiques et qui fait face aux maladies liées au stress oxydatif.

*Références
bibliographiques*

Référence bibliographique

- **Abuja, P.M., et Albertini, R. (2001).** Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta.*, **306**, 1-17.
- **Adedapo, A.A., Jimoh, F.O., Koduru, S., Masika, P.J.; et Afolayan, A.J. (2008).** Evaluation of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of *Halleria lucida*. *Bioresource Technology*, **99**, 4158-4163.
- **Adrar, S. (2009).** Evaluation des activités anti-oxydante oxydase et anti-radicalaire des extraits de bourgeons de *Populus nigra* et des feuilles de *Fraxinus angustifolia*. Thèse de Magistère. Université de Béjaia. 87 p.
- **Agarwal, M., Kumar, A., Gupta, R., et Upadhyaya, S. (2012).** Extraction of Polyphenol, Flavonoid from *Emblica officinalis*, *Citrus limon*, *Cucumis sativus* and Evaluation of their Antioxidant Activity. *Orient. J. Chem.*, **28(2)**, 993-998.
- **Akroum, S. (2006).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. These de Doctorat. Université Mentouri de Constantine. 110 p.
- **Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., et Weil, J.A. (2004).** Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.*, **84**, 551-562.
- **Arias, B. Á., et Ramón-Laca, L. (2005).** Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Ethnopharmacology*, **97**, 89-95.
- **Barboni, T. (2006).** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse de doctorat. Université de Corse. 287 p.
- **Baskar, R., Rajeswari, V., et Sathish Kumar, T. (2007).** In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, **45**, 480-485.

- **Belkheiri, N. (2010).** Derives phenoliques a activites antiatherogenes. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'université de Toulouse. 113 p.
- **Bellebcir, L. (2008).** Etude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréales. Thèse de magister. Université Mentouri de Constantine. 73 p.
- **Berger, M. M. (2006).** Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20**, 48-53.
- **Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., et Sapirstein, H. D. (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of Pearled wheat and Roller-Milled Fractions. *Cereal chem.*, **82** (4), 390-393.
- **Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., et Rice-Evans, C. (1998).** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochemistry Journal*, **330**, 1173-1178.
- **Bonnot, F. (2009).** Superoxyde réductase : Mécanisme de transfert d'électrons vers le site actif et rôle de la lysine 48 dans la catalyse. Thèse pour l'obtenir le grade de Docteur de l'Université Joseph Fourier. 189 p.
- **Bouldjadj, R. (2009).** Etude de l'effet antidiabétique et antioxydant de l'extrait aqueux lyophilisé d'*Artemisia herba alba* Asso chez des rats sains et des rats rendus diabétique par streptozotocine. Thèse de magister. Université Mentouri de Constantine. 90 p.
- **Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, **74**, 2157-2184.
- **Calomme, M., Pieters, I., Vlietinck, A., et Vanden-Berghe, D. (1996).** Inhibition of bacterial mutagenesis by Citrus flavonoids. *Planta Med.*, **62** (3), 222-226.
- **Cha, J. Y., Cho, Y. S., Kim, I., Anno, T., Rahman, S. M., et Yanagita, T. (2001).** Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and

phosphatidatephosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats.*Plant Foods for Human Nutrition*, **56**, 349-358.

➤ **Cheynier, V. (2005).** Polyphénols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Chimiurgie Nutrition*, **81**, 223-229.

➤ **Choi, H. J., Song, J. H., et Park, K.S. (2009).** Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **37 (4)**, 329-33.

➤ **Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., et Chou, S. T. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 2454-2458.

➤ **Colomma, P. (2006).** Manipulation des voies de biosynthèse des synthones dédiés à la chimie verte. In: *La chimie verte*. Ed, Lavoisier. Paris. PP: 41-74.

➤ **Comhair, S. A., et Erzurum, S. C. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, **283**, 246-255.

➤ **Cowan, M.M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12 (4)**, 564-582.

➤ **Curtay, J.P., et Robin, J.M. (2000).** Intérêt des complexes antioxydants. Centre d'étude et développement de la nutrithérapie. 4 p.

➤ **Dawidowicz, A.L., Wianowska, D. et Baraniak, B. (2006).** The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (Antioxidative properties of extracts). *Food Science Technology*, **39**, 308-315.

➤ **Del-Rio, J. A., Fuster, M.D., Gomez, P., Porrás, I., Garcia-Lidon, A., et Ortuno, A. (2004).** *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chemistry*, **84**, 457- 461.

➤ **Diallo, A.M. (2005).** Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou) Phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée). Thèse de Doctorat. Université de Bamako. 125p

- **Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K., et Maiza, A. (2004).** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie*, **7**, 1073-1080.
- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., et Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, **97**, 654-660.
- **Dubois, C. (2006).** *Les arbres fruitiers*. Ed, Rustica. Paris. 127 p.
- **Dugo, G., et Di-Giacomo, A. (2002).** *Citrus: the genus Citrus*. Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles. CRC Press Taylor and Francis group, 642 p.
- **Durackova, Z., Djrolo, F., Hougbe, H., Avode, G., Attoulou, V., Addra, B., Kodjoh, N., et Avimadj, M. (2008).** Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Ed, Gvozdjakova A. PP: 19-43.
- **Esposito, E. (2006).** Role of nutritional antioxidants in the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. In: *Nutrient-drug interactions*. CRC Press. 129-157.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques*, 108-116.
- **Fernández, M., Caballero, J., et Morales, H. A. (2005).** Quantitative structure-activity relationship to predict differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *Bioorg Medical Chemistry*, **13 (9)**, 3269-77.
- **Fuster, M. D. (1997).** Citrus Flavonoids. Distribution, modulation by phyto regulators and their possible physiological function. PhD. University of Murcia. Spain. ISBN: 84-7684-973-0.
- **Garait, B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la Glisodin. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université Joseph Fourier-Grenoble. 159 p.

- **Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., et Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *Mécanismes biochimiques*, 91-96.
- **Gerard-Monnier, D., et Chaudière, J. (1996).** Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion. *Path Biol.*, **44**, 77-85.
- **Ghasemi, K., Ghasemi, Y., et Ebrahimzadeh, M.A. (2009).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 Citrus species peels and tissues. *Pakistan J. Pharmacol. Sci.*, **22**, 277-281.
- **González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A., et García-Viguera, C. (2010).** Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**, 327- 345.
- **Goudable, J., et Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol.*, **11**, 115-20.
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., et Capelle, J.P. (2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege.*, **62 (10)**, 628-638.
- **Han, X., Shen, T., et Lou, H. (2007).** Dietary Polyphénols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, **8**, 950-988.
- **Harrison, R. (2002).** Structure and fonction of xantineoxidoreductase: Where are we now? *Free Radic. Biol.Med.*, **33**, 774-797.
- **Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., et Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 572-584.
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., et Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**, 2-5.
- **Huang, D., Ou, B., et Prior, R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agricultural and Food Chemistry*, **53 (6)**, 1841-1856.

- **Kanoun, K. (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis L.* (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Thèse de magister. Université AboubekerBelkaid de Tlemcen. 96 p.
- **Karabulut, A., Canbolat, O., Ozkan, C. O., et Kamalak, A. (2007).** Determination of Nutritive Value of Citrus Tree Leaves for Sheep Using In vitro Gas Production Technique. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, **20 (4)**, 529-535.
- **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.
- **Khan, I. A. (2007).** Citrus: Genetics, Breeding and Biotechnology. Ed, Library of Congress. Washington. 370 p..
- **Kolai, N., Berkani, A., et Lotmani, B. (2007).** Analyse chromatographique (CCM) des flavonoïdes des feuilles des Citrus en relation avec le taux de contamination de *Phyllocnistiscitrella Staint* (Lepidoptera ; Gracillariidae). Université de Mostaganem. Laboratoire de la protection des végétaux. 195-202.
- **Krause, D. O., Smith, W.J.M. Brooker, J. D., et McSweeney, C. S. (2005).** Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, **121**, 59-75.
- **Kurowska, E. M., Borradaile, N. M., Spence, J. D., et Carroll, K. K. (2000).** Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. *Nutrition Research*, **20**, 121-129.
- **Ladaniya, M. S. (2008).** Citrus fruit: Biology, technology and evaluation. Ed, Elsevier Inc. London. 558 p.
- **Lagnika, L. (2005).** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse pour obtenir le titre de docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur. 248 p.

- **Laguerre, M., Lecomte, J., et Villeneuve, P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, **46**, 244-282.
- **Lapornik, B., Prosek M., et Gloc-Wondra, A. (2005).** Comparaison of extracts prepared from plant by-product using different solvent and extraction time. *Journal of Food Engineering*, **71**, 214-222.
- **Levizou, E., Petropoulou Y., et Manetas Y. (2004).** Total carotenoid amount in crude twig extracts may be overestimated due to interference by high contents of coextracted phenolics. *Photosynthetica*, **42 (2)**, 295-297.
- **Lugasi, A., Hovari, J., Sagi, K.V., et Biro, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta, Biologica Szegedensis*, **4**, 119-125.
- **Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K.P., Dexter, D.T., et Aruoma, O.I. (2005).** Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International*, **38**, 357-367.
- **Mache Nkouadou, P. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux de quelques épices et légumes de l'ouest-Camerone. Mémoire de diplôme professeur de l'enseignement secondaire deuxième grade. Université de Yaoundé I. 67 p.
- **Macheix, J.J., Fleuriet, A., et Sarni-Manchado, P. (2005).** Les composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : *Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Ed, presses polytechniques. Universitaires Romandes. PP: 31-32.
- **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.

- **Marfak, A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoges. 187 p.
- **Menichini, F., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Conforti, F., De-Luca, D., Statti, G. A., Cindio, B., Menichini, F., et Tundis, R. (2011).** Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 1549-1555.
- **Meot-Duros, L., et Magne, C. (2009).** Antioxidant activity and phenol content of *Crithmum maritimum* L. leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**, 37-41, '
- **Milane, H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université de Louis Pasteur. 155 p.
- **Milardovic, S., Ivekovic, D., et Bozidar, S.G. (2006).** A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, **68**, 175-180.
- **Moosmann, B., et Behl, C. (1999).** The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 8867-8872.
- **Muthiah, P.L., Umamaheswari, M., et Asokkumar, K. (2012).** *In vitro* antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of Citrus. *International Journal of Phytopharmacy*, **2 (1)**, 13-20.
- **Naczki, M., et Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A.*, **1054**, 95-111.
- **Nerovique, G., Ben Slama, H., Azagoh, C., et Favet, R. (2011).** *Extraction et purification de composés végétaux d'intérêt fonctionnel: Elaboration d'une crème de nuit à base d'huile essentielle de citron.* Ed. Montpellier Sup-Agro. Universités Montpellier. 44 p.

- **Pelli, K., et Lyly, M. (2003).** Les antioxydants dans l'alimentation. Ed, VTT Biotechnology Finlande. INRA.France.17 p.
- **Peterson, J. J., Beecher, G.R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S.E., Haytowitz, D. B., et Holden, J. M. (2006).** Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Food Composition and Analysis*, **19**,74-80.
- **Pincemail, J., Meurisse,M., Limet, R., et Defraigne, J. O. (1998).** Mesure et utilisation des antioxydants. *Médecine Sphère*, **73**, 233-239.
- **Piotrowski, W.J., et Marczak, J. (2000).** Cellular sources of oxidant in the lung. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, **13**, 369-385.
- **Pokorny, J., Yanishlieva, N., et Gordon, M. (2001).** Antioxydants in food, Practicalapplications.Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.
- **Price, M.L., Van scoyoc, S., etButler, L.G. (1978).** A critical evaluation of the vanillinreaction as an assay for tannin in sorghum grain.*J. Agric. Food Chem.*, **26**, 1214-1218.
- **Prieto, P., Pineda, M., et Aguilar, M., (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of aphosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.*,**269**, 337-341.
- **Pstovà, J., Lasovsky, J., et Vicar, J. (2003).**Metal–chelating Propertys, ElectrochemicalBehaviour, Scavenging and Cytoprtoective Activities of Six Natural Phenolic. *Biomed. Papers*, **147 (2)**, 147-153.
- **Owen, P. L., et Johns T. (1999).**Xanthine oxidase inhibitory activity of northeasternnorthAmerican plant remedies used for gout. *Ethnopharmacology*, **64**,149-160.
- **Ribereau–Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. Paris. 254 p.

- **Richter, G. (1993).** Composés phénoliques. In: *Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie*. Ed, Press polytechniques. Universitaires Romand. PP: 317-339.
- **Rock, E. (2003).** Stress oxydant, micronutriments et santé. Inra – CRNH, unité des maladies métaboliques et micronutriments 63122 St Genès Champanelle. Université d'été de nutrition – Clermont- Fenand , 37-42.
- **Royer, M., Houde, R., et Stevanovic, T. (2010).** Technologies de conversion. In *potentiel de développement lié aux extractibles: état des connaissances et revue des marchés*. 118 p.
- **Saïdani Tounsi, M., Ouerghemmi, I., Aidi Wannes, W., et Ksouri, R. (2009).** Valorization of three varieties of grape. *Industrial Crops and Products*, **30**, 292-296.
- **Salvayre, R., Auge, N., et Nègre-Salvayre, A. (2003).** Rôle de l'oxydation dans la genèse et la progression de l'athérosclérose. In *L'athérosclérose : Physiopathologie, Diagnostics, Thérapeutiques*. Toussaint, J.F., Jacob, M.P., Lagrost, L., et Chapman, J. Eds. Masson: Paris. PP: 269-290.
- **Schisler, N.J., et Singh, S.M. (1989).** Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free Radicals. *Free Radical Biol. Med.*, **7**, 117-123.
- **Servais, S. (2004).** Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon1. France. 127 p.
- **Shrififar, F., Dehghn-Nudeh, G., et Mirtajaldini, M. (2008).** Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, **112**, 885-888.
- **Sinha, B.K., Mimnaugh, E.G., et Myers, C.E. (1989).** Adryamicin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells. *Cancer Res.*, **49**, 3844-3848.
- **Spedding, G., Ratty, A., et Middleton, E. (1989).** Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.*, **12 (2)**, 99-110.

- **Stamler, J.S., et slivka, A. (1996).** Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nuts Rev.*, **54**, 1-30.
- **Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., etChowwanapoonpohn, S. (2007).** Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, **103**, 381-388.
- **Terrier, N., Poncet-Legrand, C., et Cheynier, V. (2009).** Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. *Wine Chemistry and Biochemistry*, **18**, 463- 496.
- **Tripoli, E., La-Guardia, M., Giammanco, S., Di-Majo, D., et Giammanco, M. (2007).** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties. *Food Chemistry*, **104**, 466-479.
- **Van Antwerpen, P. (2006).** Contribution a l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène / chlorure. Thèse de Doctorat. Université libre de Bruxelles. 221 p.
- **Vattem, D.A., Ghaedian, R., et Shetty, K. (2005).** Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pac J Clin Nutr.*, **14 (2)**, 120-130.
- **Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., et Oomah, B.D. (1998).** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Agric. Food Chem.*, **46**, 4113-4117.
- **VenkatRatnam, D., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., et Ravi-Kumar, M.N.V. (2006).** Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Controlled Release*, **113**, 189-207.
- **Vercauteren J., Cheze C., et Triaud J. (1998).** Polyphenols 96. Ed, INRA. France. 289 p.
- **Verykokidou-Vit, S., et Voyo, E.C. (1986).** Methylated flavones from *teucrium polium*. *Planta Medica*, **5**, 343-432.

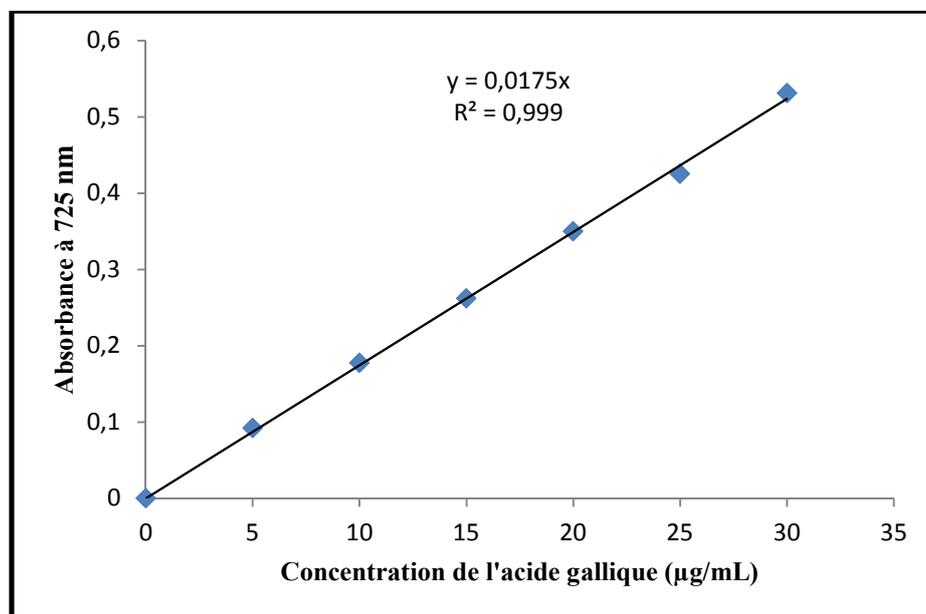
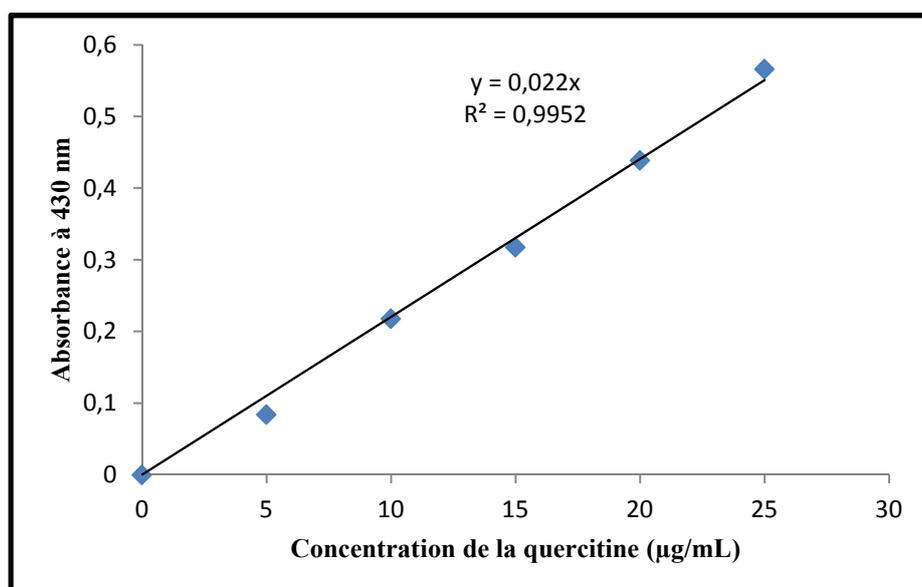
- **Wilson, A., et Salamatian, L. (2003).** Les radicaux libres: Une question d'équilibre, Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines. 37 p.
- **Yu, R., Mandlekar, S., et Tony Kong, A.N. (2000).** "Molecular mechanisms of butylatedhydroxylanisoleinduced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c". *Molecular Pharmacology*, **58**, 431- 437.
- **Zheng, W., et Wang, S. Y. (2001).** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5165-5170.
- **Zimmer, N., et Cordesse, R. (1996).** Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod. Anim.*, **9 (3)**, 167-179.

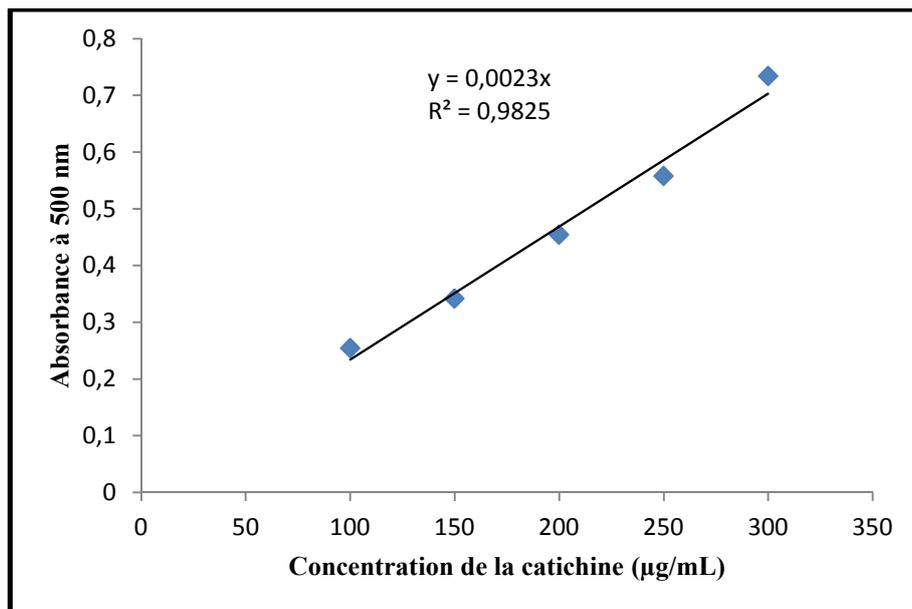
Site internet:

Anonyme(2012): www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/lemon.

Annexes

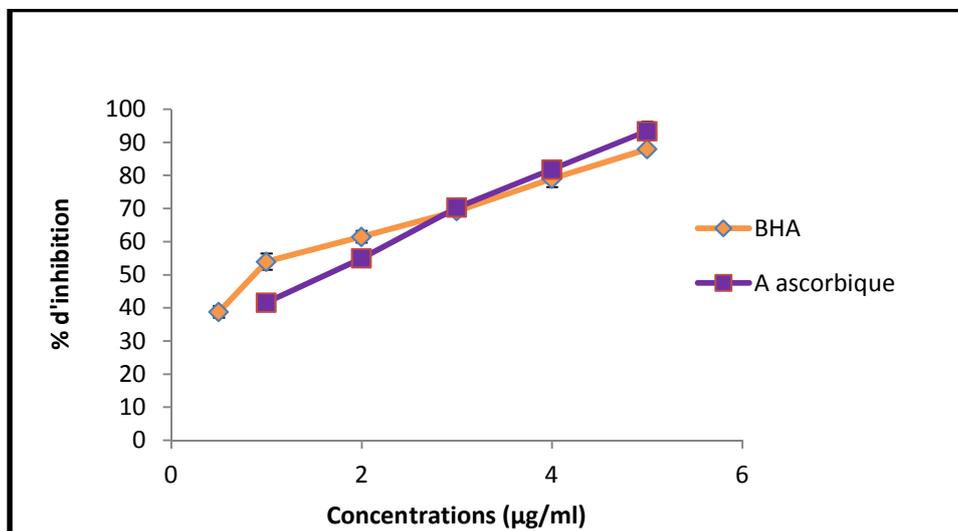
Annexes

Annexe I: Courbes d'étalonnage des polyphénols totaux, flavonoides et des tannins condensés**Annexe I.1:** Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.**Annexe I.2:** Courbe d'étalonnage des flavonoides.

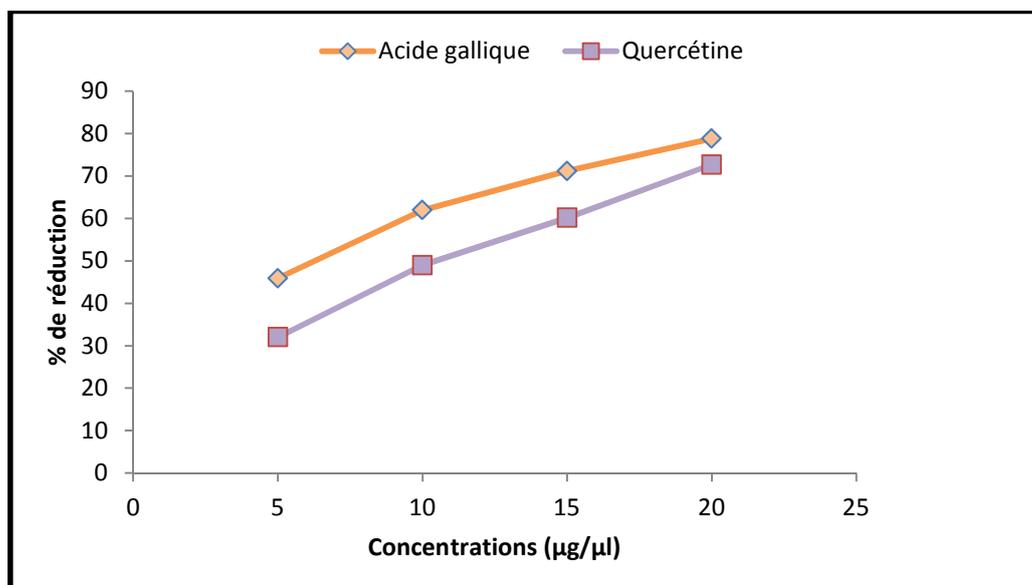


Annexe I.3: courbe d'étalonnage des tannins condensés.

Annexe II : La représentation graphique de l'évaluation de l'activité antiaxydante des standards.

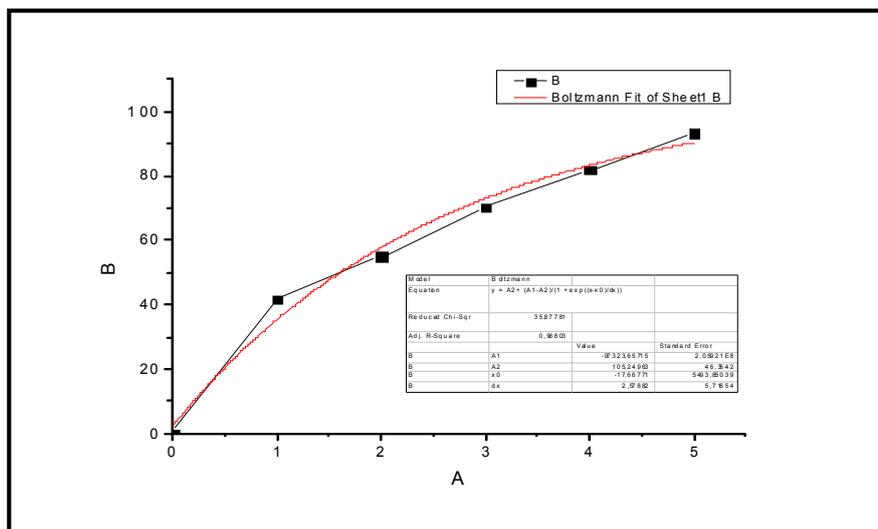


Annexe II.1 : Evaluation de pouvoir antiradicalaire en fonction des concentrations des standards.

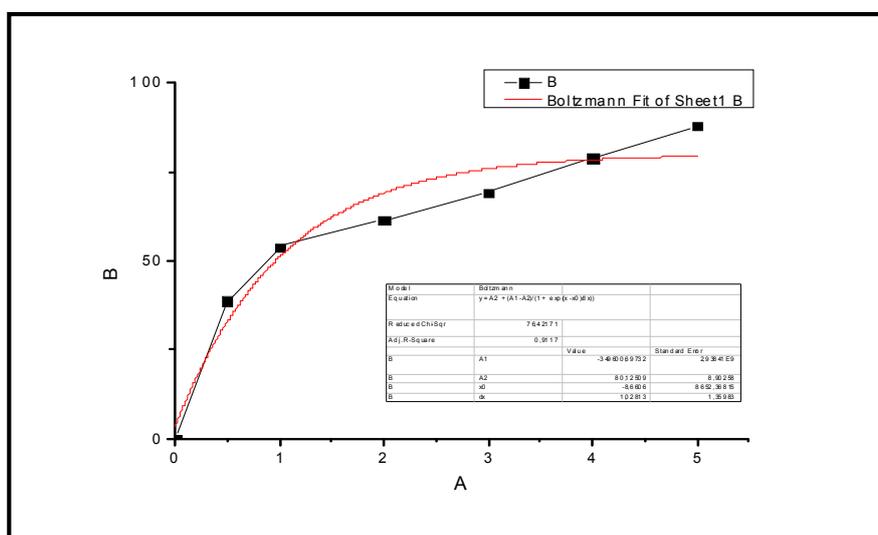


Annexe II.2: Représentation graphique de l'évaluation de la réduction de Mo^{+6} par l'acide gallique et la quercétine.

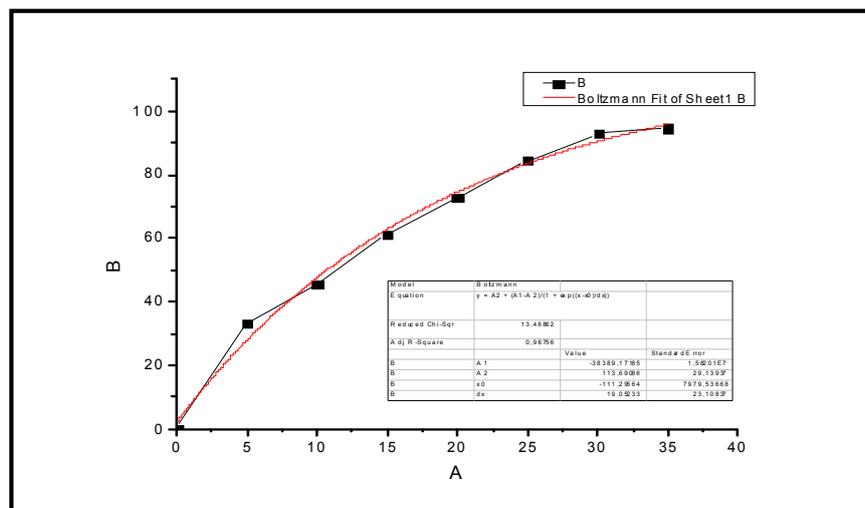
Annexes III: courbes obtenus par Origin8 pour le calcul des IC₅₀ de l'acide ascorbique, BHA et des extraits des feuilles de *Citrus limon* dans l'activité scavenging du DPPH.



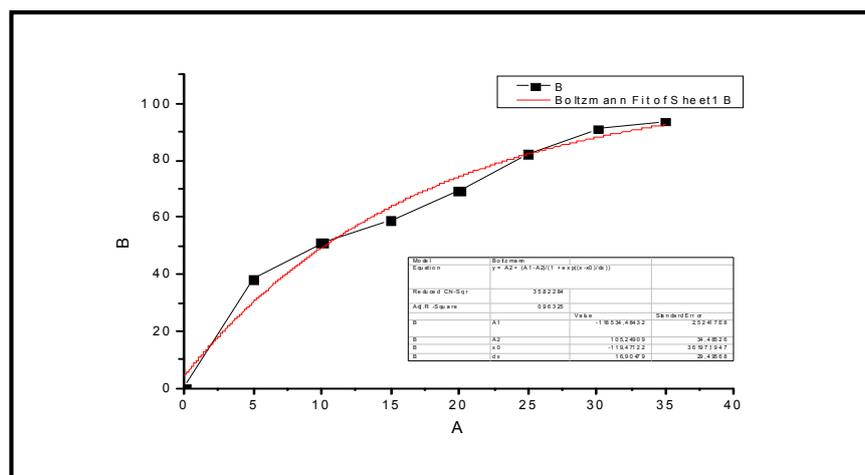
Annexe III.1: courbe pour le calcul de IC₅₀ de l'acide ascorbique



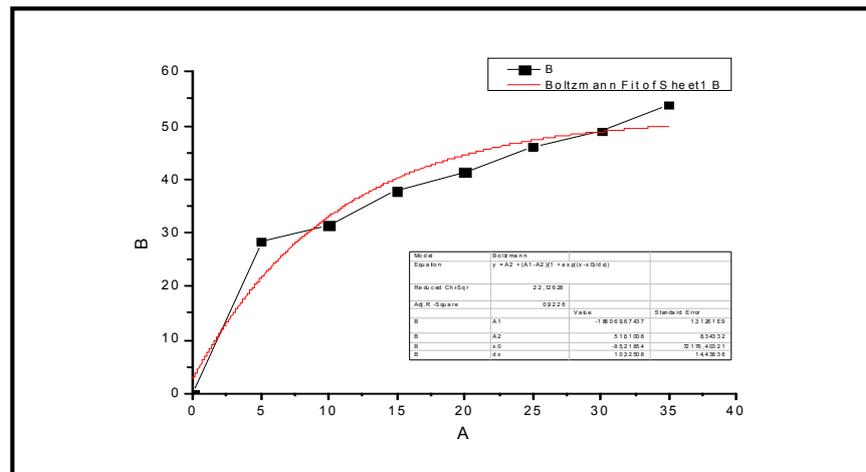
Annexe III.2: courbe pour le calcul de IC₅₀ du BHA



Annexe III.3: courbe pour le calcul de IC_{50} de l'extrait méthanolique des feuilles de *Citrus limon*.

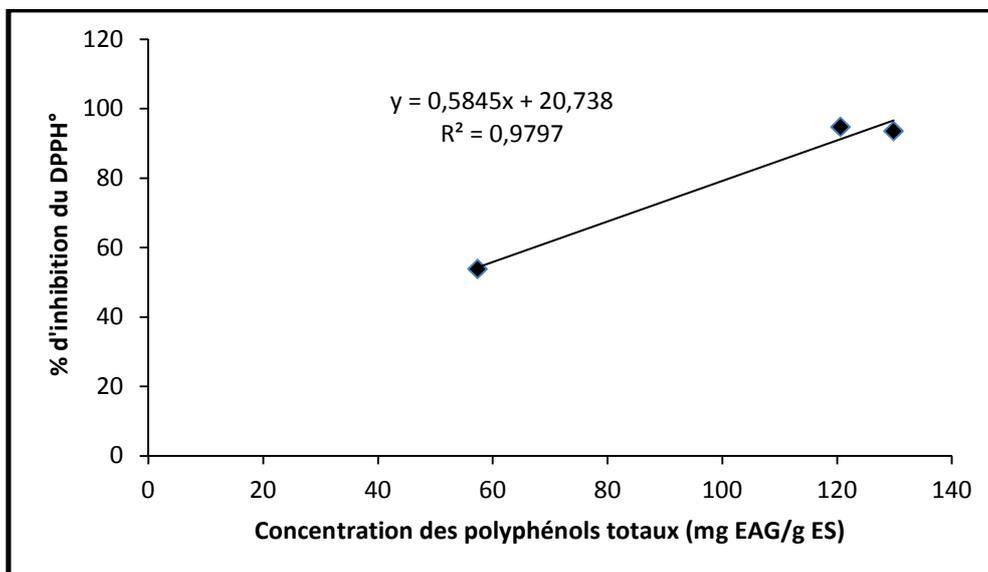


Annexe III.4: courbe pour le calcul de IC_{50} de l'extrait éthanolic des feuilles de *Citrus limon*.

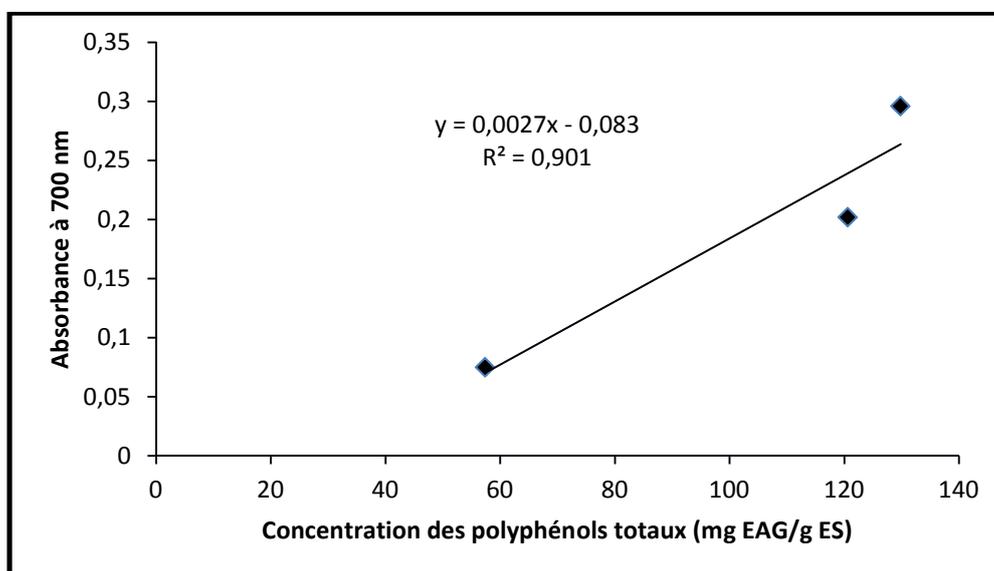


Annexe III.5: courbe pour le calcul de IC_{50} de l'extrait chloroformique des feuilles de *Citrus limon*.

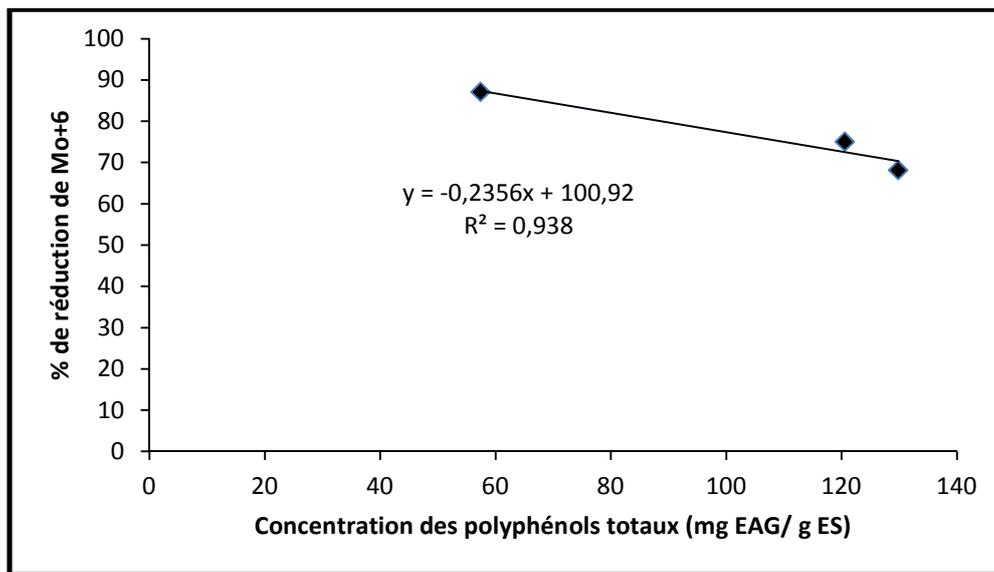
Annexe IV: les courbes de corrélation entre la concentration des composés phénoliques et leur activité antioxydante .



Annexe IV.1: La corrélation linéaire entre l'activité scavenging de radical DPPH et la concentration des polyphénols totaux dans les extraits des feuilles de *Citrus limon*.



Annexe IV.2: La corrélation linéaire entre l'activité chélatrice de fer et la concentration des polyphénols totaux dans les extraits des feuilles de *Citrus limon*.



Annexe IV.3: La corrélation linéaire entre l'activité chélatrice de Mo⁺⁶ et la concentration des polyphénols totaux dans les extraits des feuilles de Citrus limon.

Résumé

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude des molécules antioxydantes d'origine naturelle.

Notre travail vise à faire une étude phytochimique qui porte sur le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et proanthocyanidines) des extraits méthanolique, éthanolique et chloroformique des feuilles de *Citrus limon*, ainsi que, l'évaluation de leur activité antioxydante.

Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence la présence des polyphénols totaux, flavonoïdes et proanthocyanidines dans les différents extraits avec des teneurs variables, les meilleures teneurs observées pour ces trois classes de composés phénoliques sont respectivement **129,83±3,245** mg EAG/g ES, **81,345 ± 2,341** mg EQ/g ES et **55,94 ± 1,323** mg EC/g ES.

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par trois tests; le piégeage du radical libre DPPH; la réduction du fer et la réduction de phosphomolybdate, les résultats obtenus révèlent des propriétés antioxydantes intéressantes.

L'analyse qualitative des composés phénoliques des extraits de feuilles de *Citrus limon* par chromatographie sur couche mince a révélé la présence de la rutine, la quercétine et l'acide gallique.

Mots clés : feuilles de *Citrus limon*, activité antioxydante, polyphénols, flavonoïdes, proanthocyanidines.

Abstract

Most of interest of current research relates to study the natural antioxidant molecules.

Our work aims is to realize a phytochemical study which relates to the proportioning of the phenolic compounds (total polyphenols, flavonoids and proanthocyanidines) of the extracts methanolic, ethanolic and chloroformic of the *Citrus limon* leaves as well as, the evaluation of their antioxidant activity.

The phytochemical tests realized can be to highlight the total polyphenols, flavonoids and proanthocyanidines in the different extracts with variable contents, the best contents observed for these three classes of phenolic compounds are respectively **129,83±3,245** mg GAE/g DE, **81,345 ± 2,341** mg EQ/g DE et **55,94 ± 1,323** mg EC/g DE.

The antioxidant activity of the various extracts was evaluated by three tests; DPPH radical scavenging activity, the reduction of iron and the reduction of phosphomolybdate, the results obtained reveal interesting antioxidant properties.

The qualitative analysis of polyphenols of *Citrus limon* leaves by thin layer chromatography exposed us the presence of rutine, quercétine and gallic acid in *Citrus limon* leaves.

Key words: *Citrus limon* leaves, antioxidant activity, polyphenols, flavonoids proanthocyanidines.