

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2023

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV **Filière : Sciences Biologiques**

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

HAMED KHODJA Ryma & LAMRAOUI Thanina

Thème

Activités antioxydante et antibactérienne des feuilles d'agrumes

Soutenu le : 02/07/2023

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

M^{me} BENSMAIL Souhila

MCB

Univ. de Bouira

Présidente

Mr TIGHILET Karim

MCB

Univ. de Bouira

Promoteur

M^{me} BACHIRI Taous

MCB

Univ. de Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

*Louange à Dieu le tout puissant de nous avoir accordé la bonne santé, la volonté et l'opportunité de mener à terme et de réussir cette étape de notre vie. Nous exprimons notre profonde gratitude et nos remerciements les plus sincères à notre promoteur Monsieur **Tighilet Karim** de nous avoir permis d'accomplir ce travail.*

Pour sa patience, pour le temps qu'il nous a consacré, pour sa disponibilité et sa supervision éclairée tout au long de la rédaction du mémoire.

*Nos vifs remerciements aux membres du jury : M^{me} **Bensmail Souhila** et M^{me} **Bachiri Taous***

*Un grand merci à Madame **Djenadi Katia** pour ses conseils.*

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'appui de l'ensemble du personnel des laboratoires de biochimie et de microbiologie, nous les remercions profondément.

Merci à tous nos collègues et amis qui nous ont soutenus durant ce travail.

Merci à toute personne qui a contribué au bon déroulement de ce travail de prêt ou de loin.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

Aux deux personnes qui comptent le plus pour moi, à ceux qui m'ont soutenu tout le long de ma vie et de mes études, à mes chers parents. Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie, ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde gratitude, que Dieu vous bénisse et vous protège.

A mes chers frères Nabil et Nourdinne qui n'ont pas cessé de m'encourager et soutenir tout au long de mes études. Que dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur

A mes sœurs Hadjer et Sara

A mes petits adorables Amdjed et Younes qu'ils savent toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille

A ma cousine Asma et ma copine Melissa

A mes collègues Asma, Wissam et Amel

Sans oublier mon binôme Thanina pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

Ryma

Dédicaces

Je dédie ce travail aux personnes les plus chères de ma vie : Maman et Papa, sans eux je ne serais pas moi aujourd'hui.

Ainsi qu'à mes frères et à mon petit bonhomme Yazane

Une pensée à mon ange gardien qui n'est pas avec moi en cette étape de ma vie mais qui ne quitte pas mon cœur une seconde

Je voudrais remercier ma parabatai pour tout le soutien et l'amour qu'elle m'offre à chaque instant de ma vie

Remercier my heartbeat pour partager mon âme

Je dédie ce travail à toutes mes besties Asma, nesrine et Soraya

Et surtout à ma partenaire, mon binôme et ma chère amie Ryma qui à partager avec moi tous les moments de rires et de difficultés pour enfin avoir le fruit de notre réussite

Je remercie toute personne qui fait en sorte d'ajouter un grain de joie à ma vie

Thanina

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Partie 1 : Étude bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les agrumes

I.1 Historique	3
I.2 Production mondiale.....	4
I.3 L'agrumiculture en Algérie.....	6
I.4 Les secteurs de production.....	8
I.5 Exigences climatiques des agrumes.....	10
I.5.1 La température.....	10
I.5.2 La pluviométrie.....	10
I.5.3 L'humidité.....	10
I.5.4 Le vent.....	11
I.6 Classification et systématique.....	11
I.7 Le genre <i>Citrus</i>	12
I.8 Description de quelques espèces du <i>Citrus</i>	12
A. <i>Citrus clementina</i>	12
B. <i>Citrus sinensis</i>	12
C. <i>Citrus aurantium</i>	13
D. <i>Citrus aurantiifolia</i>	14
E. <i>Citrus limon</i>	14
I.9 Utilisation et effets thérapeutiques du <i>Citrus</i>	15

Chapitre II : Stress oxydant

II.1 Définition.....	17
II.2 Les radicaux libres.....	17

II.3 Sources de formation des radicaux libres.....	17
II.4 Principales cibles biologiques des ROS.....	19
II.5 Les pathologies liées au stress oxydant.....	20
II.6 Le système antioxydant.....	21
II.6.1 Système antioxydant du <i>Citrus</i>	21
i. La vitamine C et E.....	22
ii. Les caroténoïdes.....	22
iii. Les composés phénoliques.....	23
1. Les acides phénoliques.....	23
2. Les flavonoïdes.....	24
a) Flavones.....	25
b) Flavonols.....	25
c) Flavanones	25
d) Isoflavones	26
e) Anthocyanes	26
f) Chalcones	26
3. Les tannins	27

Partie 2 : Étude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthodes

I.1. Echantillonnage.....	28
I.2. Extraction des principes actifs.....	29
I.2.1. Préparation de la poudre des feuilles.....	29
I.2.2. Procédure d'extraction.....	30
A. Extraction assistée par ultrasons.....	30
B. Extraction par macération.....	31
I.2.3. Calcul des taux d'extraction.....	32
I.3. Dosage spectrophotométrique des composés phénoliques.....	32
I.3.1. Dosage des phénols totaux.....	32
I.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	34
I.3.3. Dosage des flavonols.....	35
I.3.4. Dosage des pigments liposolubles.....	35
I.4. Estimation de l'activité antioxydante.....	36

I.4.1 Détermination de l'activité antioxydante par la méthode au radical DPPH.....	36
I.4.2 Activités scavenger du radical ABTS ^{•+}	38
I.4.3 Test de réduction du fer (FRAP).....	40
I.5 Evaluation de l'activité antibactérienne.....	41
I.6 Analyse statistique des résultats.....	43
Chapitre II : Résultats et discussion	
II.1. Taux d'extraction.....	44
II.2. Dosages colorimétriques des extraits des feuilles de <i>Citrus</i>	45
II.2.1 Dosage des phénols totaux.....	45
II.2.2 Dosage des flavonoïdes.....	47
II.2.3 Dosage des flavonols.....	49
II.2.4 Dosage des composés liposolubles.....	51
II.3. Estimation de l'activité antioxydante.....	52
II.3.1 Activité scavenging du radical DPPH.....	52
II.3.2 Test du radical ABTS ^{•+}	54
II.3.3 Test de réduction du fer.....	56
II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	57
<i>Conclusion et perspectives</i>	59
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

AA	Acides aminés
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ATP	Adénosine- triphosphate
C.A.M	<i>Citrus aurantiifolia</i> extraction par macération
C.A.U	<i>Citrus aurantiifolia</i> extraction par ultrasons
C.C.M	<i>Citrus clementina</i> extraction par macération
C.C.U	<i>Citrus clementina</i> extraction par ultrasons
C.L.M	<i>Citrus limon</i> extraction par macération
C.L.U	<i>Citrus limon</i> extraction par ultrasons
DPPH	2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSA	Direction des Services Agricoles
EAG	Equivalent en acide gallique
EQ	Equivalent en quercétine
FAO	Food and Agriculture Organization
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization corporate STATistical database
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50%
KHz	Kilohertz
MS	Matière sèche
P/V	Poids /Volume
pH	potentiel Hydrogène
Qx	Quintaux
RLs	Radicaux libres
ROS	Reactive oxygen species
TC	Tannins condensés
UFC	Unité formant colonie
UV-Vis	Ultraviolet-visible

Liste des figures

Figure 1 : Répartition de la superficie et du rendement de la production mondiale d'agrumes en 2018.....	4
Figure 2 : Pourcentage de l'agrumiculture par rapport aux autres cultures en Algérie.....	6
Figure 3 : Les principaux produits de base produits en Algérie en 2021.....	7
Figure 4 : La répartition des zones agrumicoles en Algérie.....	8
Figure 5 : Systématique des agrumes et origine des <i>Citrus</i> cultivés.....	11
Figure 6 : Images des feuilles, fleurs et fruits de certaines variétés du genre <i>Citrus</i>	15
Figure 7 : Réduction de l'oxygène et la formation des radicaux libres.....	18
Figure 8 : Facteurs intervenant dans la surproduction des radicaux libres.....	19
Figure 9 : Régénération de la vitamine E par l'action de l'acide ascorbique.....	22
Figure 10 : Structure chimique d'un caroténoïde	23
Figure 11 : Structure chimique de certains acides phénoliques.....	24
Figure 12 : Structure de base du squelette des flavonoïdes et leurs classes.....	26
Figure 13 : Structure chimiques des tannins hydrolysables (a) et condensés (b).....	27
Figure 14 : Les différentes étapes de préparation de la poudre des feuilles de <i>Citrus</i>	29
Figure 15 : Extraction des principes actifs par ultrasons.....	30
Figure 16 : Extraction par macération.....	31
Figure 17 : Dosage standard des polyphénols avec l'acide gallique.....	33
Figure 18 : Réduction du radical DPPH.....	36
Figure 19 : Activité anti-radicalaire des extraits par le test DPPH.....	37
Figure 20 : Réaction de stabilisation du radical ABTS ⁺ par un antioxydant.....	38
Figure 21 : Activité scavenger des extraits de feuilles de <i>Citrus</i> par le test "ABTS".....	39
Figure 22 : Souches bactériennes repiquées sur les milieux d'isolement.....	42

Figure 23 : Taux d'extraction par macération et ultrasons des feuilles de *Citrus*.....44

Figure 24 : Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de feuilles de *Citrus*.....46

Figure 25 : Teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques des feuilles de *Citrus*.....47

Figure 26 : Taux des polyphénols et flavonoïdes des extraits des feuilles de *Citrus*.....49

Figure 27 : Teneurs en flavonols des extraits des feuilles de *Citrus*.....50

Figure 28 : Teneurs en composés liposolubles chez les trois feuilles de *Citrus*.....51

Figure 29 : Courbes d'activités scavenging du radical DPPH' des extraits de feuilles de *Citrus*.....52

Figure 30 : Potentiel réducteur des extraits des feuilles de *Citrus*.....56

Figure 31 : Activité antimicrobienne des extraits de feuilles de *Citrus*.....57

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux producteurs d'agrumes.....	5
Tableau II : Composition variétale des agrumes en Algérie.....	7
Tableau III : Composition variétale et taux de production des agrumes à Bouira.....	9
Tableau IV : Superficie et taux de production des agrumes à Bouira.....	10
Tableau V : Feuilles des variétés d'agrumes utilisés.....	28
Tableau VI : Concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH [*] des extraits de <i>Citrus</i>	53
Tableau VII : Activité antioxydante des extraits de feuilles de <i>Citrus</i> par le test ABTS ^{**} ...	54

Introduction

Introduction

Depuis des décennies, les plantes constituent une réserve inestimable de remèdes naturels pour l'humanité. Il est fascinant de constater que des feuilles, des racines ou des fleurs peuvent guérir ou atténuer des troubles pathologiques ou organiques (**Schauenberg, 2006**).

Les plantes ont une place prépondérante dans la médecine traditionnelle en Algérie, étant appliquées pour le traitement et la guérison de nombreuses pathologies, et parmi elles se trouvent les agrumes. Ces plantes constituent un vaste réservoir de composés actifs synthétisés sous forme de métabolites secondaires, bénéficiant de leur diversité structurale et possédant une large gamme d'activités biologiques.

La détermination des propriétés phytothérapeutiques reste un domaine de recherche fascinant et essentiel et attire de nombreux intérêts de recherche (**Maurice, 1997 ; Zeghad, 2009**). Les avantages pour la santé de la prise d'agrumes existaient déjà avant que les chercheurs ne commencent à étudier la composition de ces fruits.

Ces dernières années, de multiples recherches ont été réalisées afin de déterminer les substances bioactives, en particulier les polyphénols, présents dans les différentes parties des agrumes, notamment l'écorce, le fruit et la pulpe, pour mieux comprendre la corrélation entre comportements nutritionnels et la santé (**Essadik, 2014**). En revanche, les feuilles d'agrumes ont été peu étudiées par les chercheurs par comparaison aux autres parties de la plante (**Pietta et al., 2003 ; Hadrich et al., 2008**).

Les composés phénoliques sont définis comme des molécules possédant au moins un noyau aromatique avec au minimum une fonction hydroxyle sur ce cycle. Ils constituent une vaste famille de molécules synthétisées par les végétaux comme métabolites secondaires. (**Macheix et al., 2006**). De nombreuses études ont porté sur les activités biologiques de ces composés, notamment leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-enzymatiques et antibactériennes.

Des recherches menées par des épidémiologistes ont démontré que la prise de consommation de végétaux ayant une teneur élevée en antioxydants naturels, tels que les polyphénols et les vitamines est accompagnée d'une baisse du risque de développer divers cancer, des troubles cardiaques, de la maladie d'Alzheimer et de certaines affections liées à l'âge (**Mutahar et al., 2012**).

Le présent travail a pour objectif de déterminer et de comparer la quantité de composés phénoliques et les propriétés anti-radicalaires et antibactérienne des différents extraits de trois espèces du genre *Citrus* (*Citrus limon*, *Citrus aurantiifolia* et *Citrus clementina*), obtenus par deux techniques d'extraction : macération et l'extraction assistée par ultrasons.

Ce manuscrit est divisé en plusieurs sections, dont la première est une section bibliographique divisée en 2 parties : informations générales sur les agrumes et le stress oxydatif. La seconde se concentre sur l'aspect expérimental, détaillant le matériel végétal utilisé et les méthodes employées pour mener à bien cette recherche, suivie des résultats de six extraits foliaires des trois espèces de *Citrus* choisies et leur discussion. Enfin, l'étude se termine par un résumé des conclusions tirées de ce travail et des perspectives envisagées pour les recherches futures.

Partie 1 :
Étude
bibliographique

Chapitre I
Généralités sur les
agrumes

I.1 Historique

Le terme agrume vient du latin ‘acrumen’, qui anciennement désignait un arbre qui porte des fruits aigres (**Escartin, 2011 ; Millet, 2014**).

Selon Webber et al. (1967), l’histoire des agrumes a commencé il y’a 4000 ans avant J-C, lorsque le cédratier était cultivé en Mésopotamie. L’origine des agrumes vient des régions tropicales et subtropicales d’Asie, et se sont largement distribués dans le monde depuis des siècles (**Aubert et al., 1997**).

Les agrumes étaient cultivés en Chine vers 500 ans avant J-C. Le premier agrume arrivé en Europe par Théophraste en 310 avant J.-C, fut le cédrat. Les oranges et les citrons étaient importés par les romains de leurs provinces comme fruits couteux pour les banquets (**Bousbia, 2011**).

La propagation des agrumes dans d’autres régions du monde a été lente, en particulier en Afrique du Nord et en Europe du Sud. Les explorateurs espagnols et portugais ont été les premiers à introduire les agrumes en Amérique et au XVIe siècle, ont introduit plusieurs types d’oranges douces de qualité supérieure en Europe (**Moore, 2001 ; Liu et al., 2012**).

Au début du XVIIIe siècle, les arabes ont introduit des agrumes tels que les citrons et les oranges amères dans la méditerranée grâce aux échanges commerciaux à travers la route de la soie (**Loussert, 1985 ; Arias et Ramón-Laca, 2005**). Tandis que l’orange amère (le bigaradier), pousse au sud de l’Europe, la côte méditerranéenne et dans d’autres endroits subtropicaux particulièrement le sud de la France, l’Italie, l’Espagne, la Tunisie, l’Algérie, la Côte d’Ivoire, Haïti, les États-Unis et le Brésil (**Ghédira et Goetz, 2015**).

Les grands explorateurs ont non seulement développé notre vision sur l’univers, mais ont de même eu un rôle important dans la propagation des agrumes. En 1493, Christophe Colomb apporta le citron et la lime dans l’île d’Hispaniola (Haïti) lors de son deuxième voyage. Les oranges douces ont été introduites au Portugal en 1494 par Vasco De Gama, le navigateur ayant découvert la route indienne (**Bousbia, 2011**). Alors que le mandarinier est le dernier fruit arrivé en Europe au début du XIXe siècle, qui est devenu l’une des espèces d’agrumes les plus populaires et une source de développement continu (**Bousbia, 2011**).

I.2 Production mondiale

Les agrumes sont l'une des catégories de fruits et légumes les plus intéressantes, tant en terme de volume que de commerce (Caggia *et al.*, 2020). Ils sont cultivés dans plus de 140 pays, principalement sous des climats tropicaux, subtropicaux et méditerranéens. La superficie cultivée en agrumes est passée de 8,8 à 13,9 millions d'hectares entre 2000 et 2018, respectivement, ce qui a mené à une augmentation de la production d'agrumes de 115,4 à 194,4 millions de tonnes (MT) (figure 1). Le commerce mondial des agrumes était estimé à 14,2 milliards de dollars US en 2019 (Niu *et al.*, 2021).

La production mondiale d'agrumes a augmenté régulièrement durant les trois dernières décennies et dépasse aujourd'hui 194 MT, soit une augmentation d'environ 125%. Un pourcentage de 73% de la production mondiale sont consommés frais, 26% sont transformés et 9% sont exportés. Cette fabrication est divisée en diverses variétés d'agrumes, dont 53,07% sont des oranges, 26,04% sont des mandarines, 14,28% sont des citrons et des limes et 6,61% sont des pamplemousses (FAO, 2020).

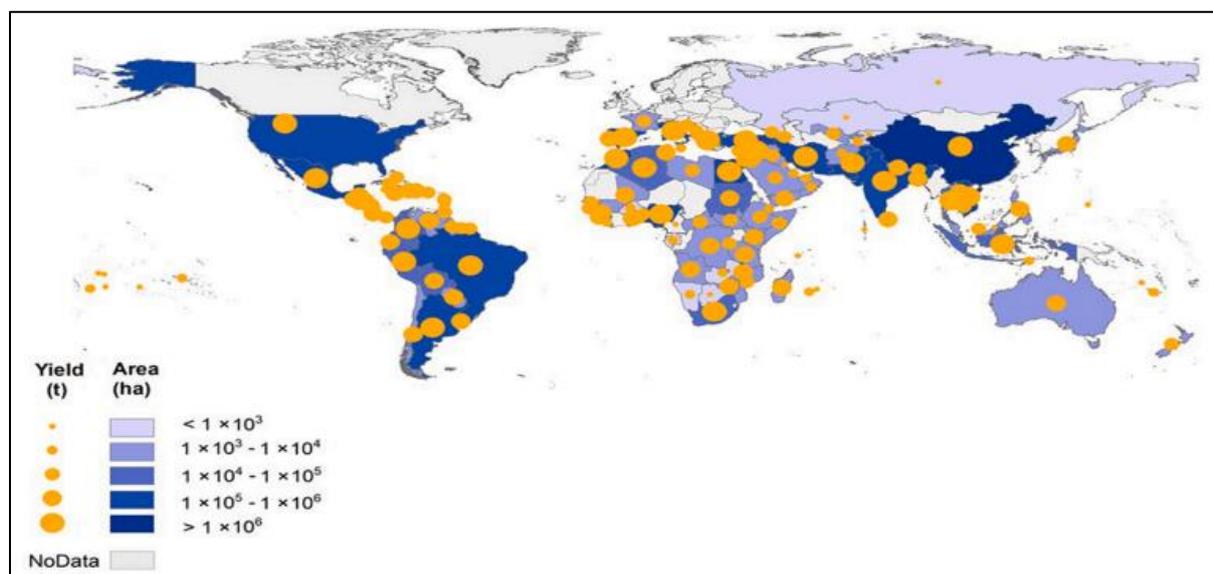


Figure 1 : Répartition de la superficie et du rendement de la production mondiale d'agrumes en 2018 (Niu *et al.*, 2021).

Le premier producteur mondial d'agrumes est la Chine avec 26,25% soit 37,739 MT, ensuite du Brésil (13,67%), l'Inde avec un taux de 13,314 MT, le Mexique avec 5,85 MT. Au niveau des pays européennes, l'Espagne est au premier rang avec 06,009 MT suivi de la

Turquie (2,99%). Tandis que l’Egypte est le premier producteur africain avec 3,22% de la production mondiale (tableau I) (FAO, 2020).

Tableau I : Principaux producteurs d’agrumes (FAO, 2020).

Pays	Production en millions tonnes	Parts en %
Asie	71,888	50,01
Amérique de sud	27,736	19,29
Afrique	15,579	10,84
Amérique du nord	15,043	10,46
Europe	10,538	7,33
Amérique central	09,676	6,73
Chine	37,739	26,25
Brésil	19,650	13,67
L'Inde	13,314	9,26
Mexique	08,414	5,85
Espagne	06,009	4,17
Egypte	04,633	3,22
Turquie	04,299	2,99
Argentine	03,469	2,41
Iran	03,454	2,40
Italie	02,865	1,99
Afrique du sud	02,772	1,93

I.3 L'agrumiculture en Algérie

Le programme algérien de développement des agrumes occupe une place importante dans la nouvelle politique agricole du pays, en prenant en considération les défis du changement climatique dans les différentes régions agricoles de l'Algérie (**Kerboua, 2001**).

L'Algérie dispose d'une collection variétale de 178 agrumes, ces derniers représentent 27% de la production totale d'arbres fruitiers (figure 2), constituant un patrimoine génétique précieux (**Kerboua, 2001**).

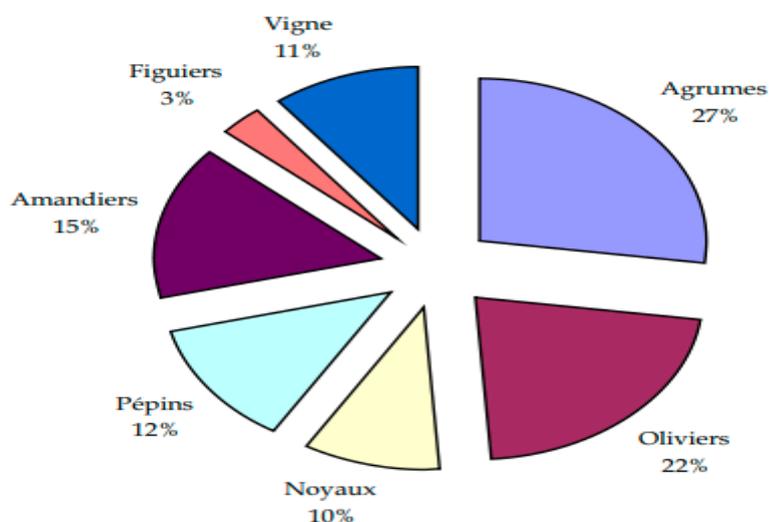


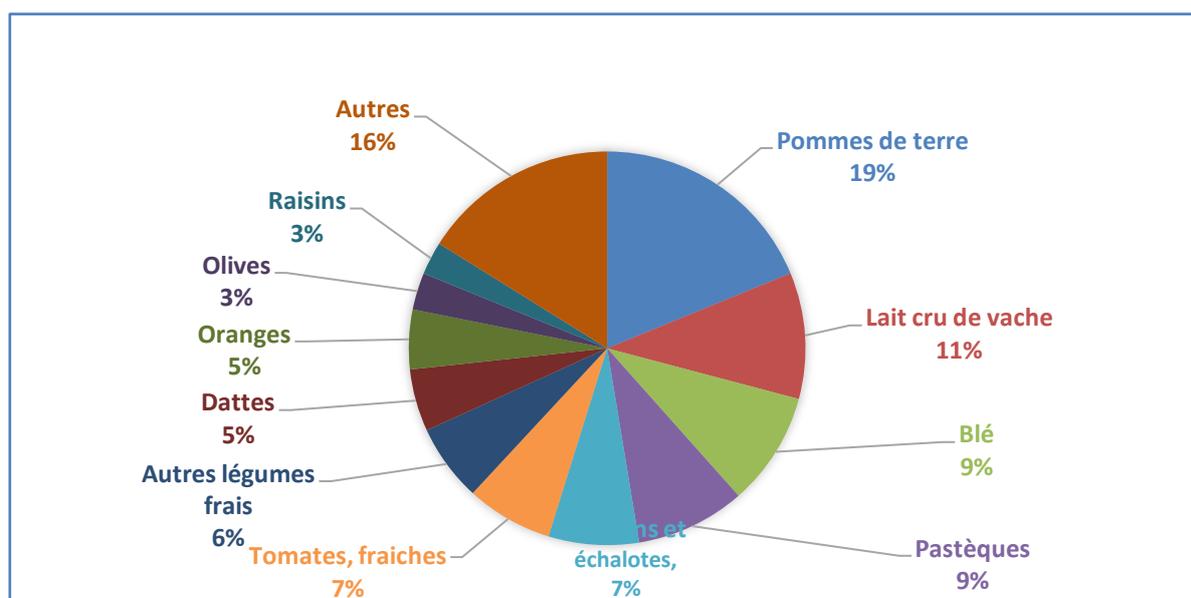
Figure 2 : Pourcentage de l'agrumiculture par rapport aux autres cultures en Algérie (**Kerboua, 2001**).

Les vergers agrumicoles en Algérie comprennent une variété d'agrumes, avec une importance particulière accordée aux oranges et aux clémentines. Parmi les agrumes, les oranges se distinguent par leur vaste gamme de variétés, notamment des variétés précoces telles que Washington Navel et Thomson Navel, qui occupent une part importante de la surface cultivée (environ 50 %) selon le Tableau II.

Tableau II : Composition variétale des agrumes en Algérie (Kerboua, 2001).

Groupe	Surface (ha)	Parts (%)
Oranges	28000	62,3
Clémentines et Mandarines	13700	30,4
Citrons	2800	6,2
Pamélos	150	0,4
Autres	350	0,7
Total	45000	100

Selon L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), le total de production d'agrumes en Algérie pour la saison 2021 est estimée à 1137191 tonnes, ce qui lui permet de se classer à la 9e position des principaux produits de base en Algérie en 2021, qui est dominé par les pommes de terres (4360880 tonnes), suivie par lait de vache (2409291 tonnes) et le blé en troisième position avec un taux de 2168386 tonnes (figure 3) (FAOSTAT, 2021).

**Figure 3** : Les principaux produits de base produits en Algérie en 2021 (FAOSTAT, 2021).

I.4 Les secteurs de production

La culture commerciale des agrumes est située dans la partie nord irriguée du pays, où les températures douces assurent de bons rendements (**Rebour, 1948**).

La superficie totale des *Citrus* est de 45 000 hectares (Tableau III), répartis en trois régions (figure 4) (**Kerboua, 2001**):

- La région centrale (28.243 hectares).
- La région orientale (4.811 hectares).
- La région occidentale avec 11 658 hectares.

En raison des besoins en eau et de la qualité des sols, les agrumes se trouvent principalement dans les bassins irrigués (figure 4) :

- ✓ La plaine de la Mitidja située dans la région centrale du pays, est une zone potentielle pour l'agrumiculture, représentant environ 44% de la superficie agrumicole totale.
- ✓ Le périmètre de la Mina et le Bas Chelif (14%).
- ✓ Le périmètre de Bouna Moussa et la plaine de Saf-Saf à Skikda (16%).
- ✓ La plaine de Habra à Mascara (25%) (**Kerboua, 2001**).

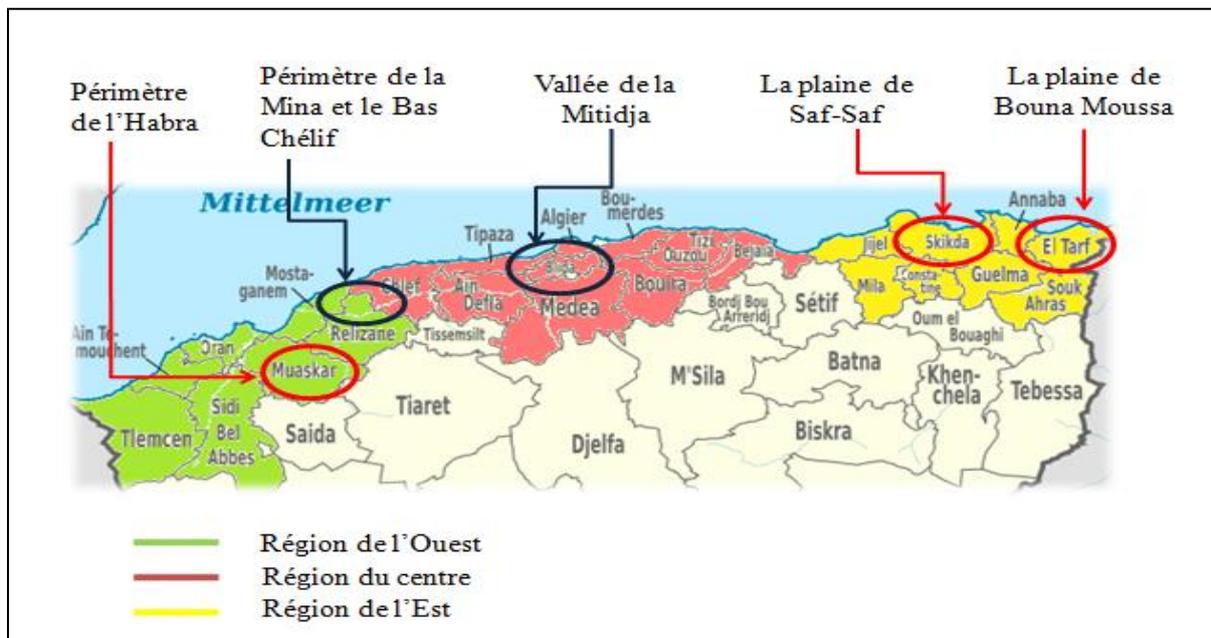


Figure 4 : La répartition des zones agrumicoles en Algérie (**Kerboua, 2001**).

A Bouira, les vergers d'agrumes occupent une place importante avec une production de 56 568,75 quintaux. La superficie totale consacrée à la culture des agrumes est de 526,15 hectares ou plus. Le groupe des oranges avait la plus large gamme de variétés (*Thomson navel*, *Washington navel*, *Hamlin*, *Jaffa*, *Double fine*) avec une production de 48896 quintaux (Tableau III) (DSA, 2021).

Les vergers de Lakhdaria sont les plus importants au niveau provincial, avec une production de 33 562 quintaux, suivis de ceux de la commune de Kadiria (15 285 quintaux). Guerrouma arrive au troisième rang (3500 quintaux), suivi de la région de Boderbala (1546 quintaux) (DSA, 2021).

Tableau III: Composition variétale et taux de production des agrumes à Bouira (DSA ,2021).

Groupes	Superficie (Ha)	Production (Qx)
Orangers	401,32	48896
Mandariniers	32,75	2315
Clémentiniers	44,6	2830
Citronniers	47,48	2527.75
Total	526,15	56 568,75

**Source* : Direction des services agricoles de la wilaya de Bouira (2020/2021).

Selon la direction des services agricoles de la wilaya de Bouira (2022), la superficie totale des agrumes atteinte 531,83 hectares en 2022. Tandis que la production totale a connu une augmentation pour l'année 2022, avec un taux de 58 490 quintaux (Tableau IV) (DSA, 2022), par rapport l'année 2021 (56 568,75 quintaux).

Tableau IV: Superficie et taux de production des agrumes à Bouira (DSA, 2022).

Groupes	Superficie (Ha)	Production (Qx)
Oranges	400,4	50 799
Mandarines	32,75	2329
Clémentines	44,6	2726
Citrons	54,08	2636
Total	531,83	58 490

**Source* : Direction des services agricoles de la wilaya de Bouira (2021/2022).

I.5 Exigences climatiques des agrumes

I.5.1 La température

Les agrumes sont fragiles à toutes les températures moindres à 0°C. En revanche, ils peuvent supporter des températures supérieures à 30°C à condition d'être correctement arrosés (Loussert, 1985). La température optimale pour la croissance des agrumes ne dépasse pas 25°C à 30°C. Alors que l'idéal, est entre 10°C à 12°C en hiver et de 22°C à 24°C en été (Loussert, 1989).

I.5.2 La pluviométrie

Le *Citrus* est un arbre fruitier très exigeant. Il nécessite entre 1000 à 1200 mm d'eau par an, dont 600 mm pendant l'été, qui ne peuvent être satisfaits que par l'irrigation notamment en région méditerranéenne (Mutin, 1977).

I.5.3 L'humidité

Elle n'a pas un effet important sur le comportement des agrumes, en revanche elle a une influence sur le développement de certains parasites et moisissures, et aussi sur la reproduction de certains ravageurs tels que les cochenilles en grandes colonies (Loussert, 1989). D'autre part, une faible humidité fait que le végétal respire fortement, ainsi ses besoins en eau augmentent.

I.5.4 Le vent

Le vent est un facteur néfaste pour la culture des agrumes, il peut endommager indirectement le fruit (frottement, ou par transport des grains de sable) ainsi que certaines détériorations qui rendent les fruits non exportables et aussi le dessèchement principalement en période de floraison concernant les vents chauds et secs (Sirocco) (Loussert, 1989).

I.6 Classification et systématique

Les agrumes appartiennent à la famille des *Rutaceae*, sous-famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae* et sous-tribu des *Citrinae* (figure 5) (Praloran, 1971). Ce sont des arbustes aux feuilles denses et généralement piquantes, qui renferment des composés antioxydants et antibactériens présents à la fois dans les feuilles et l'écorce des fruits.

Il existe plusieurs genres d'agrumes, parmi lesquels les trois genres les plus cultivés à travers le monde sont le genre *Poncirus*, le genre *Fortunella* et le genre *Citrus* (figure 5). Le genre *Poncirus* ne comprend qu'une seule espèce, *Poncirus trifoliata*, dont le fruit n'est pas comestible, mais qui est principalement utilisée comme porte-greffe dans la culture des agrumes (M'hiri et al., 2015).

Le genre *Fortunella* comprend quant à lui six espèces, mais seules deux d'entre elles, *Fortunella japonica* et *Fortunella margarita*, sont cultivées à travers le monde. Cependant, le genre le plus important est le genre *Citrus*, qui englobe les principaux cultivars d'agrumes tels que les oranges (*Citrus sinensis*), les mandarines (*Citrus reticulata*), les clémentines (*Citrus clementina*), les citronniers (*Citrus limon*) et les pomelos (*Citrus paradisi*) (figure 5) (M'hiri et al., 2015).

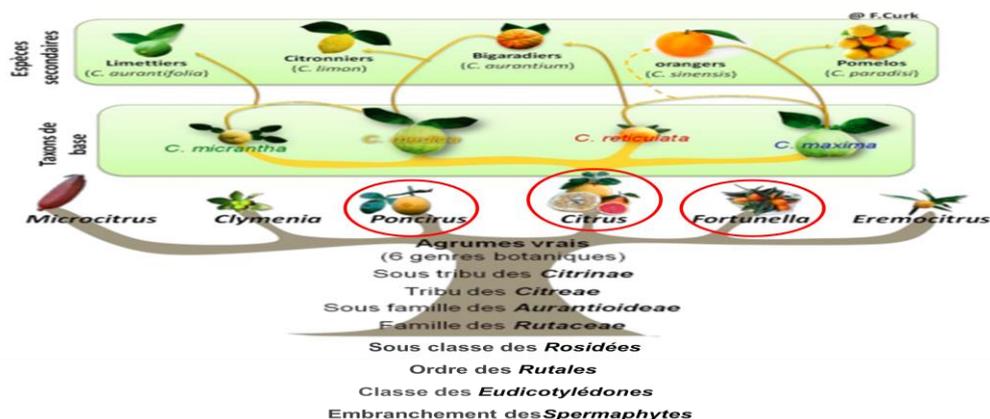


Figure 5 : Systématique des agrumes et origine des *Citrus* cultivés (Khefifi, 2015).

I.7 Le genre *Citrus*

Ce genre comprend des arbustes de moins de 4 m à 12 m de hauteur avec des feuilles qui sont usuellement simples et persistantes, le fruit très spécifique qui est une baie particulière appelée Hespéridine, juteux, plus ou moins acide, doux ou amer (**Lara Testai et al., 2017**).

Les feuilles et les fleurs possèdent des glandes qui produisent une huile essentielle à l'odeur sucrée caractéristique, même dans des conditions climatiques favorables, chacun de leurs stades d'accroissement a une croissance rythmique suivie d'un arrêt prononcé (**Lara Testai et al., 2017**).

Ses fruits contiennent de la vitamine C mais aussi des polyphénols, dont on retrouve le sous-groupe des flavonoïdes appelé flavanones, parmi lesquels on trouve la naringine, l'hespéridine et l'ériocitrine. Les flavanones ont un effet protecteur sur le système cardiovasculaire et ont pour effet de dilater les vaisseaux sanguins. Ils ont également des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (**Lara Testai et al., 2017**).

I.8 Description de quelques espèces de *Citrus*

A. *Citrus clementina*

Le clémentinier (*Citrus clementina*) est un arbre hybride issu du croisement entre le *Citrus reticulata* et le *Citrus sinensis*. Il appartient à la famille des *Rutacées*. Cet arbre mesure environ 4 mètres de hauteur et ses feuilles et fleurs dégagent un arôme très parfumé. Le fruit du clémentinier, la clémentine (figure 6), se distingue de la mandarine par sa faible teneur en graines. Il est délicieux, avec une peau fine et verte qui vire à l'orange lorsque les températures hivernales sont plus basses (**Anonyme, 2010**).

B. *Citrus sinensis*

L'oranger (*Citrus sinensis*) est un arbre fruitier appartenant à la famille des *Rutacées*. Il est considéré comme un hybride ancien, résultant potentiellement d'un croisement entre le pamplemousse (*Citrus maxima*) et la mandarine (*Citrus reticulata*). Cet arbre présente un feuillage persistant et atteint une hauteur d'environ 10 mètres. Son port est harmonieux et sa croissance est rapide, bien qu'il soit moins vigoureux que d'autres agrumes. Il peut vivre entre 50 et 60 ans. Son apparence est généralement arrondie, parfois en colonne, avec des branches

portant des feuilles vertes, foncées, ovales, coriaces et finement dentelées (Figure 6) (**Bousbia, 2011 ; Escartin, 2011**).

Les fleurs de l'oranger sont très parfumées, avec cinq pétales blancs recourbés vers l'arrière (**Escartin, 2011**). Le fruit est généralement une baie ronde (figure 6), dont la couleur et la taille varient selon la variété (figure 6). La pulpe se divise en quartiers juteux, contenant des vésicules juteuses et des graines blanches et dures (**Escartin, 2011**).

L'oranger est l'un des fruits les plus répandus et célèbres au monde. Il existe plusieurs variétés, dont la *Jaffa*, la *tardive* et la *Thomson navel*. Il peut être consommé frais, sous forme de jus ou transformé en confiture. Il est riche en vitamines (surtout en vitamine C) et en minéraux, et son jus possède des propriétés diurétiques et purgatives (**Escartin, 2011**).

Citrus sinensis est également utilisé en parfumerie. L'essence de néroli est produite à partir des fleurs de l'oranger, tandis que l'essence de petit-grain est extraite des feuilles et des jeunes pousses (**Escartin, 2011**).

C. *Citrus aurantium*

L'orange amère est un bel arbuste épineux, doté de feuilles vertes brillantes qui dégagent une légère odeur et ont un goût amer. Les feuilles sont elliptiques, avec une extrémité subaiguë, des pétioles articulés et parfois légèrement ailés. Elles mesurent environ 8 cm de long sur 4 cm de large. Les fleurs, quant à elles, sont blanches, très odorantes et peuvent atteindre 25 mm de diamètre. Le fruit, connu sous le nom de Bigarade, est une baie qui présente une écorce verte-jaune ou rouge-orangé à maturité, avec des ponctuations caractéristiques (figure 6) (**Escartin, 2011**). En raison de son goût acide et très amer, l'orange amère n'est pas adaptée à la consommation directe. Cependant, ses fleurs sont utilisées pour produire l'essence de "néroli", tandis que les jeunes pousses et les feuilles donnent l'essence de "petit-grain" (**Escartin, 2011**).

Sur le plan de la phytothérapie, le fruit de l'orange amère est utilisé pour faciliter la digestion et réduire les ballonnements. En infusion, il est réputé soulager les maux de tête et faire baisser la fièvre. Son jus stimule les défenses du système immunitaire, tandis que son huile essentielle est prescrite pour réguler le rythme cardiaque, apaiser les palpitations et favoriser le sommeil. De plus, les huiles essentielles de "néroli" et de "petit-grain" sont

largement utilisées en massages relaxants et jouent un rôle majeur en parfumerie (**Escartin, 2011**).

D. Citrus aurantiifolia

Le citron vert, également connu sous le nom de limettier ou lime acide, est un petit arbre pouvant atteindre 6 mètres de hauteur. Originaire d'Asie du Sud-Est, il est aujourd'hui répandu en Amérique tropicale, notamment aux Antilles et au Mexique. C'est un arbre épineux, très ramifié, avec de fines branches (**Escartin, 2011**). Le lime acide possède des feuilles alternes persistantes, coriaces, ovales et d'un vert foncé. Les bords des feuilles sont délicatement festonnés. Leur mouvement produit un bruissement parfumé. La floraison de l'arbre est abondante et se produit généralement entre mars et avril, bien qu'elle puisse apparaître tout au long de l'année. Les fleurs, solitaires ou en grappes, sont petites, blanches et étoilées (figure 6) (**Escartin, 2011**).

Après la floraison, le citron vert donne de petits citrons, plus ou moins ronds, dotés d'une écorce verte, fine et lisse. Ces citrons sont largement appréciés pour leur jus et leur arôme caractéristiques en cuisine (figure 6). Le citron vert est un fruit hypocalorique et riche en antioxydants, en vitamine C, en calcium, en magnésium, en fer et en fibres (**Escartin, 2011**).

E. Citrus limon

Le citronnier, membre de la famille des *Rutacées*, est un arbuste robuste, vert et aromatique, dont la hauteur varie entre de 2 à 10 mètres avec 5-6 branches piquantes, ramifiées et des racines peu profondes formant un réseau dans les 80 premiers cm du sol (**Gollouin et Tonelli, 2013**). Les feuilles de citronnier sont grandes, vertes, alternes, coriaces et très odorantes. Alors que les fleurs sont blanches, peu parfumées, rassemblées à l'aisselle des feuilles. Le fruit est une baie jaune vif, ovale avec un mamelon au sommet. La peau est épaisse constituée de multiples poches à essences visibles à l'œil nu (**Escartin, 2011**).

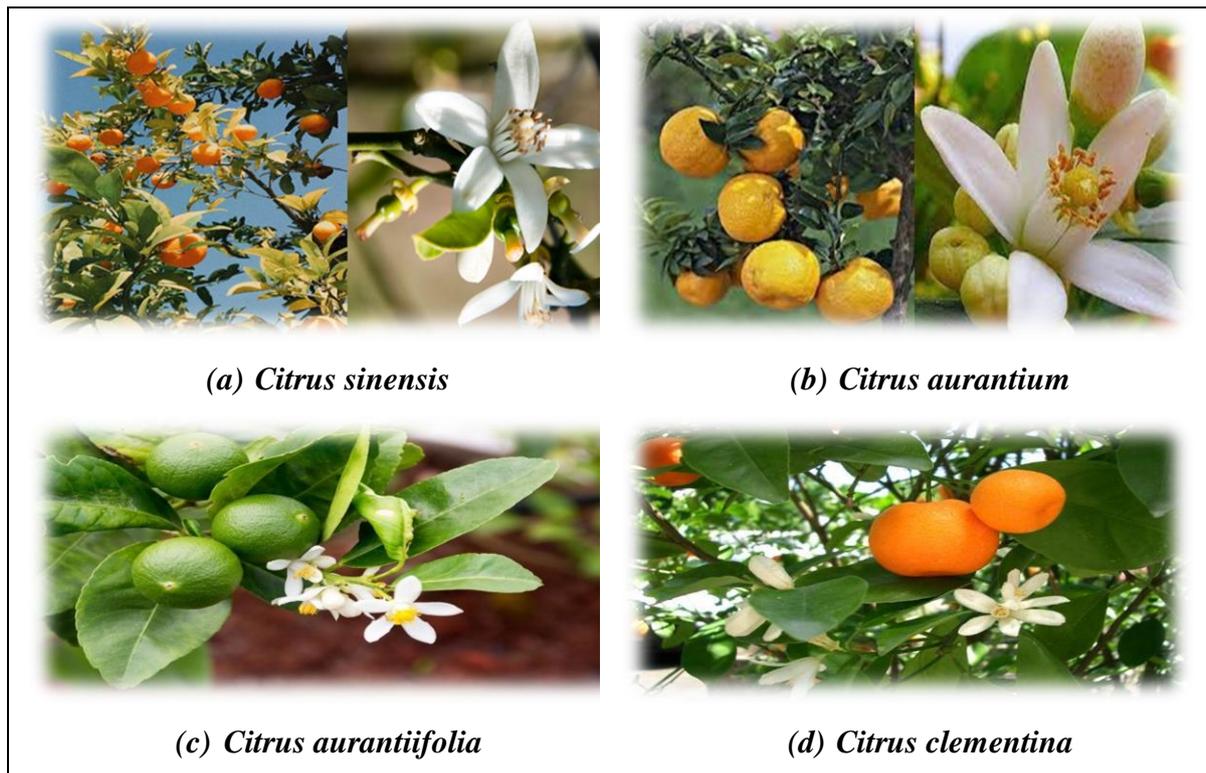


Figure 6 : Images des feuilles, fleurs et fruits de certaines variétés du genre *Citrus* (Anonyme, 2011).

I.9 Utilisation et effets thérapeutiques du *Citrus*

Effectivement, les variétés du genre *Citrus*, telles que les oranges, les citrons et les pamplemousses, contiennent divers composés bioactifs, tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, qui présentent des propriétés thérapeutiques potentielles. Ces composés sont utilisés dans divers domaines tels que la médecine, la cosmétique et l'alimentation (Shohaib *et al.*, 2011).

a) Diminuer le risque de maladies cardio-vasculaires

Les substances antioxydantes du *Citrus*, abaissent les taux sanguins de cholestérol et de triglycérides et préviennent le processus qui conduit à l'athérosclérose (dépôt de plaques dans les artères) et favorisent la vasodilatation artérielle (Whitman *et al.*, 2005).

b) Améliorer la santé osseuse

Plusieurs études ont montré que la bêta-cryptoxanthine, un pigment présent dans les agrumes, en particulier les mandarines et les clémentines, peut améliorer la minéralisation osseuse et réduire le risque d'ostéoporose (Uchiyama *et al.*, 2004).

c) Prévenir certains cancers

Les agrumes contiennent d'autres antioxydants, dont la limonine, qui peuvent réduire la prolifération des cellules cancéreuses (**Stahl *et al.*, 2005**). Des études montrent la consommation d'agrumes peut protéger contre certains types de cancers, tels que les cancers de l'œsophage, de l'estomac, du côlon, de la bouche et du pharynx (**Chainani, 2002**).

d) Freiner la glycémie

En général, les agrumes sont riches en fibres solubles, particulièrement en pectine qui se trouve au niveau de l'albédo qui entoure la pulpe. Ces fibres forment un gel lorsqu'elles sont mélangées à l'eau, ce qui ralentit l'absorption des glucides et réduit la sécrétion d'insuline. Ils favorisent un contrôle relatif de la glycémie, notamment chez les diabétiques, et prolongent la satiété (**Bessesen, 2011**).

e) Traiter les symptômes de la grippe et les troubles du sommeil

Les feuilles de l'orange aigre sont utilisées pour abaisser la température d'une fièvre causée par un rhume, pour traiter les symptômes de la grippe (**Paul *et al.*, 1995**). Les extraits de feuilles d'agrumes ont également un rôle dans le traitement des troubles du sommeil et soigner la nervosité sans effets secondaires (**Hadrich *et al.*, 2008**).

Chapitre II

Stress

oxydant

II.1 Définition

L'oxygène est indispensable à notre survie, à notre vie et à notre développement, mais il est aussi source de toxicité, d'altération et de dégradation. En effet, lorsque le métabolisme de l'oxygène est perturbé, comme dans les maladies respiratoires, cela conduit à ce que l'on nomme le "stress oxydatif", une anomalie métabolique aux conséquences graves (**Christelle, 2006**).

Le stress oxydatif est défini comme étant la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant un déséquilibre de la balance antioxydant/pro-oxydant (balance redox) et, par conséquent, une réduction de la capacité antioxydante de l'organisme (**Camille et Mireille, 2011**).

Ce déséquilibre peut être induit par l'activation du système de production de ROS de manière régulée. Les réponses antioxydantes compensent efficacement cette production, de sorte que le déséquilibre est temporaire (**Camille et Mireille, 2011**).

II.2 Les radicaux libres

Les radicaux libres (RLs) sont des espèces chimiques qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés (électron célibataire) sur leur couche périphérique, ce qui les rend très instables et leur donne une grande réactivité vis-à-vis des substrats biologiques (**Camille et Mireille, 2011**).

Ils sont formés chimiquement ou biologiquement, ont généralement une courte durée de vie et peuvent être formés par perte ou gain d'électrons à partir de composés non radicalaires. Leur réactivité consiste à trouver des électrons pour réarranger leurs électrons simples, conduisant à la formation d'un nouveau radical (**Tessier et Marconnet, 1995**).

II.3 Sources de formation des radicaux libres

En effet, au cours des processus métaboliques normaux, l'oxygène est utilisé par les organismes vivants pour produire de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) par le biais de la respiration cellulaire (**Camille et Mireille, 2011**). Cependant, pendant ces réactions métaboliques, des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être produits en tant qu'intermédiaires réactifs (figure 7).

Environ 2% de l'oxygène consommé au niveau de la mitochondrie est converti en radicaux libres primaires tels que le superoxyde $O_2^{\cdot-}$ obtenu lors de la première réduction électronique de l'oxygène, et le radical hydroxyle OH^{\cdot} formé via les réactions de " Fenton ". D'autres espèces dérivées de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (O_2), l'hydroperoxyde (RO_2H) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ne sont pas des radicaux libres, mais ils sont toxiques et peuvent servir de précurseurs capables de générer de nouvelles espèces radicalaires (Camille et Mireille, 2011).

Cependant, il existe d'autres ROS dits secondaires tels que les radicaux peroxydes RO_2^{\cdot} , les hydroperoxydes RO_2H et les radicaux alkoxydes RO^{\cdot} (figure 7) qui sont formés par la réaction des radicaux libres primaires avec des composés biochimiques intracellulaires (Camille et Mireille, 2011).

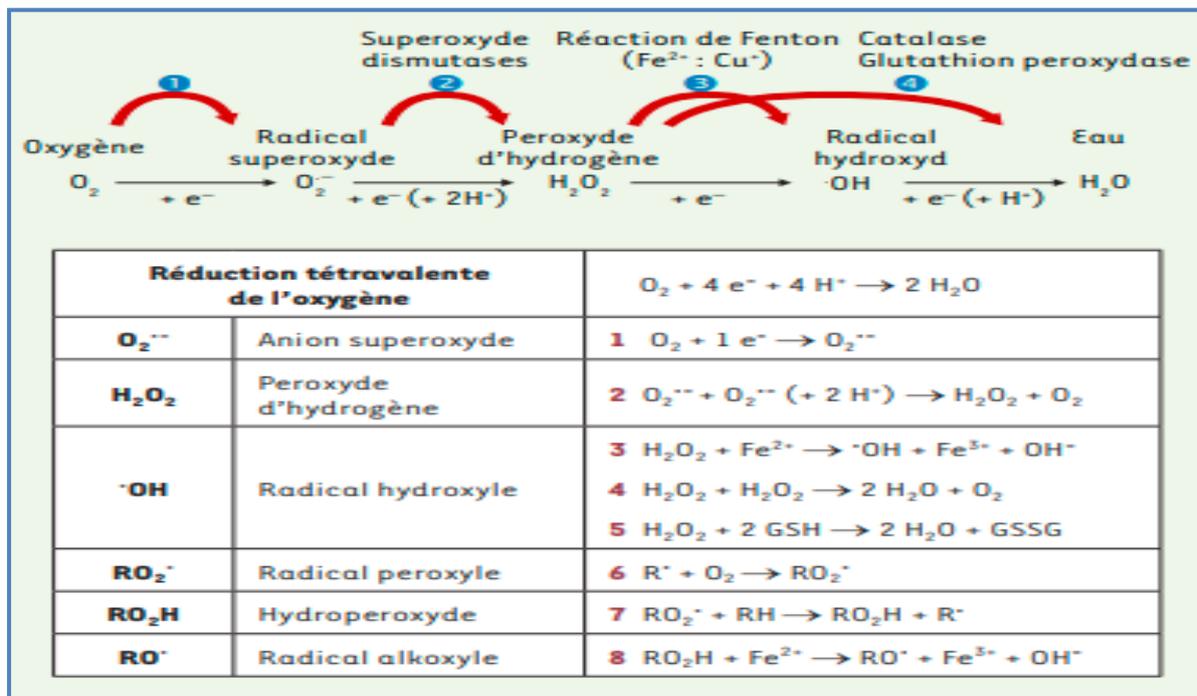


Figure 7: Réduction de l'oxygène et la formation des radicaux libres (Camille et Mireille, 2011).

Des facteurs environnementaux tels que la pollution, le tabagisme, l'exposition excessive au soleil ou aux radiations sans protection adéquate, ainsi que d'autres mécanismes physiopathologiques (inflammation et exercice physique intense) peuvent également entraîner une surproduction de radicaux libres (figure 8) (Youn *et al.*, 2014).

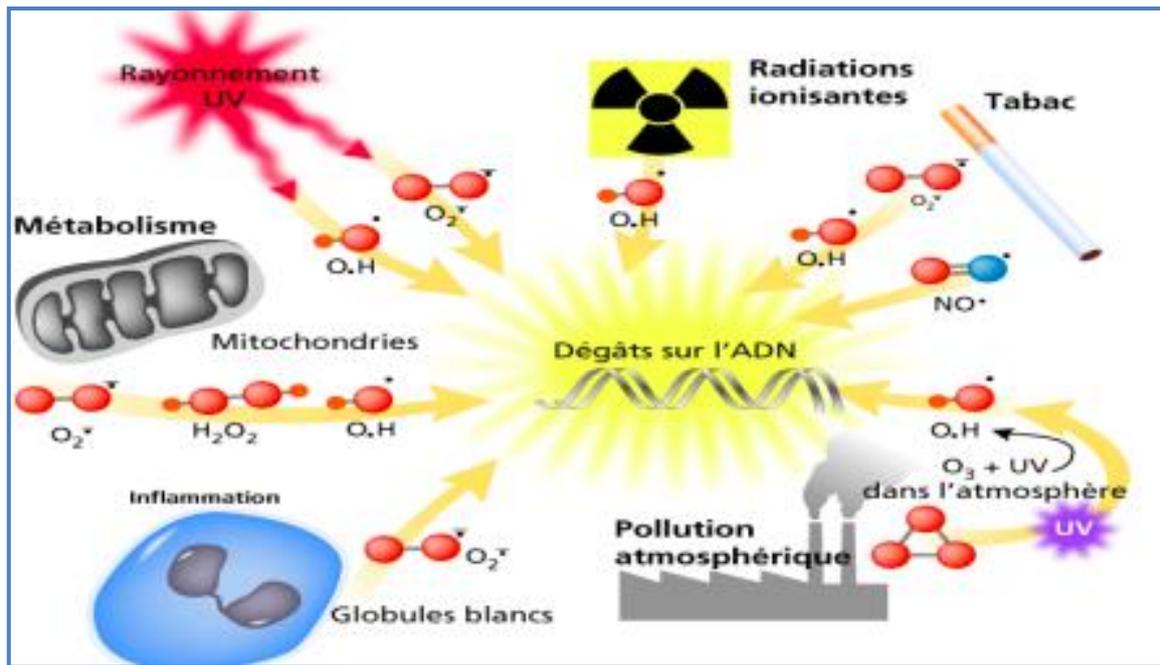


Figure 8: Facteurs intervenant dans la surproduction des radicaux libres (Bayr, 2005).

II.4 Principales cibles biologiques des ROS

Les radicaux libres sont instables et cherchent à se lier aux électrons d'une autre molécule. Ils sont responsables d'une réaction en chaîne qui conduit à la destruction des cellules. Leurs principales cibles sont l'ADN, les protéines et les membranes cellulaires (Pastre, 2005).

a. Les protéines

Les RLs peuvent réagir avec plusieurs acides aminés, modifiant leurs structures et provoquant l'oxydation des chaînes latérales et des chaînes polypeptidiques, ce qui entraîne une perte de fonction des protéines. Cependant, les acides aminés les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine (Haleng *et al.*, 2007).

La plupart des dommages sont irréparables et peuvent conduire à des changements fonctionnels importants (modification de multiples enzymes, récepteurs et transporteurs cellulaires). Quelques protéines oxydées se dégradent rarement et forment des agrégats qui se rassemblent dans les cellules et les compartiments extracellulaires (Haleng *et al.*, 2007).

b. Les lipides

En effet, les composés réactifs de l'oxygène (ROS) ont une affinité particulière pour les lipides, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI) présents dans les membranes cellulaires. Les AGPI contiennent des liaisons doubles entre les atomes de carbone, ce qui les rend plus vulnérables à l'oxydation par les ROS (**Pamplona *et al.*, 2000 ; Hulbertl, 2005**).

Lorsque les ROS attaquent les lipides, ils peuvent provoquer la peroxydation des lipides, c'est-à-dire la formation de peroxydes lipidiques. Ces peroxydes lipidiques sont des molécules très réactives qui peuvent réagir avec d'autres composés dans la cellule, entraînant des altérations de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes cellulaires (**Hong *et al.*, 2004**).

c. L'ADN

L'ADN est la cible privilégiée des ROS, qui créent de multiples mutations dans l'ADN, notamment des bases oxydées et des cassures dans les deux brins d'ADN (**Cadet *et al.*, 2002 ; Favier, 2003**). En conséquence, l'information génétique est altérée, ce qui déclenche l'apparition de certaines maladies telles que le cancer et le vieillissement (**Haleng *et al.*, 2007**).

II.5 Les pathologies liées au stress oxydant

Bien que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques, elles contribuent également à la progression de diverses maladies caractérisées par un stress oxydatif. Parmi ces maladies figurent le diabète sucré, les maladies cardiaques, les troubles neurodégénératifs tels que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer, les affections articulaires, la formation de tumeurs cancéreuses, le processus de vieillissement, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn, les maladies rhumatismales comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies respiratoires comme l'asthme, ainsi que les maladies cardiovasculaires, y compris l'athérosclérose (**Camille et Mireille, 2011**).

Afin de prévenir le développement de ces maladies, il est essentiel de renforcer notre système de défense antioxydante. Une alimentation équilibrée et en particulier riche en fruits et légumes peut nous fournir les antioxydants nécessaires (**Haleng *et al.*, 2007**).

II.6 Le système antioxydant

Effectivement, le corps humain dispose d'un système de défense antioxydant complexe pour contrer les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et protéger les cellules contre le stress oxydatif. Ce système comprend à la fois des sources exogènes et des sources endogènes produites par l'organisme lui-même. La source d'origine exogène, provenant de l'alimentation, notamment des fruits et légumes riches en vitamines C et E, en caroténoïdes, en polyphénols et en flavonoïdes. Ces composés antioxydants sont apportés par les aliments que nous consommons (**Haleng et al., 2007**).

La deuxième source est endogène et comprend des enzymes telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase. Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans la neutralisation des ROS en les convertissant en produits moins réactifs. En plus des enzymes, le système de défense antioxydant endogène comprend également des protéines telles que la ferritine et l'albumine, ainsi que des mécanismes de réparation des dommages oxydatifs, tels que les endonucléases (**Haleng et al., 2007**).

Les oligo-éléments tels que le sélénium, le cuivre et le zinc sont également importants en tant que cofacteurs des enzymes antioxydantes. Ils facilitent leur fonctionnement optimal en participant aux réactions chimiques nécessaires à la neutralisation des ROS.

Ainsi, le corps humain déploie à la fois des mécanismes de défense antioxydante exogènes et endogènes pour contrer les effets nocifs des ROS et maintenir l'équilibre oxydant-antioxydant nécessaire à une bonne santé (**Haleng et al., 2007**).

I.6.1 Système antioxydant du *Citrus*

Les antioxydants sont des composés aux structures plus ou moins complexes qui ont la capacité d'atténuer, d'inhiber ou de prévenir l'oxydation des substances qui peuvent être oxydées. Ils agissent en piégeant les radicaux libres et en réduisant le stress oxydatif (**Kim et Lee, 2004**).

Les agrumes constituent une source remarquable d'antioxydants naturels, comprenant notamment les caroténoïdes, l'acide ascorbique, la vitamine E et les polyphénols. Parmi ces derniers, on retrouve les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques (**Rapisarda et al., 2008**).

i. La vitamine C et E

Il est vrai que de nombreux mammifères sont capables de synthétiser la vitamine C dans leur corps, mais chez l'homme, il est essentiel de s'assurer un apport quotidien d'environ 100 mg de vitamine C par le biais d'une alimentation adéquate, notamment en consommant des fruits riches en vitamine C tels que les agrumes.

L'acide ascorbique ($C_6H_8O_6$), connu sous le nom de vitamine C, est une molécule hydrosoluble présente dans le cytoplasme et le liquide extracellulaire. Son rôle principal est d'agir en tant qu'agent piègeur des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il possède également la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E liposoluble après sa réaction avec les radicaux lipidiques (figure 9) selon **Haleng et al. (2007)**.

La vitamine C peut exister sous forme de radical (VIT C $^\circ$) et peut être régénérée par le glutathion réduit (GSH), qui se transforme en un radical thyle (GS $^\circ$). Ce radical thyle réagit ensuite avec une autre molécule de thyle pour produire du glutathion oxydé (GSSG).

Les fonctions de la vitamine C sont multiples et essentielles pour le bon fonctionnement de l'organisme. Elle contribue au fonctionnement normal du système immunitaire, participe à la synthèse du collagène et des globules rouges, et intervient dans les mécanismes du métabolisme du fer (**Haleng et al., 2007**).

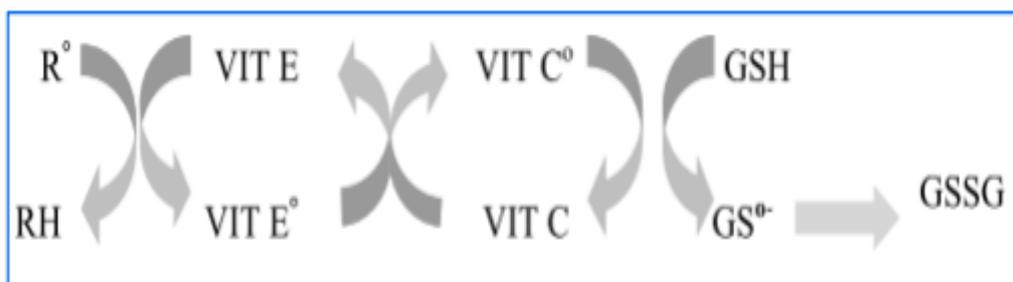


Figure 9 : Régénération de la vitamine E par l'action de l'acide ascorbique (**Bossokpi, 2002**).

ii. Les caroténoïdes

Antioxydants qui piègent les ROS, ce sont des pigments liposolubles qui donnent aux fruits et légumes leur couleur jaune, rouge et orange. Leur structure chimique est dérivée du lycopène ($C_{40}H_{56}$), une chaîne polyinsaturée qui peut également présenter des structures cycliques aux deux extrémités (**Dionne, 2002**).

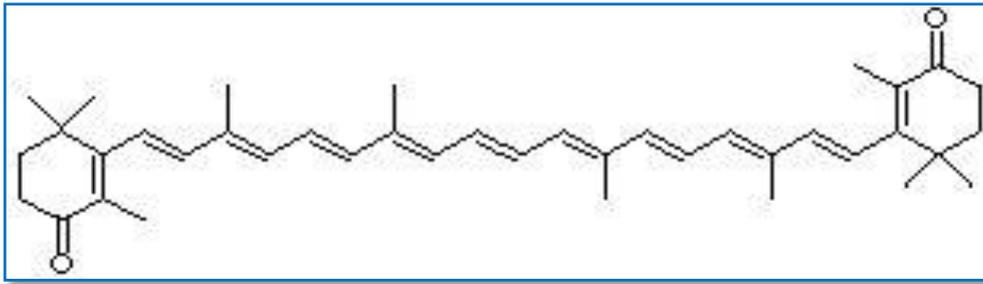


Figure 10 : Structure chimique d'un caroténoïde (**Pincemail *et al.*, 1998**).

iii. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une classe significative d'antioxydants que l'on trouve dans les plantes. Chaque jour, notre alimentation nous apporte environ 1 gramme de polyphénols, principalement par le biais de la consommation de fruits, suivie des légumes et des céréales (**Haleng *et al.*, 2007**).

Parmi les composés phénoliques, les polyphénols jouent un rôle important. Ils se présentent principalement sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, qui sont d'excellents neutralisateurs de radicaux libres. En plus de leurs autres caractéristiques, tels que les groupes fonctionnels alcooliques (OH) et carboxyliques (COOH), les polyphénols sont caractérisés par la présence d'un noyau aromatique lié à un groupe hydroxyle. La diversité structurale de ces composés varie en fonction du nombre et de la position des groupes hydroxyles. Les classes principales de composés phénoliques comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (**Muanda, 2010**).

1. Les acides phénoliques

Sont des composés organiques qui possèdent un groupe carboxyle et un groupe hydroxyle phénolique. Ils peuvent être classés en deux catégories principales : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques, selon une étude menée par **Rentzsch (2009)**.

Les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) comprennent des composés tels que l'acide gallique, l'acide catéchique, l'acide vanillique et l'acide syringique (figure 11). Ces composés ont en commun une structure qui consiste en un cycle benzénique substitué par un groupe carboxyle (acide benzoïque) et un groupe hydroxyle (phénol). Ils peuvent exister sous différentes formes isomériques.

D'autre part, les acides hydroxycinnamiques sont des composés aromatiques qui possèdent des chaînes latérales composées de trois atomes de carbone (C6-C3). Parmi ces composés, on trouve l'acide caféique et l'acide férulique, qui sont largement présents dans les agrumes (figure 11) selon **Balasundram *et al.* (2006)**.

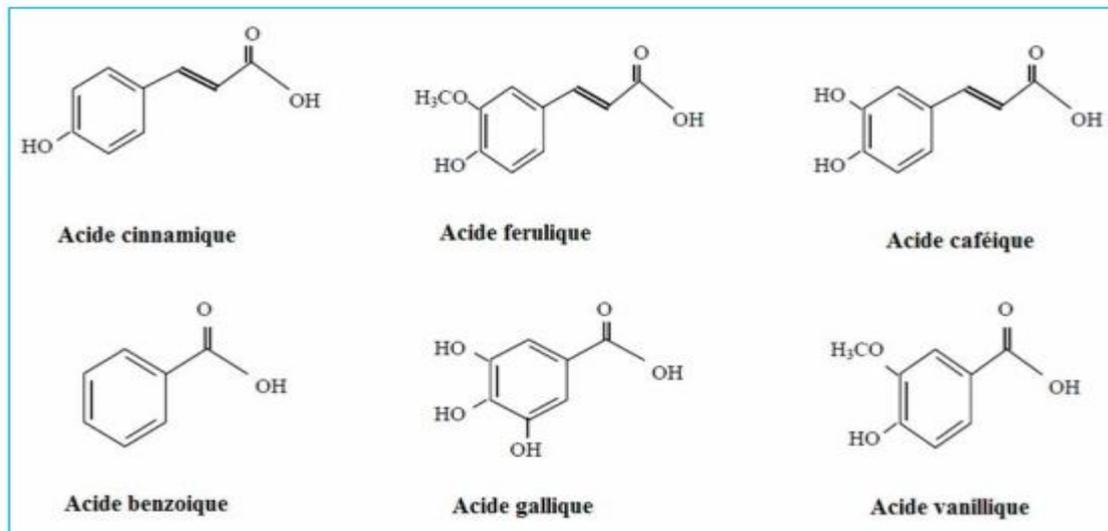


Figure 11 : Structure chimique de certains acides phénoliques (**Wang *et al.*, 2007**).

2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe essentielle de composés naturels, en particulier des métabolites secondaires végétaux dotés d'une structure polyphénolique, qui sont largement présents dans les fruits, notamment les agrumes, les légumes et certaines boissons. Ils possèdent une gamme variée d'effets bénéfiques, notamment des propriétés antimicrobiennes, biochimiques et antioxydantes, qui sont associées à des maladies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer et l'athérosclérose (**Burak et Imen, 1999**).

- **Classification**

Les flavonoïdes présentent une structure de base commune, composée de deux anneaux benzéniques (anneaux A et B) reliés par une chaîne linéaire de trois atomes de carbone qui forme un hétérocycle oxygéné appelé "anneau C" (figure 12) (**Panche *et al.*, 2016**).

En fonction du carbone de l'anneau C auquel l'anneau B est attaché, ainsi que du degré d'insaturation et d'oxydation de l'anneau C, les flavonoïdes peuvent être classés en différentes sous-classes (**Panche *et al.*, 2016**).

a) Flavones

Les flavones représentent une sous-classe importante de flavonoïdes, qui se trouvent largement dans les feuilles, les fleurs et les fruits. Elles se caractérisent par une double liaison entre les positions 2 et 3 de l'anneau C, ainsi qu'un groupe cétone en position 4. La plupart des flavones possèdent un groupe hydroxyle en positions 2 et 3, ainsi qu'un groupe cétone en position 4. De plus, un groupe hydroxyle est généralement présent en position 5 de l'anneau A. Cependant, l'hydroxylation peut varier dans d'autres positions, telles que la position 7 de l'anneau A ou les positions 3' et 4' de l'anneau B, en fonction de la taxonomie spécifique du légume ou du fruit considéré (figure 12) (**Panche *et al.*, 2016**).

b) Flavonols

Les flavonols se réfèrent à une classe de flavonoïdes qui possèdent un groupe cétone attaché à leur structure moléculaire (figure 12). L'incorporation de flavonols dans l'alimentation présente un large éventail d'avantages pour la santé, notamment en termes de potentiel antioxydant et de réduction du risque de maladies vasculaires. Comparativement aux flavones, les flavonols se caractérisent par la présence d'un groupe hydroxyle en position 3 sur le cycle C (figure 12) et ils se distinguent par une grande diversité de motifs d'hydroxylation (**Panche *et al.*, 2016**).

Parmi les différents sous-groupes de flavonoïdes, les flavonols sont les plus répandus et d'une importance capitale dans les fruits et légumes. Par exemple, la quercétine, présente dans de nombreux aliments d'origine végétale, est un exemple bien connu de flavonol (**Iwashina, 2013**).

c) Flavanones

Les agrumes tels que les oranges et les citrons contiennent une autre classe de flavonoïdes qui leur est commune. Parmi ceux-ci, on trouve l'hespéridine et la naringénine, qui sont des exemples de flavanones. Les flavanones sont réputées pour leurs propriétés antiradicalaires. Sur le plan structural, elles se distinguent des flavones par la présence d'un cycle C saturé et l'absence de double liaison entre les atomes de carbone C2 et C3 du cycle C. Cette différence structurelle est la seule distinction entre ces deux sous-groupes de flavonoïdes (figure 12) (**Iwashina, 2013**).

d) Isoflavones

Les isoflavonoïdes, tels que la génistéine et la daidzéine (figure 12), sont largement répandus dans le règne végétal, mais leur distribution est limitée. On les retrouve principalement dans des sources telles que le soja et d'autres légumineuses. Les isoflavonoïdes forment un sous-groupe spécifique de flavonoïdes, caractérisé par la liaison de l'anneau B à la position 3 de l'anneau C (**Panche *et al.*, 2016**).

e) Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments qui déterminent la couleur des plantes, la cyanidine et la delphinidine sont les anthocyanes les plus étudiées (figure 12). La couleur des anthocyanes dépend du pH (rouge pour les milieux acides, bleu-violet pour les milieux alcalins ou neutres) et de l'hydroxylation des anneaux A et B (figure 12). Ils sont utilisés comme colorants alimentaires (**Iwashina, 2013 ; Panche *et al.*, 2016**).

f) Chalcones

Les chalcones se caractérisent par l'absence de l'anneau C dans la structure de base du squelette des flavonoïdes, comme le montre la figure 12. Pour cette raison, ils peuvent également être appelés "flavonoïdes à chaîne ouverte" (**Panche *et al.*, 2016**).

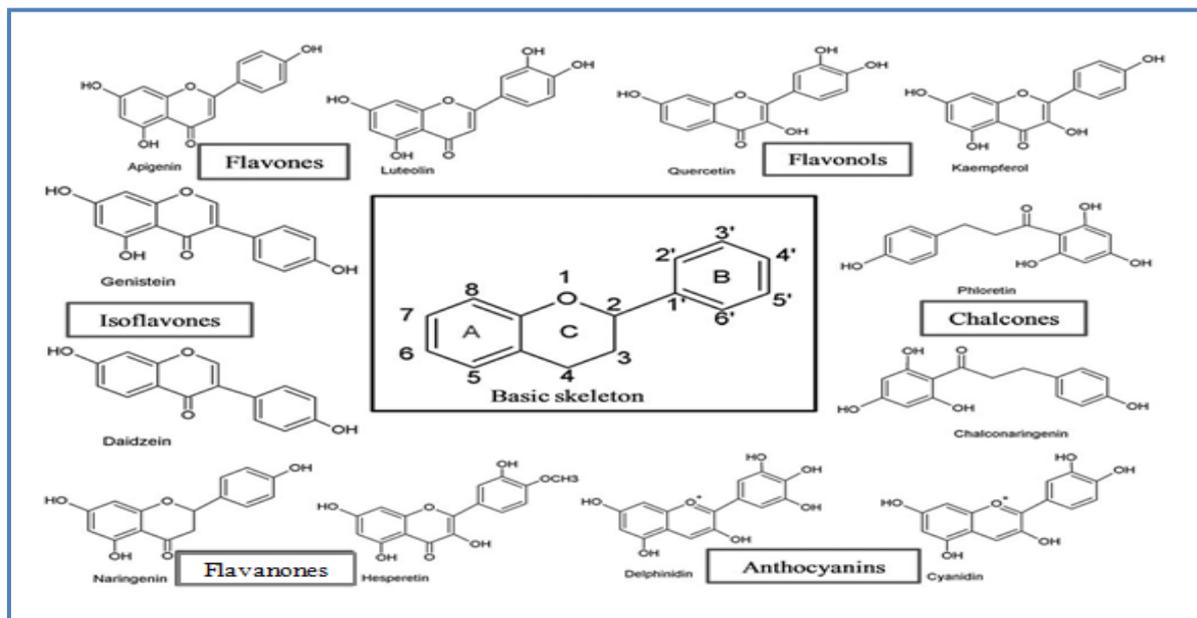


Figure 12: Structure de base du squelette des flavonoïdes et leurs classes (**Panche *et al.*, 2016**).

3. Les tannins

Selon la définition classique de Bate-Smith, les tannins sont des métabolites végétaux secondaires qui possèdent la capacité de tanner ou de convertir les peaux animales en cuir. Ces composés sont classés comme des composés phénoliques solubles dans l'eau, ayant une masse molaire comprise entre 300 et 3000 g/mol, et ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Sieniawska et Baj, 2017).

Les tannins sont généralement distribués en deux catégories principales : les tannins hydrolysables (TH) et les tannins condensés ou proanthocyanidines. Les tannins hydrolysables (TH) incluent les polyesters de l'acide gallique et de l'acide hexahydroxydiphénique, également connus sous le nom de gallotannins et d'ellagitannins respectivement. Ces tannins sont facilement hydrolysables en présence d'acides ou de bases, car ils contiennent des groupes esters qui relient les phénols aux sucres (figure 13).

En revanche, les tannins condensés (TC), représentant plus de 90% des 200 000 tonnes de tannins produits chaque année dans le monde, sont constitués d'unités répétitives de flavan-3-ol reliées entre elles par des liaisons C-C (figure 13). Ils sont davantage considérés comme des oligomères que des polymères (Bruyne *et al.*, 1999 ; Shirmohammadli *et al.*, 2018).

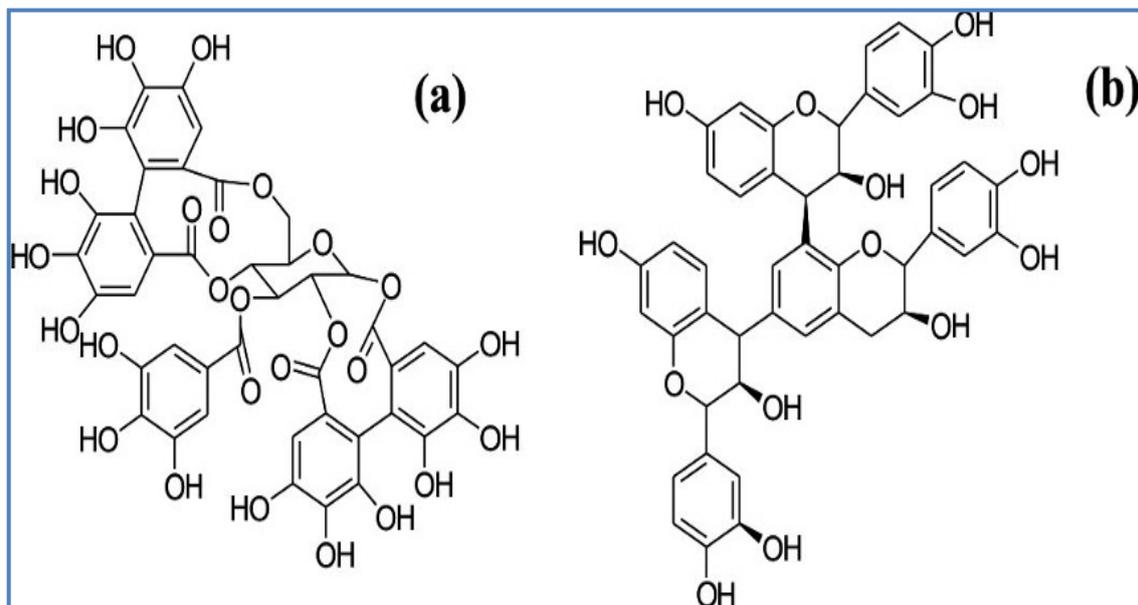


Figure 13: Structure chimiques des tannins hydrolysables (a) et condensés (b) (Raja *et al.*, 2014).

Partie 2 :
Étude
expérimentale

*Matériel et
méthodes*

I.1. Echantillonnage

Notre travail est basé sur l'étude des activités antioxydantes et antibactériennes des feuilles de trois groupes d'agrumes. Le tableau V, récapitule toutes les espèces utilisées.

Les feuilles des trois variétés d'agrumes ont été récoltées sur des arbres cultivés par l'INRAA (Institut National de Recherche en Agroalimentaire) dans la région d'Oued Ghir, Wilaya de Béjaïa. La récolte a été soumise au hasard, les feuilles de *Citrus clementina* et *Citrus aurantiifolia* ont été récoltées en février 2023, tandis que les feuilles de *Citrus limon* ont été récoltées en avril 2022.

Tableau V: Feuilles des variétés d'agrumes utilisés (Tighilet, 2013).

Nom ordinaire	Nom scientifique	Propriétés des feuilles	Photographies des feuilles
Clémentinier	<i>Citrus clementina</i>	Les feuilles sont grêles et pointues de 3 à 4 cm de largeur et de 9 à 10 cm de longueur, vert foncé et brillantes.	
Limettier	<i>Citrus aurantiifolia</i>	Sont des petites feuilles laconiques, arrondies, vert vif et parfumées. Elles sont de 4 à 5 cm de largeur et de 11 à 12 cm de longueur.	
Citronnier	<i>Citrus limon</i>	Feuilles constantes, larges, ovales et aromatisées, avec un pétiole ailé, de 17 à 18 cm de longueur et 7 cm de largeur.	

I.2. Extraction des principes actifs

I.2.1. Préparation de la poudre des feuilles

Après la récolte, les feuilles des trois variétés d'agrumes ont été soigneusement lavées à l'eau pour éliminer les impuretés et les poussières. Ensuite, elles ont été séchées à température ambiante pendant une période de quinze jours, dans un environnement bien aéré et à l'abri de la lumière. Pour achever le processus de séchage, les feuilles ont été transférées dans une étuve réglée à une température de 40°C.

Une fois le séchage est complété, les feuilles ont été réduites en poudre fine et homogène à l'aide d'un moulin à café. Cette poudre a ensuite été passée à travers un tamis de 200 μm de diamètre, afin d'obtenir une texture uniforme (figure 14).

La poudre obtenue, fine et homogène, a été soigneusement conservée dans des flacons en verre hermétiquement fermés, correctement étiquetés et protégés de la lumière, jusqu'à son utilisation ultérieure.

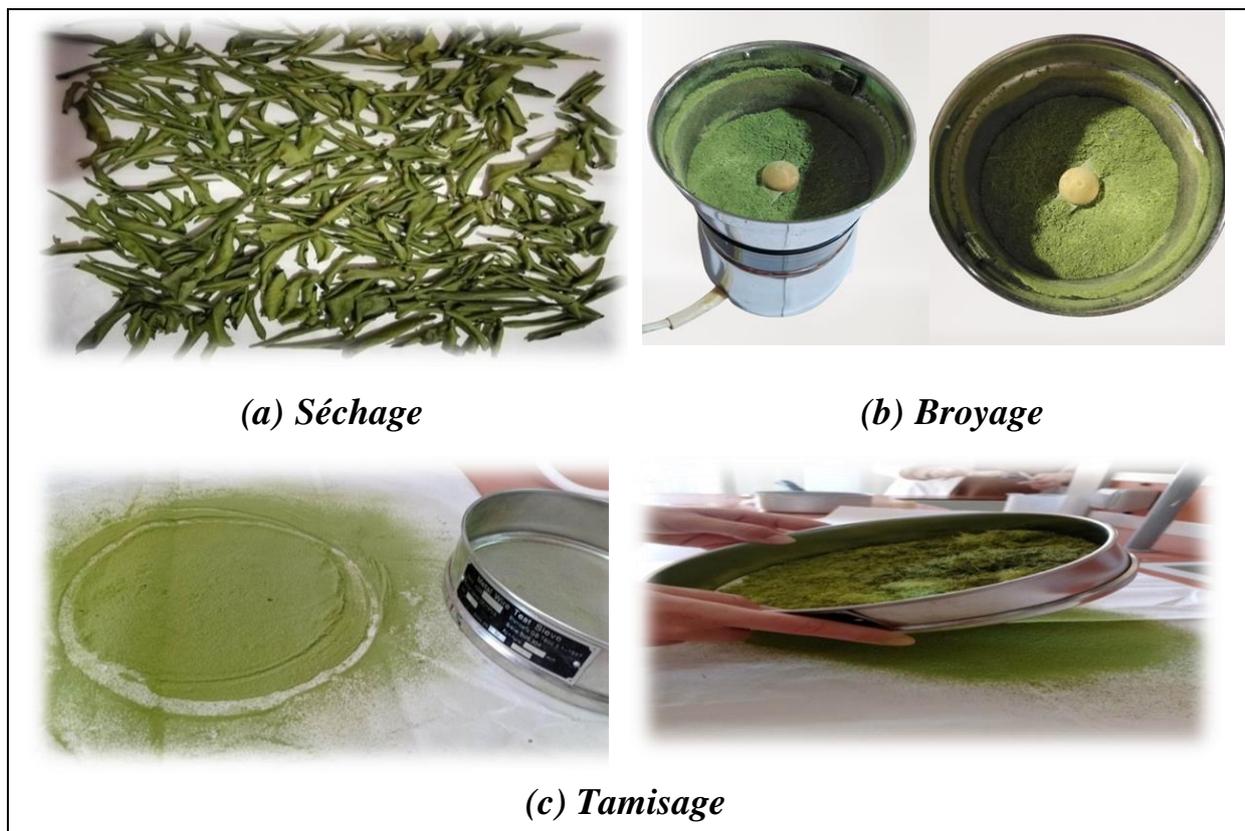


Figure 14: Les différentes étapes de préparation de la poudre des feuilles de *Citrus* (photographie originale).

I.2.2. Procédure d'extraction

Les méthodes d'extraction utilisées dans cette étude sont l'extraction par ultrasons et par macération. Ces méthodes font partie du processus d'extraction solide-liquide, dans lequel la poudre de plante est mise en contact avec un solvant afin d'extraire les substances actives présentes.

A. Extraction assistée par ultrasons

Dans cette méthode, les ultrasons ont été utilisés pour réaliser les extractions de manière rapide, avec une grande reproductibilité, et en garantissant un produit final pur (**Chemat *et al.*, 2011**).

Pour chaque espèce d'agrumes, 20 g de poudre ont été ajoutés à 200 ml d'éthanol à 70% dans des erlenmeyers. La relation entre la quantité de poudre et le volume de solvant était de 1:10 (poids/volume). Les erlenmeyers ont été fermés hermétiquement avec du parafilm, puis placés dans un bain à ultrasons fixé à une température de 42°C. L'extraction par ultrasons a été effectuée pendant 20 minutes, en appliquant une puissance de 120 W et une fréquence de 40 kHz (figure 15).



Figure 15 : Extraction des principes actifs par ultrasons.

Après l'extraction, le mélange obtenu a été filtré à l'aide d'un filtre en papier Wattman N°3 pour séparer les résidus solides de l'extrait liquide. Le filtrat a ensuite été recueilli.

Pour éliminer l'éthanol présent dans l'extrait, celui-ci a été placé dans une étuve ajustée à une température de 40°C. L'extrait a été laissé jusqu'à évaporation complète de l'éthanol, permettant ainsi la concentration des composés extraits.

Une fois l'évaporation de l'éthanol terminée, l'extrait éthanolique résultant a été recueilli et stocké dans de petits flacons en verre hermétiquement fermés, à l'abri de la lumière. Pour assurer une meilleure conservation, les flacons ont été maintenus à une température de 4°C, ce qui aide à préserver la stabilité des composés actifs présents dans l'extrait.

B. Extraction par macération

Selon **Falleh *et al.* (2008)**, une quantité de 20 g de poudre de feuilles de chaque espèce a été placée dans un bécher, puis mouillée avec 200 ml d'éthanol à 70% dans un rapport poids/volume de 1:10. Le mélange a été agité pendant 24 heures à température ambiante, dans un endroit à l'abri de la lumière, afin de prévenir l'oxydation (figure 16).



Figure 16 : Extraction par macération.

Après la macération, le mélange de poudre de feuilles et d'éthanol a été filtré à l'aide d'un filtre en papier Wattman N°3 pour séparer les résidus solides de l'extrait liquide. Le filtrat, c'est-à-dire la solution obtenue après filtration, a été recueillie et a été mis dans une étuve à 40°C jusqu'à l'évaporation du solvant. L'extrait éthanolique récupéré a été stocké dans des flacons en verre fermés, loin de la lumière à 4°C.

I.2.3. Calcul des taux d'extraction

D'après la quantité de la poudre initiale, les rendements d'extraction ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = (\text{PES} / \text{PPI}) \times 100$$

- ✓ **PES**: Poids de l'extrait sec (g)
- ✓ **PPI** : Poids initial de la poudre (g)

I.3. Dosage spectrophotométrique des composés phénoliques

I.3.1. Dosage des phénols totaux

La détermination des polyphénols totaux dans les six extraits de feuilles de *Citrus* a été réalisée en utilisant la méthode de Folin-Ciocateu adaptée par **Singleton et Rossi (1965)** et modifiée par **Ryan (2013)**.

✚ Principe

Effectivement, la méthode de Folin-Ciocateu est basée sur une réaction d'oxydoréduction entre le réactif de Folin et les polyphénols présents dans les extraits de feuilles de *Citrus*.

Le réactif de Folin est composé d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique, qui sont de couleur jaune. Lorsque les polyphénols réagissent avec ce réactif, une réaction d'oxydation se produit. Les phénols des extraits de feuilles de *Citrus* sont oxydés, tandis que le réactif de Folin est réduit.

Cette réaction d'oxydation conduit à la formation d'un mélange d'oxydes bleus (figure 17) de tungstène et de molybdène (**Catalano et al., 1999**). La coloration bleue obtenue est directement liée à la quantité de polyphénols présents dans les extraits. Plus la concentration en polyphénols est élevée, plus l'intensité de la coloration bleue est importante.

L'absorbance de cette coloration bleue est mesurée à une longueur d'onde spécifique, qui dans ce cas est de 765 nm. C'est à cette longueur d'onde que la coloration bleue présente un maximum d'absorption (Georgé *et al.*, 2005).

✚ Mode opératoire

Dans cette méthode de détermination des polyphénols totaux, 1,5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (0,1 N) (annexe II) est mélangé à 200 µL de solution de chaque extrait préalablement dilué dans l'éthanol à 70%. Cette étape permet d'initier la réaction d'oxydation des polyphénols.

Après un temps d'incubation de 5 minutes à l'ombre, un volume de 1,5 mL de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 6% (annexe II) est ajouté au milieu réactionnel qui agit comme un activateur de la réaction d'oxydation des polyphénols.

Ensuite, le milieu réactionnel est incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 1 heure et 30 minutes. Cette période permet une réaction complète entre les polyphénols présents dans les extraits et le réactif de Folin-Ciocalteu.

Enfin, l'absorbance de la solution réactionnelle est mesurée à une longueur d'onde de 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible SP-3000 nano. Cette mesure permet de quantifier l'intensité de la coloration bleue formée par la réaction d'oxydation des polyphénols.



Figure 17 : Dosage standard des polyphénols avec l'acide gallique.

Le blanc (ne contient pas d'extrait de feuilles), a été préparé dans les mêmes conditions.

Le taux des phénols totaux contenus dans l'extrait est exprimé en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS), en référence à une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide gallique à différentes concentrations comme polyphénol de référence (annexe III.1), chaque expérience a été réalisée en triple, ce qui signifie que chaque échantillon a été analysé trois fois de manière indépendante pour obtenir des résultats précis et fiables.

I.3.2. Dosage des flavonoïdes

Principe

La quantification des flavonoïdes dans les extraits de feuilles a été réalisée en utilisant une méthode basée sur la réaction entre le trichlorure d'aluminium et les flavonoïdes présents dans les échantillons. Cette réaction conduit à la formation d'un complexe stable qui présente une coloration jaunâtre (Arvouet *et al.*, 1994).

Le principe de cette méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à réagir avec le trichlorure d'aluminium en présence d'oxygène. Les groupements hydroxyle (OH) situés aux positions C3 et C5 des flavonoïdes ainsi que l'oxygène présent sur le carbone 4 participent à la formation du complexe coloré.

Mode opératoire

Pour quantifier les flavonoïdes, 1 ml d'extrait de feuilles a été mélangé avec 1 ml d'une solution de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à une concentration de 2% (annexe II). Le mélange a été incubé à l'ombre et à température ambiante pendant 10 minutes. Après cette période d'incubation, l'absorbance du mélange a été mesurée à une longueur d'onde de 415 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les différentes expériences ont été réalisées en triple de façon indépendante.

Le taux des flavonoïdes est exprimé en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS) en référence à une courbe d'étalonnage établi dans les mêmes conditions avec "la quercétine" de différentes concentrations (annexe III.2).

I.3.3. Dosage des flavonols

Principe

Pour quantifier les flavonols, une méthode similaire à celle des flavonoïdes a été utilisée. La réaction est basée sur la formation d'un complexe stable entre le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et l'oxygène présent en position C4 des flavonols, ainsi qu'avec les groupements hydroxyle (OH) en position C3 ou C5. Cette réaction donne une coloration jaune (Arvouet *et al.*, 1994), qui est mesurée par un spectrophotomètre.

Cependant, dans cette méthode, l'acétate de sodium a été ajouté en tant qu'additif à la réaction. Il permet d'ioniser les hydroxyles phénoliques fortement acides, ce qui facilite leur détection et augmente la sensibilité de la méthode (Rosler *et al.*, 1985).

Mode opératoire

Dans cette méthode de quantification, 500 μl d'extrait de feuilles ont été additionnés à 500 μl de trichlorure d'aluminium à 2% et 750 μl d'acétate de sodium à 5% (annexe II). Ce mélange a été incubé à l'ombre pendant 2 heures et 30 minutes pour permettre la formation du complexe entre le trichlorure d'aluminium et les flavonols présents dans l'extrait. Après l'incubation, l'absorbance du mélange a été mesurée à une longueur d'onde de 440 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Un blanc, qui ne contient pas d'extrait de feuilles, a été préparé dans les mêmes conditions pour servir de référence de fond.

Les expériences ont été réalisées en triple pour assurer la précision des mesures et la reproductibilité des résultats.

La quantification des flavonols dans l'extrait est réalisée en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec de la quercétine (annexe III.3) qui est utilisée comme flavonol de référence. Le taux de flavonols dans l'extrait est ensuite exprimé en milligrammes équivalents de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

I.3.4. Dosage des pigments liposolubles

Une quantité de 150mg de poudres de chaque espèce a été homogénéisée avec 10 ml d'un mélange acétone- hexane (v/v : 4/6) pendant 1 min.

Les mélanges ont été filtrés sur papier wattman N°4, et le filtrat obtenu a été mesuré avec différentes absorbances à savoir 453, 505, 645 et 663 nm (**Barros *et al.*, 2007**).

Les teneurs en composés liposolubles des feuilles de *Citrus* ont été calculées selon les formules suivantes :

- β -carotène (mg/g MS) = $0,216 \times A_{663} - 1,220 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$.
- Lycopène (mg/g MS) = $-0,0458 \times A_{663} + 0,204 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$.
- Chlorophylle a (mg/g MS) = $0,999 \times A_{663} - 0,0989 \times A_{645}$.
- Chlorophylle b (mg/g MS) = $-0,328 \times A_{663} + 1,77 \times A_{645}$.

I.4. Estimation de l'activité antioxydante

I.4.1 Détermination de l'activité antioxydante par la méthode au radical DPPH

✚ Principe

Pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de feuilles, la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) peut être utilisée. Le radical libre DPPH, de couleur violette, est réduit en un composé stable de couleur jaune (figure 19) (**Brand *et al.*, 1995**) lorsqu'il réagit avec un antioxydant. Cette réaction se produit par la capture d'un atome d'hydrogène (H) de l'antioxydant (figure 18).

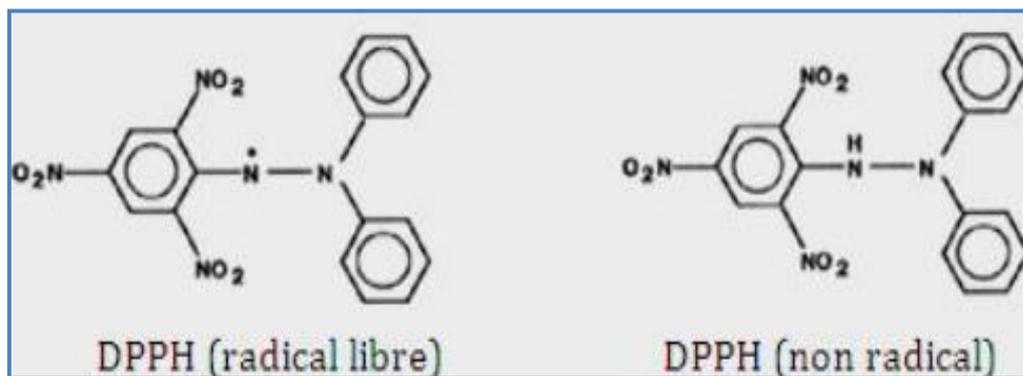


Figure 18 : Réduction du radical DPPH (**Brand *et al.*, 1995**).

✚ Mode opératoire

Pour évaluer le pouvoir anti-radicalaire des extraits de feuilles de *Citrus*, nous avons utilisé la méthode du test DPPH. Dans cette méthode, une solution méthanolique de DPPH

(60.86 μM) (annexe II) a été mélangée avec différents volumes d'extraits de feuilles de *Citrus* à des concentrations allant de 25 à 300 $\mu\text{g/mL}$ (figure 20) (Masuda *et al.*, 1999 ; Misuthisakul, 2007).

Le contrôle négatif a été préparé en mélangeant de l'éthanol 70% avec la solution DPPH', et le mélange a été incubé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. Les absorbances ont ensuite été mesurées à 517 nm.

Le contrôle positif a été réalisé de la même manière en utilisant l'acide gallique et la quercétine (annexe III.4) comme antioxydants de référence, à différentes concentrations (2, 4, 6, 8 et 10 $\mu\text{g/mL}$).

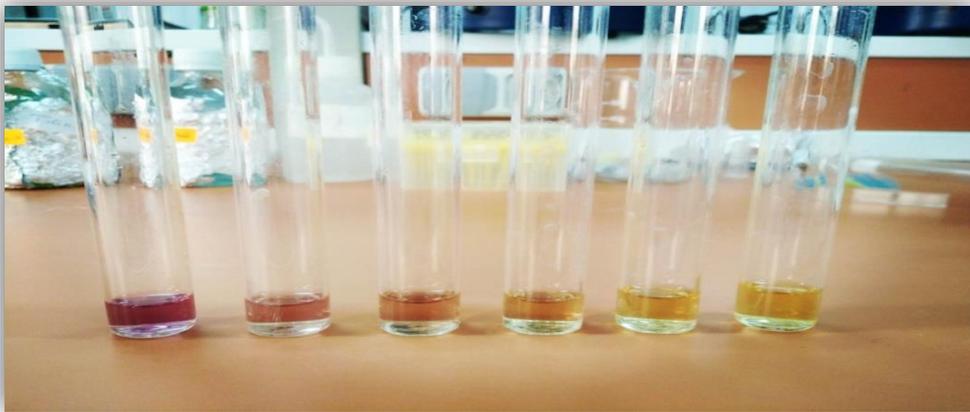


Figure 19 : Activité anti-radicalaire des extraits par le test DPPH.

- La dégradation de la couleur est relative à l'activité antioxydante et donc une diminution de l'absorbance.
- Le pourcentage de piégeage du radical DPPH' a été calculé à partir la formule suivante :

$$\% \text{ I} = [A_0 - A_1 / A_0] \times 100$$

Avec :

% I : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH'

A₀ : Absorbance du blanc (control négatif) en absence d'inhibiteur du radical.

A₁ : Absorbance en présence de l'inhibiteur (extrait + la solution DPPH).

La réduction du radical DPPH[•] est estimée en IC₅₀, qui convienne à la concentration de l'extrait qui inhibe 50% du radical DPPH[•].

I.4.2 Activités scavenger du radical ABTS^{•+}

✚ Principe

Le test ABTS est utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits végétaux. Dans ce test, le radical cation ABTS^{•+} est généré par l'oxydation de l'ABTS avec un sel fort, le persulfate de potassium (Brice *et al.*, 2010). Le radical ABTS^{•+} a une coloration bleu-vert intense.

Lorsque des extraits végétaux contenant des antioxydants sont ajoutés à la solution contenant le radical ABTS^{•+}, ces antioxydants peuvent neutraliser le radical en captant un proton (H⁺), ce qui entraîne la formation d'ABTS⁺ incolore.

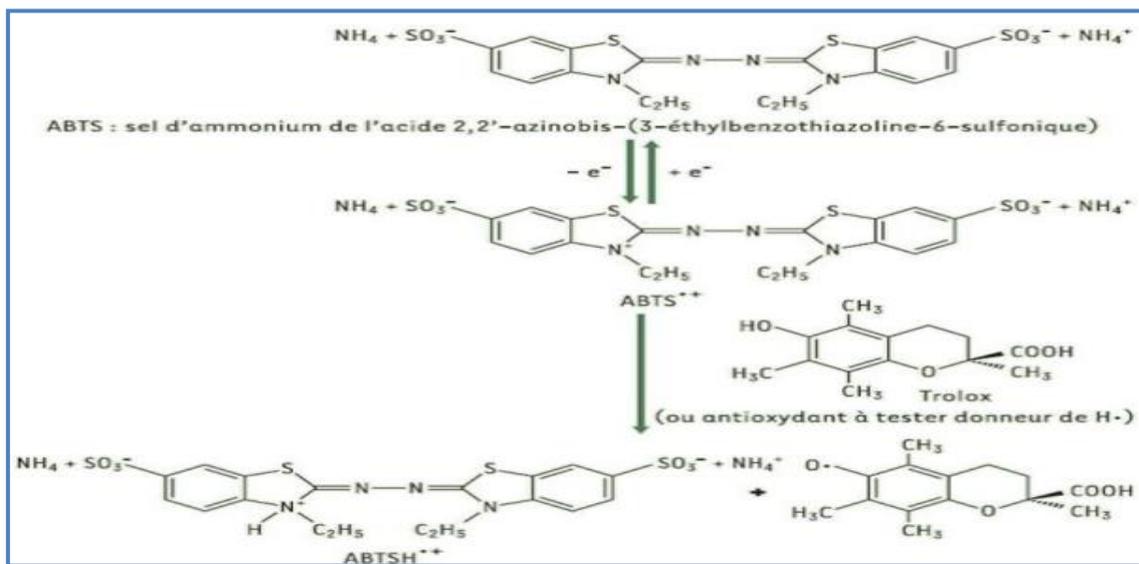


Figure 20 : Réaction de stabilisation du radical ABTS^{•+} par un antioxydant (Lien *et al.*, 1999).

✚ Mode opératoire

i. Préparation de la solution ABTS^{•+}

Selon le protocole de Van den Berg *et al.* (2000), une solution d'ABTS^{•+} à 7 mM (annexe II) est préparée en mélangeant de l'ABTS avec de l'eau. Ensuite, une solution de persulfate de potassium (K₂O₈S₂) (Re *et al.*, 1999) à 2,5 mM (annexe II) est ajoutée au

mélange. Le persulfate de potassium agit comme un agent oxydant pour générer le radical $ABTS^{\cdot+}$.

Une fois le mélange préparé, il est conservé à l'obscurité et à température ambiante pendant 16 heures. Cette période permet la formation du radical $ABTS^{\cdot+}$ de manière stable et reproductible. Avant utilisation, la solution d' $ABTS^{\cdot+}$ est diluée avec de l'eau distillée de manière à obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,020$ à une longueur d'onde de 734 nm (annexe II). Cette étape de dilution est importante pour standardiser les conditions de mesure et assurer une comparaison précise des activités antioxydantes des échantillons.

ii. Mesure de l'activité

Une quantité de 1,9 ml de la solution $ABTS^{\cdot+}$ est mélangée avec 100 μ l d'extrait à des concentrations allant de 10 à 80 μ g/ml. Le blanc est préparé en mélangeant 100 μ l d'éthanol 70% avec 1,9 ml de la solution $ABTS^{\cdot+}$ (figure 21). Après un temps d'incubation de 5 minutes à température ambiante et à l'ombre, les absorbances sont mesurées à 734 nm.

Le contrôle positif est préparé dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique et la quercétine de différentes concentrations en tant qu'antioxydants standards (annexe III.5). Cette étape permet de comparer l'activité antioxydante des extraits de feuilles de *Citrus* étudiées avec celle des antioxydants standards.

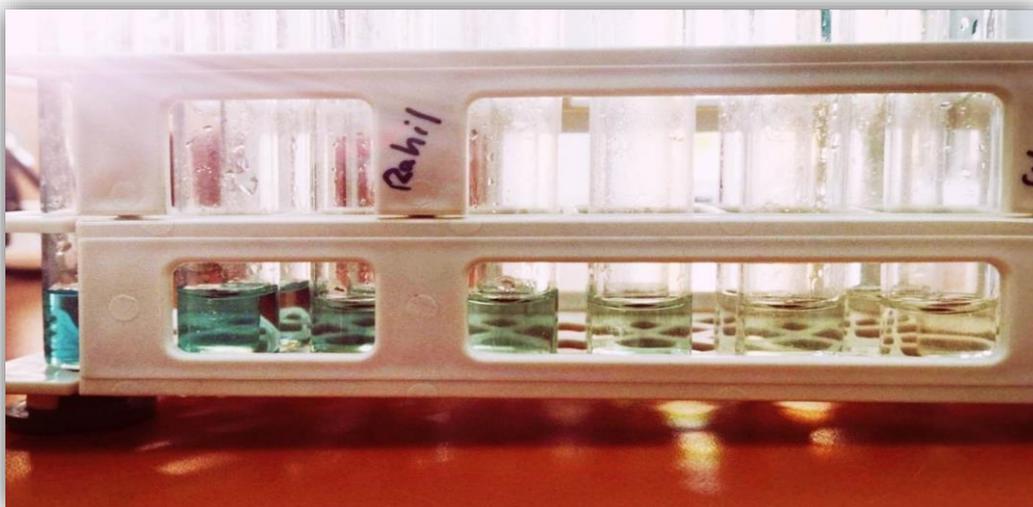


Figure 21 : Activité scavenger des extraits de feuilles de *Citrus* par le test ‘‘ABTS’’.

- Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} a été estimé à partir de la formule suivante :

$$\% I = [A_0 - A_1 / A_0] \times 100$$

Avec :

% I : Pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+}

A₀ : Absorbance du blanc (En absence d'extrait).

A₁ : Absorbance (Extrait + ABTS^{•+}).

L'activité scavenger du radical ABTS^{•+} est estimée en IC₅₀, qui convienne à la concentration de l'extrait qui inhibe 50% du radical ABTS^{•+}

I.4.3 Test de réduction du fer (FRAP)

Principe

Le test de réduction du fer ferrique est basé sur la capacité d'un antioxydant réducteur à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) du complexe ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) en fer ferreux (Fe²⁺). Cette réaction est accompagnée d'un changement de couleur, passant du jaune (pour le fer ferrique) au bleu-vert (pour le fer ferreux) (Oyaizu, 1986 ; Amarowicz *et al.*, 2004).

Mode opératoire

Un volume de 500 µl d'extrait de feuilles de *Citrus*, à des concentrations comprises entre 50 et 500 µg/ml, a été mélangé avec 1 ml d'une solution tampon phosphate de pH 6,6 (annexe II) et 1 ml d'une solution de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) à 1% (annexe II). Ce mélange a été incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 à 30 minutes. Après l'incubation, 1 ml d'acide trichloracétique à 10% (annexe II) a été ajouté pour arrêter la réaction.

Ensuite, 1 ml de ce mélange a été prélevé et mélangé avec 1 ml d'eau distillée et 200 µl d'une solution de chlorure de fer (FeCl₃, 6H₂O) à 0,1%. Après une incubation de 10 minutes à

l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 700 nm par rapport à un blanc ne contenant pas d'extrait.

Le contrôle positif a été préparé de la même manière en utilisant de l'acide ascorbique à différentes concentrations (annexe III.5) comme antioxydant standard.

I.5 Evaluation de l'activité antibactérienne

Selon **Mothana et lindequist (2005)** et **Mamoudi et al., (2012)**, l'estimation de l'activité antibactérienne est effectuée par la méthode de diffusion de disques sur milieu gélosé.

Pour cette étude, on a préparé deux milieux de culture à savoir la gélose nutritive et le milieu Muller-Hinton (annexe IV).

Tout le matériel utilisé dans cette étude a été stérilisé à l'autoclave à 121°C durant 15 minutes.

Les différents extraits de *C. clementina*, *C. limon* et *C. aurantiifolia* obtenus par macération et ultrason ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) avec une concentration initiale de 100mg de chaque extrait par 1ml de solution de DMSO, puis une dilution de ½ a été faite à la solution mère pour obtenir une concentration de 50mg/ml.

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont des souches cibles (annexe V). *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Staphylococcus epidermidis* sont ré-isolées sur gélose nutritive alors que *Escherichia coli* a étéensemencée sur milieu EMB, *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu king et *Staphylococcus aureus* sur chapman.

Les boîtes de Pétri ont été mis dans l'étuve pendant 24 heures à 37°C, pour avoir des colonies pures bien séparées (figure 22) (**Bolou et al., 2011**).

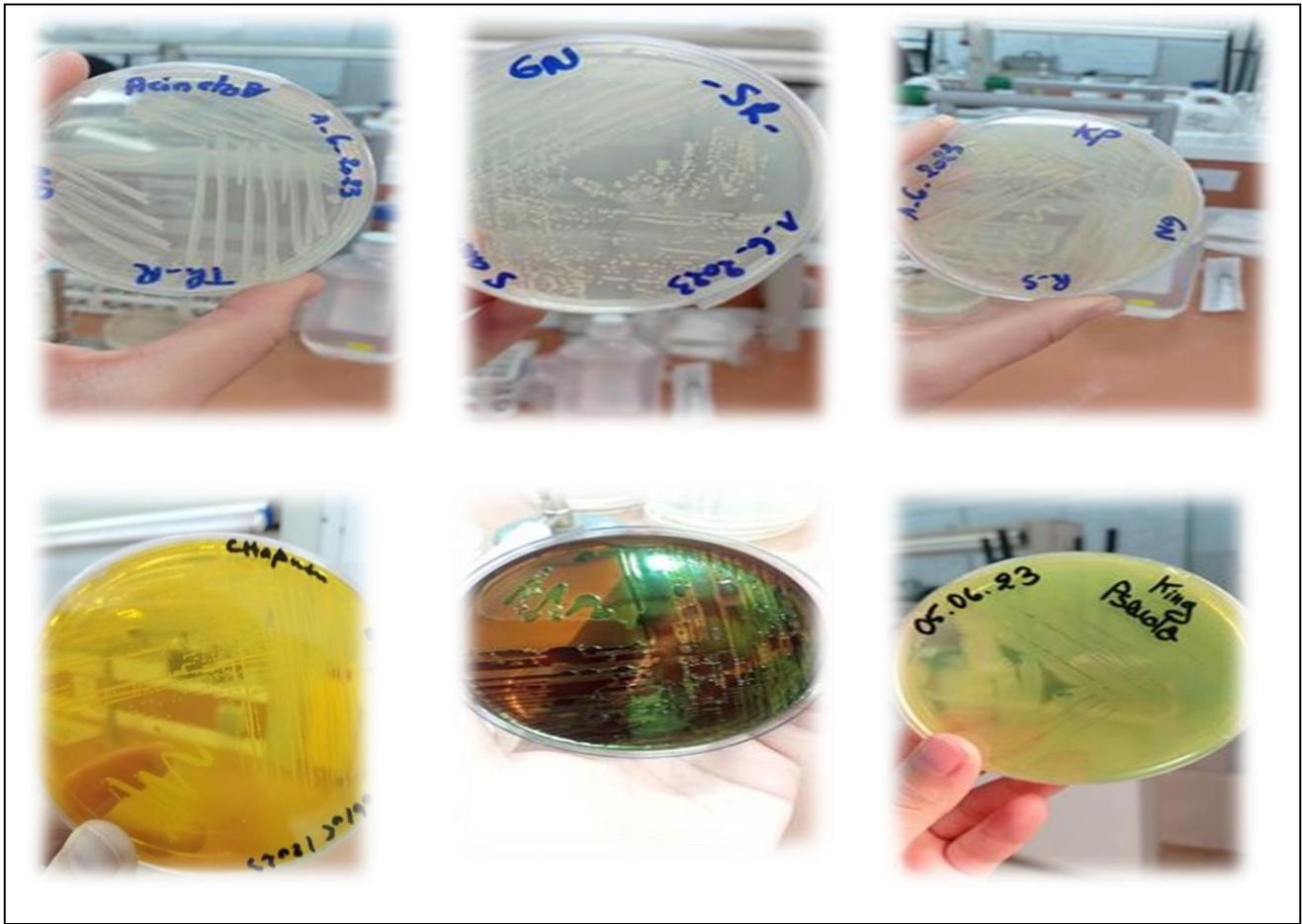


Figure 22 : Souches bactériennes repiquées sur les milieux d'isolement (photographie originale).

Pour préparer les suspensions bactériennes, prélever quelques colonies bien séparées d'une culture pure de bactéries ayant poussé pendant 24 heures au moyen d'une anse de platine stérile et les transférer dans 9 ml d'eau physiologique.

Ajustez la densité optique de l'inoculum en mesurant l'absorbance à 625 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'objectif est d'obtenir une densité optique de l'ordre de 0,08 à 0,1 ; ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml.

Un ensemencement par écouvillonnage de la suspension bactérienne à été fait de haut en bas en stries serrées à la surface de la gélose Muller-Hinton.

Les disques imprégnés de 20 μ l de chaque extrait de concentration 100 et 50 mg/ml préparés auparavant, ont été déposés sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

Les boîtes de pétri sont ensuite laissées pendant 2h à température ambiante pour permettre une bonne diffusion des extraits testés avant d'être incubées à l'étuve à 37 °C pendant 24h.

L'activité antimicrobienne est déterminée par la mesure des zones d'inhibition apparues autour des disques.

I.6 Analyse statistique des résultats

Toutes les données de cette étude ont été présentées sous forme de moyenne \pm l'écart-type des valeurs obtenues, et toutes les expériences ont été effectuées en triple et de manière indépendante.

Les droites d'étalonnage sont obtenues par la méthode de la régression linéaire avec l'Excel et les concentrations d'inhibition de 50% ont été calculées par le logiciel Origin 9 version 2022.

*Résultats et
discussion*

II.1. Taux d'extraction

Les résultats de la présente étude indiquent que les taux de rendement des extractions par macération et par ultrasons des feuilles des trois espèces d'agrumes : *Citrus clementina*, *Citrus limon* et *Citrus aurantiifolia*, en utilisant l'éthanol à 70 % comme solvant d'extraction, varient selon l'espèce et de la méthode d'extraction appliquée, comme le montre la figure 23.

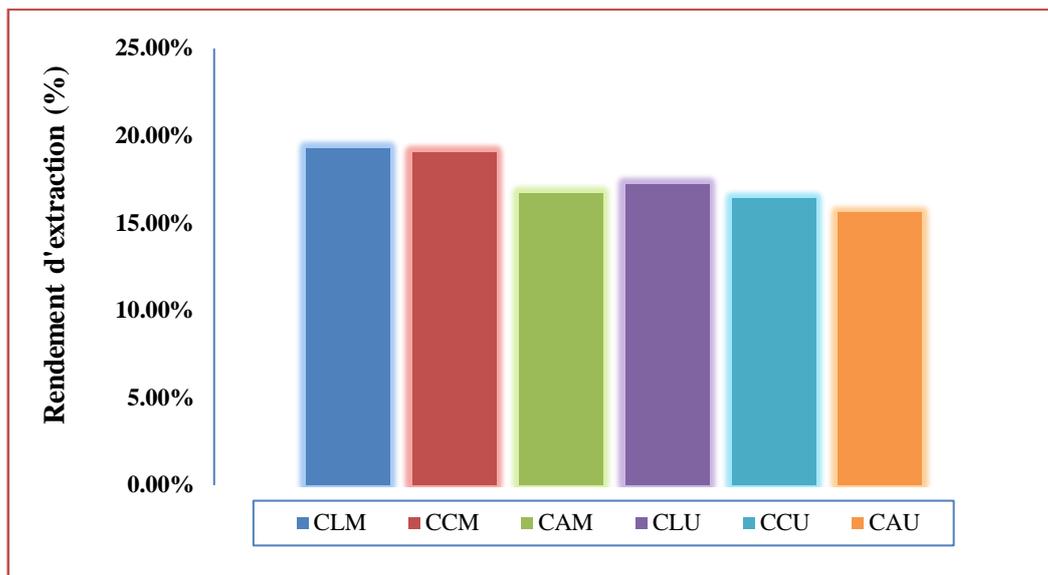


Figure 23 : Taux d'extraction par macération et ultrasons des feuilles des trois espèces de *Citrus*. C.C.M: *Citrus clementina* macération ; C.L.M : *Citrus limon* macération ; C.A.M : *Citrus aurantiifolia* macération ; C.C.U : *Citrus clementina* ultrasons ; C.L.U : *Citrus limon* ultrasons; C.A.U : *Citrus aurantiifolia* ultrasons.

Les résultats de la figure 23 montrent que les taux d'extraction par macération sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par ultrasons, quelle que soit l'espèce de *Citrus* utilisée, alors que les conditions d'extraction appliquées pour les deux méthodes sont les mêmes en termes de quantité de matériel végétal et de type de solvant d'extraction (20g de poudre et 200ml d'éthanol 70%).

D'autre part, il a été enregistré que *C. limon* présentait les meilleurs taux d'extraction avec 19,30% avec l'extraction par macération et 17,20% avec l'extraction par ultrasons par rapport aux autres espèces étudiées, suivi par *C. clementina* (19,05% et 16,40% pour la macération et les ultrasons, respectivement). *Citrus aurantiifolia*, en revanche, a montré le taux d'extraction le plus faible, que ce soit par macération (16,70%) ou par ultrasons (15,58%).

Des études précédentes ont montré que le rendement maximal d'extraction par la technique de macération est comparable à celui que nous avons obtenu. Cependant, les résultats obtenus dans l'étude actuelle sont largement supérieurs à ceux obtenus par **Khettal et al. (2017)**, qui ont utilisé la même technique d'extraction (macération) et les mêmes variétés d'agrumes, avec l'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction (5,15%, 6,70% et 12,45% pour *C.limon*, *C.aurantiifolia* et *C.clementina* respectivement). Alors que **Rahmouni et Yaiche (2014)**, ont obtenu un taux de rendement de 5,4% pour l'extraction par macération des feuilles de *C.clementina* en utilisant l'éthanol, ce qui est nettement inférieur à celui obtenu dans notre étude.

Cependant, d'autres études tendent à montrer que l'eau est le préférable solvant d'extraction pour les feuilles de *Citrus*, suivi de l'éthanol et enfin du méthanol (**Hachemaoui et Oumbiche, 2013 ; Tighilet, 2013**).

Effectivement, les variations des taux d'extraction des composés phénoliques peuvent être influencées par plusieurs facteurs comme la solubilité des composés phénoliques dans les solvants d'extraction, les solvants utilisés et leurs degrés de pureté, la méthode d'extraction, le temps d'extraction, la taille des particules et la température (**Hayat et al., 2009 ; Naczk et Shahidi, 2004**).

Dans notre cas, la variation entre les deux méthodes peut être due au temps d'extraction qui était de 24h pour la macération et 20min pour les ultrasons, à la température utilisée pour l'extraction qui était une température ambiante dans le cas de la macération, qui de préserve les substances thermosensibles, contrairement aux ultrasons où on a utilisé une température de 40°C. Cette différence peut être due également à l'utilisation, dans le cas de la macération, de l'agitation qui assure l'homogénéité du milieu et maintient les particules végétales en suspension.

II.2. Dosages colorimétriques des extraits des feuilles d'agrumes

II.2.1 Dosage des phénols totaux

L'analyse quantitative des polyphénols totaux a été réalisée en utilisant une équation de régression linéaire basée sur une courbe d'étalonnage. L'équation spécifique utilisée pour cette étude était $y = 0,0054x - 0,0358$, l'acide gallique utilisé comme étalon de référence. Le

coefficient de détermination (R^2) de cette équation était de 0,9913, indiquant un ajustement satisfaisant des données à la courbe d'étalonnage.

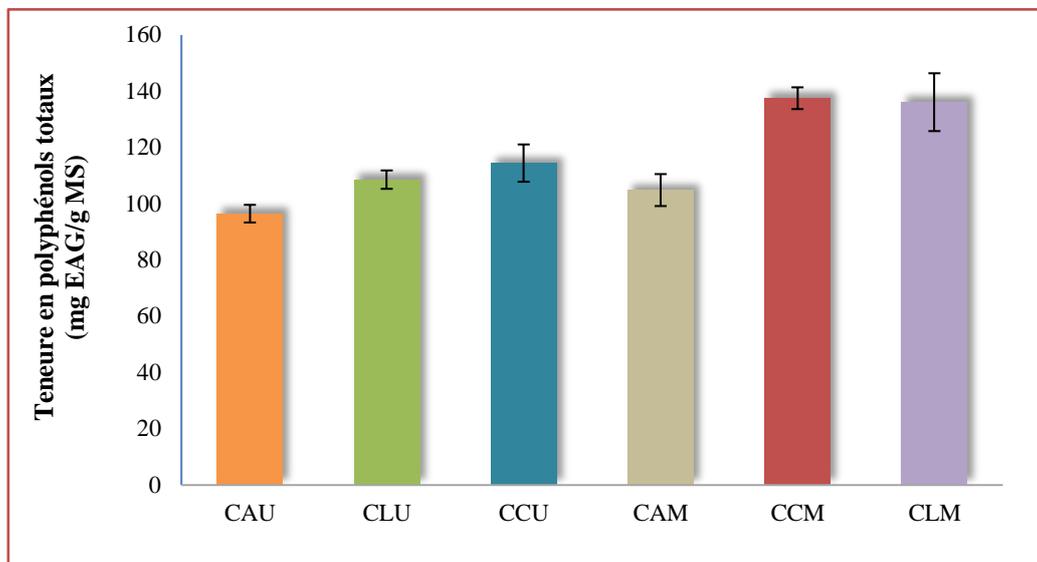


Figure 24 : Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de feuilles de *Citrus*. Les résultats sont la moyenne de trois essais. Les barres verticales représentent les écarts-types. C.C.M : *Citrus clementina* macération ; C.L.M : *Citrus limon* macération ; C.A.M : *Citrus aurantiifolia* macération ; C.C.U : *Citrus clementina* ultrasons ; C.L.U : *Citrus limon* ultrasons ; C.A.U : *Citrus aurantiifolia* ultrasons.

Les résultats ci-dessus (figure 24) montrent que la teneur en polyphénols des extraits obtenus par macération est plus supérieure que celle des extraits obtenus par ultrasons.

La clémentine est l'espèce la plus riche en ces composés, quelle que soit la méthode d'extraction appliquée, avec un taux de $137,54 \pm 3,87$ mg EAG/g MS pour l'extrait par macération et $114,47 \pm 6,63$ mg EAG/g MS pour l'extrait par ultrasons. D'autre part, l'espèce *C.aurantiifolia* a donné la teneur la plus faible avec $104,88 \pm 5,68$ mg EAG/g MS et $96,49 \pm 3,14$ mg EAG/g MS pour l'extrait par macération et l'extrait par ultrasons respectivement.

Les résultats obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux obtenus par **Khettal et al. (2017)** qui montrent que les teneurs en phénols pour les trois espèces étudiées varient de $3,83$ mg EAG/g MS à $11,67$ mg EAG/g MS pour les extraits méthanoliques et de $98,06$ mg EAG/g MS à $125,28$ mg EAG/g MS pour les extraits aqueux. De même que celles rapportées par **Muthiah et al (2012)**, qui ont travaillé sur trois autres espèces, *C. aurantium*, *C. limetta* et *C. limon* (entre $07,39$ et $33,05$ mg/g).

Par ailleurs, l'espèce *C.aurantiifolia* a donné la teneur plus faible avec $104,88 \pm 5,68$ mg EAG/g MS et $96,49 \pm 3,14$ mg EAG/g MS respectivement pour la macération et l'ultrason.

Différents facteurs peuvent influencer la teneur de ces composés dans les extraits végétaux. En effet, des études antérieures ont montré que les facteurs extrinsèques (facteurs climatiques et géographiques), les facteurs génétiques, la maturité des plantes et la durée de stockage ainsi que la partie de la plante utilisée ont une forte influence sur la teneur en composés phénoliques (Ganga et Mosase, 2001). Mais aussi la composition des extraits, notamment la présence de certains groupes chimiques (acides organiques, acide ascorbique, sucres, amines aromatiques), qui peuvent encore réagir avec le réactif de Folin-Ciocalteu (Abd Ghafar *et al.*, 2010).

II.2.2 Dosage des flavonoïdes

Le taux de flavonoïdes des extraits de feuilles de *Citrus* a été déterminé à l'aide de la méthode au trichlorure d'aluminium. Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant la quercétine comme flavonoïde de référence (annexe III.2) L'équation de régression linéaire obtenue était $y = 0,0408x$. Le coefficient de détermination (R^2) de cette équation était de 0,99, indiquant une bonne corrélation entre les réponses mesurées et les concentrations en flavonoïdes.

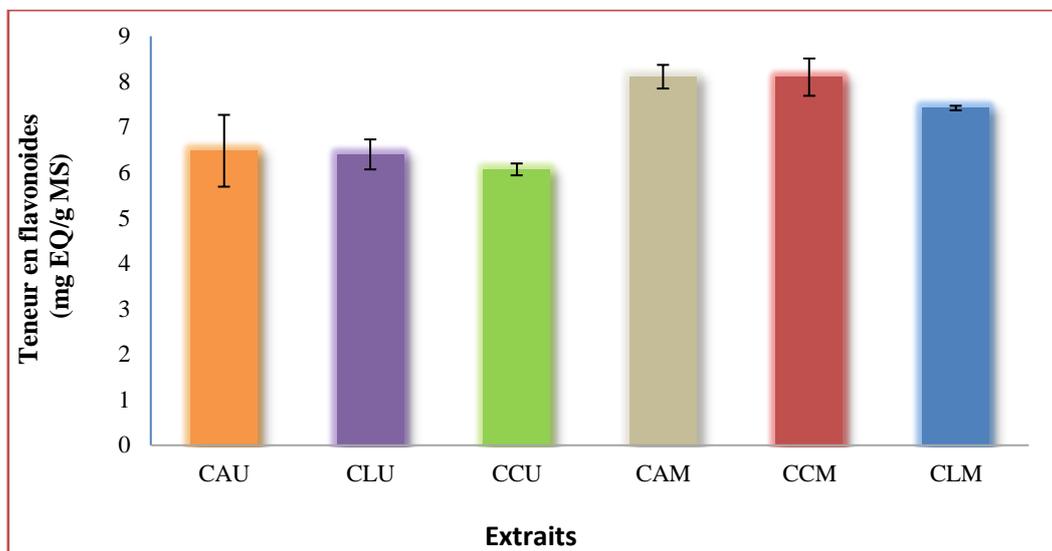


Figure 25 : Teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques des feuilles d'agrumes. Les résultats sont la moyenne de trois essais. Les barres verticales représentent les écarts-types. C.C.M : *Citrus clementina* macération ; C.L.M : *Citrus limon* macération ; C.A.M : *Citrus aurantiifolia* macération ; C.C.U : *Citrus clementina* ultrasons ; C.L.U : *Citrus limon* ultrasons ; C.A.U : *Citrus aurantiifolia* ultrasons.

Les résultats de ce test montrent que la teneur totale en flavonoïdes varie considérablement entre les différents extraits. Les extraits obtenus par la méthode de macération ont enregistré la teneur en flavonoïdes la plus élevée par rapport à ceux obtenus par ultrasons.

L'espèce *C.aurantiifolia* a la teneur en flavonoïdes la plus grande pour les deux méthodes d'extraction (avec $8,28 \pm 0,26$ et $6,61 \pm 0,81$ mg EQ/g MS pour la macération et les ultrasons, respectivement).

Dans la méthode d'extraction par macération, les teneurs en flavonoïdes de *C.aurantiifolia* et *C.clementina* sont très proches ($8,28 \pm 0,26$ et $8,27 \pm 0,42$ mg EQ/g MS), tandis que *C.limon* a la teneur la plus faible avec $7,56 \pm 0,05$ mg EQ/g MS. En ce qui concerne la teneur en flavonoïdes des extraits ultrasoniques, *C.clementina* a la plus faible teneur en flavonoïdes ($6,20 \pm 0,13$ mg EQ/g MS), tandis que *C.aurantiifolia* est proche de *C.limon* ($6,61 \pm 0,81$ et $6,53 \pm 0,34$ mg EQ/g MS).

Par rapport aux résultats obtenus par **Khettal et al. (2016)**, qui ont utilisé le méthanol comme solvant d'extraction, nous notons que les teneurs en flavonoïdes de nos extraits éthanoliques, qui varient de $7,56$ mg EQ/g MS à $8,28$ mg EQ/g MS pour les 3 espèces étudiées, sont plus élevées ($2,72$ à $7,99$ mg EQ/g MS).

En revanche, les résultats obtenus par **Rahmouni et Yaiche (2014)**, qui ont utilisé la catéchine comme flavonoïde de référence, montrent que la teneur en flavonoïdes des espèces de *C.clementina* ($2,014$ mg EQ/g MS) est inférieure à celle obtenue dans notre étude ($8,27$ mg EQ/g MS).

Comme mentionné précédemment, en comparant avec les études antérieures, l'extraction aqueuse donne une meilleure teneur en flavonoïdes suivie de l'extraction éthanolique et enfin méthanolique quelle que soit l'espèce étudiée (**Khettal et al., 2017 ; Tighilet, 2013**).

Quelle que soit l'espèce étudiée et la méthode d'extraction utilisée, il paraît que les flavonoïdes dans nos extraits ne sont pas les polyphénols majoritaires. En effet, d'après les résultats du dosage, le rapport entre les polyphénols totaux et les flavonoïdes est inférieur à $0,07$ (figure 26). Ce résultat est plus au moins en accord avec ceux montrés par **Khettal et al. (2017)** et **Menichini et al., (2011)**.

Ces résultats dépendent de plusieurs facteurs tels que, la maturité des feuilles, leurs stades d'évolution et de la polarité des solvants utilisés comme rapportés par **Hamia et al. (2014)**, mais également de la concentration du solvant, la ration solide-liquide et le temps d'extraction (**Taibi et Roudjane, 2022**).

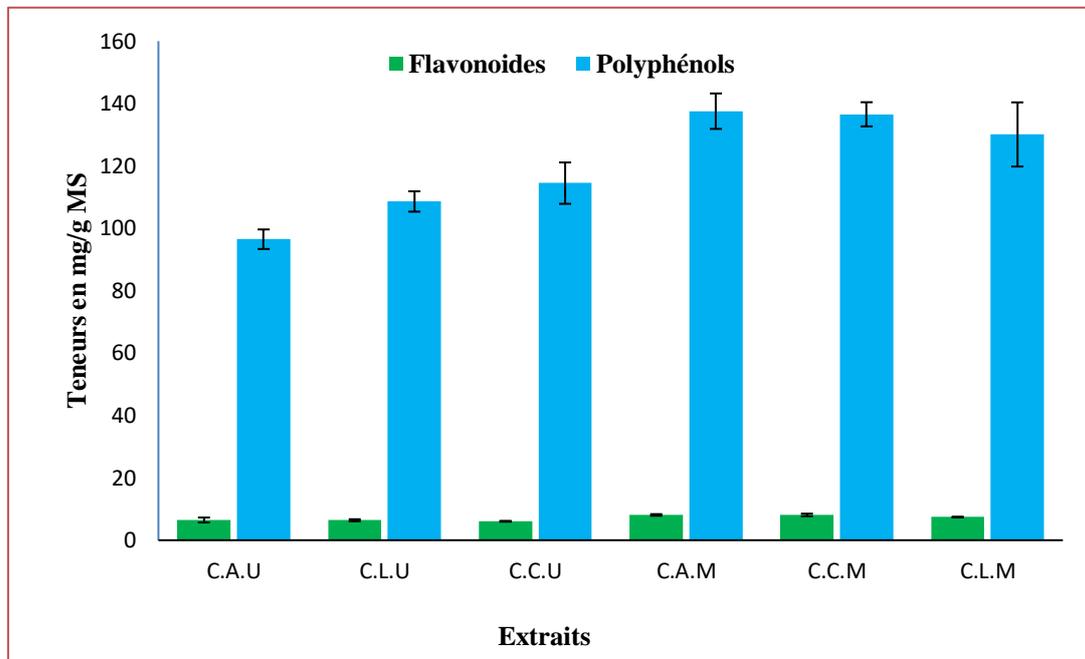


Figure 26 : Teneur en polyphénols (mg EAG/g MS) et flavonoïdes (mg EQ/g MS) des extraits des feuilles de *Citrus*. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3). Les barres verticales représentent les écarts types.

II.2.3 Dosage des flavonols

La teneur en flavonols des extraits a été déterminée en utilisant la méthode d'acétate de sodium. Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant la quercétine comme flavonol de référence (annexe III.3). L'équation de régression linéaire obtenue était $y = 0,0159x + 0,099$. Le coefficient de détermination (R^2) de cette équation était de 0,99, ce qui indique une bonne corrélation entre les réponses mesurées et les concentrations en flavonols. Les résultats du dosage des flavonols sont présentés dans la figure 27.

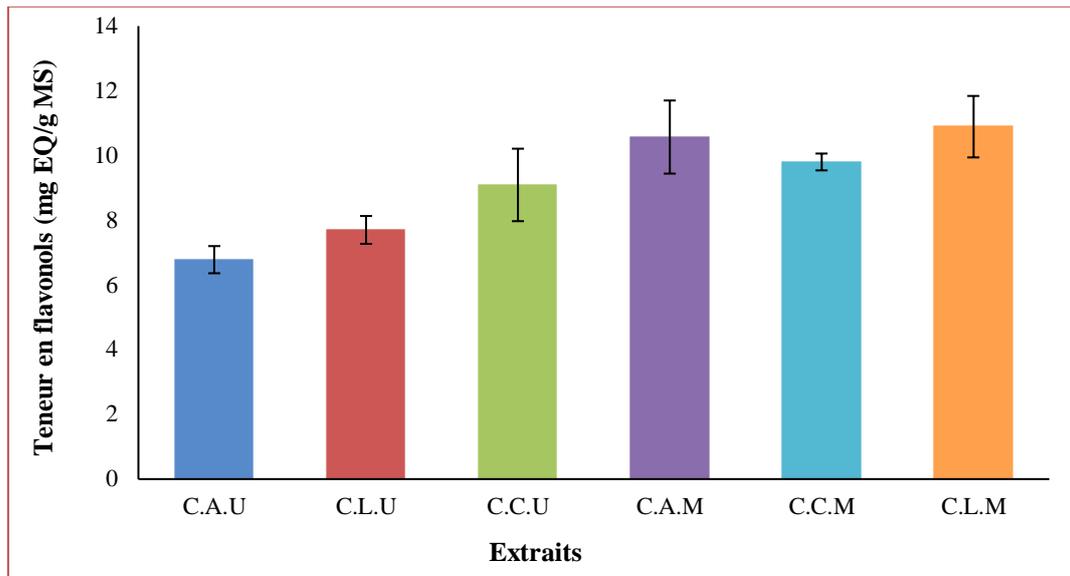


Figure 27 : Teneurs en flavonols des six extraits des feuilles de *Citrus*, obtenus par macération et ultrasons. Les résultats sont la moyenne de 3 essais. Les barres verticales indiquent les écarts-types. C.C.M : *Citrus clementina* macération ; C.L.M : *Citrus limon* macération ; C.A.M : *Citrus aurantiifolia* macération ; C.C.U : *Citrus clementina* ultrasons ; C.L.U : *Citrus limon* ultrasons ; C.A.U : *Citrus aurantiifolia* ultrasons.

Les résultats du dosage des flavonols indiquent que les extraits de macération contiennent des niveaux plus élevés de flavonols que ceux obtenus par la méthode aux ultrasons.

Dans le cas de l'ultrason, l'extrait de *C.clementina* a montré la teneur en flavonols la plus élevée avec $9,50 \pm 1,18$ mg EQ/g MS, suivi par *C.limon* et *C.aurantiifolia* avec $8,16 \pm 0,45$ et $7,19 \pm 0,45$ mg EQ/g MS, respectivement. Alors que dans le cas de l'extraction par macération, les teneurs en flavonols sont proches entre les trois espèces étudiées ($1,55 \pm 1,01$; $11,21 \pm 1,20$ et $10,40 \pm 0,28$ mg EQ/g MS, respectivement pour *C. limon*, *C.aurantiifolia* et *C.clementina*).

Cette variation dans la teneur en flavonols dépend de l'espèce, le type du solvant utilisé, la méthode d'extraction et les conditions opératoires. Cependant, il est difficile de comparer ces résultats avec les données bibliographiques à cause de la diversité des paramètres (méthodes et temps d'extraction, ration solide-liquide, concentration du solvant) qui influencent les taux des flavonols pour une même espèce végétale.

II.2.4 Dosage des composés liposolubles

La détermination des pigments liposolubles (caroténoïdes, lycopène et chlorophylle) dans les feuilles de *Citrus* étudiées (figure 28) a montré que la chlorophylle (a) est le composé le plus dominant dans les trois espèces par rapport aux autres pigments, en particulier chez *C. limon* où elle est présente à une concentration de $70,62 \pm 2,86$ mg/g MS. *C. clementina* a la teneur la plus faible des trois espèces ($53,60 \pm 2,84$ mg/g MS).

Le lycopène, quant à lui, est le deuxième pigment liposoluble le plus abondant, avec $55,36 \pm 2,52$ mg/g MS chez *C. aurantiifolia*, $52,78 \pm 1,22$ mg/g MS chez *C. limon* et $40,89 \pm 2,77$ mg/g MS chez *C. clementina*. La chlorophylle b est le pigment liposoluble le moins abondant dans nos extraits.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Tighilet et al. (2022)**, qui ont révélé que la chlorophylle a et le lycopène sont les deux pigments lipo-solubles les plus abondants dans les extraits de rameaux des espèces de *Retama*.

La présence de chlorophylles en quantité importante dans les feuilles de différentes espèces d'agrumes suggère un rôle dans le phénomène de photosynthèse (**Quezel et Santa, 1962**).

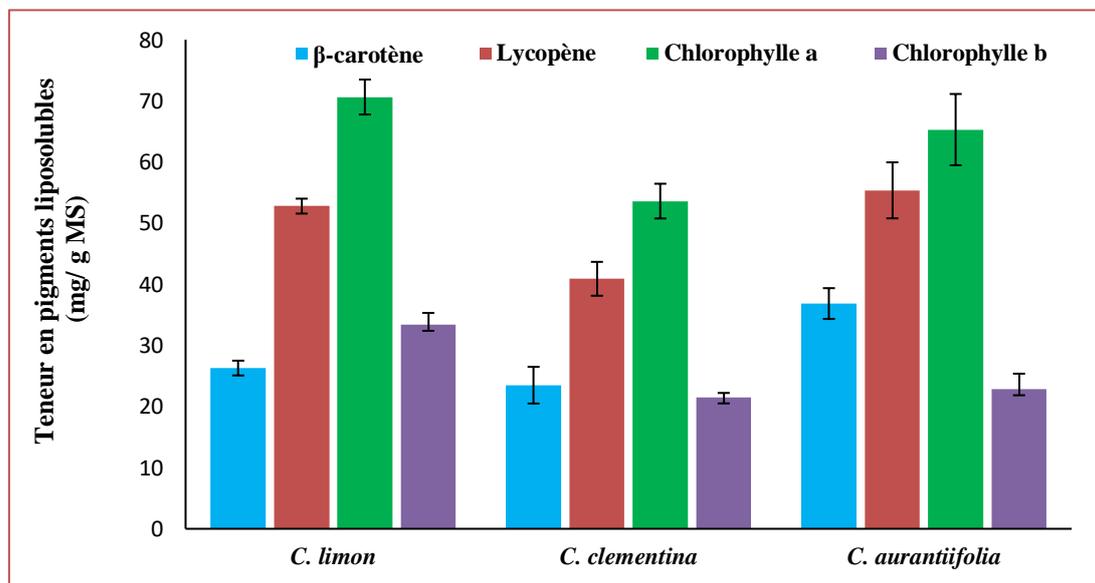


Figure 28 : Teneurs en composés liposolubles chez les trois feuilles de *Citrus* étudiées. Les résultats sont la moyenne de 3 essais. Les barres verticales représentent les écartypes.

Les composés liposolubles sont connus pour jouer un rôle important dans la lutte de l'organisme contre de nombreuses maladies grâce à leurs propriétés antioxydantes, qui peuvent réduire le risque de maladies causées par les radicaux libres, telles que les maladies cardiaques ou certaines tumeurs (Barros *et al.*, 2013).

En effet, la chlorophylle est connue pour contribuer à protéger les membranes des mitochondries des dommages oxydatifs causés par certains radicaux libres, en empêchant la peroxydation des lipides (Lecerf *et al.*, 2004).

Les variations de la teneur en antioxydants des extraits d'agrumes peuvent être dues à des modifications des paramètres expérimentaux, à savoir la méthode d'extraction, les conditions de récolte, la nature du solvant utilisé et l'intervention d'autres groupes chimiques (Shahidi, 2004)

II.3. Estimation de l'activité antioxydante

II.3.1 Activité scavenging du radical DPPH

Pour évaluer l'efficacité de nos extraits à piéger le radical DPPH, nous avons fait réagir la solution de DPPH fraîchement préparée avec les différents extraits de feuilles d'agrumes. Après 30 minutes d'incubation, nous avons remarqué qu'il y avait une modification de couleur du violet au jaune dans tous les extraits, ce changement de couleur indique la réduction de DPPH[•] et que nos extraits présentent un effet de piégeage du radical DPPH.

L'estimation de l'activité scavenger de nos six extraits est représentée dans la figure 29.

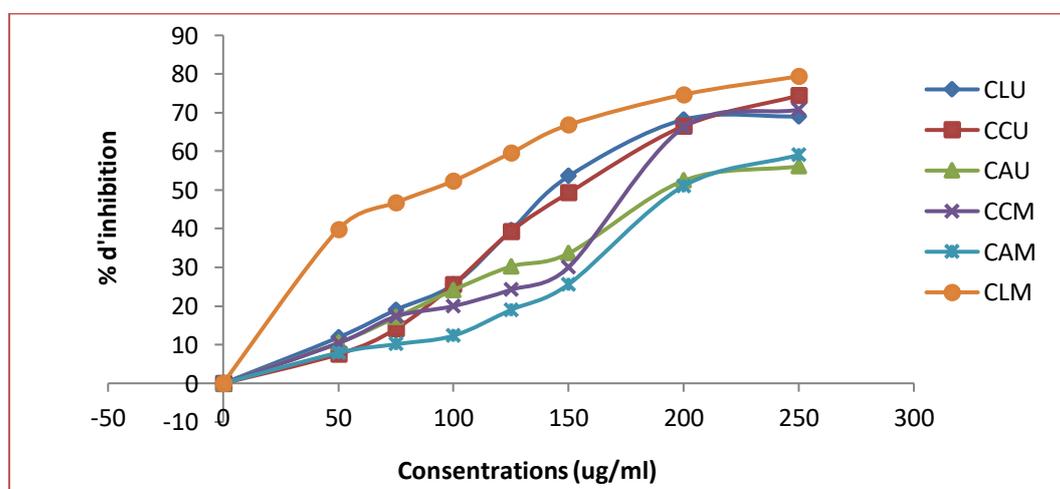


Figure 29 : Courbes d'activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits de *Citrus* obtenus par macération et ultrasons.

Les résultats obtenus montrent que les extraits de feuilles de *C. limon*, *C. clementina* et *C. aurantiifolia* obtenus par macération et ultrason, présentent un pouvoir piègeur du radical DPPH[•] avec des pourcentages variant de 7,52% à 39,82% pour une concentration de 50µg/ml d'extrait. Cette activité reste assez moindre à celle obtenue avec l'acide gallique ou la quercétine qui montrent un pouvoir anti-radicalaire du DPPH[•] dépassant les 70% pour une concentration de 10µg/ml (annexe III.4).

Pour évaluer l'activité antioxydante du radical DPPH[•] des extraits d'agrumes, les IC₅₀ (concentration qui inhibe 50% du radical libre DPPH[•]) ont été calculées par le logiciel Origin 9 version 2022 (tableau VI).

Tableau VI : Concentrations inhibitrices de 50% du radical DPPH[•] des extraits de *Citrus* étudiés.

Extraits de feuilles de <i>Citrus</i>	IC ₅₀ (µg/ml)	
	Macération	Ultrasons
<i>C. clementina</i>	166,6± 11,03	150,7± 9,2
<i>C. aurantiifolia</i>	188,03±5,49	197,6 ± 8,49
<i>C. limon</i>	89,8± 3,84	147,45± 7,57

Les résultats ci-dessus, montrent que l'extrait de *C.limon* présente une meilleure aptitude antioxydante vis-à-vis le radical DPPH[•] avec une concentration inhibitrice de 89,375±3,84 µg/ml pour la macération et 147,45±7,57µg/ml pour l'ultrason, suivi du *C.clementina* avec des concentrations de 150,70± 9,20 µg/ml et 166,60±11,03 µg/ml pour l'extrait obtenu par ultrason et macération respectivement.

L'activité la plus faible a été observée dans l'extrait de *C.aurantiifolia* obtenu par ultrasons qui présente la concentration inhibitrice la plus élevée avec 197,60±8,49 µg/ml.

En général, l'efficacité anti-radicalaire des extraits obtenus par macération est légèrement améliorée par rapport à celle des extraits obtenus par ultrason avec une moyenne de (148µg/ml et 165,25µg/ml) pour les extraits de macération et ultrason respectivement.

Il est à noter qu'IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydant de composé. La IC₅₀ la plus petite évalue la meilleure activité antioxydante d'un composé (Kelebek *et al.*, 2009). Pour la même variété végétale, la variation des résultats de l'activité scavenger du DPPH[•]

entre les extraits de macération et ultrason, peut s'expliquer par le degré de maturation des feuilles mais aussi par la méthode d'extraction appliquée (Xu *et al.*, 2008).

La différence de pouvoir réducteur du radical DPPH[•] par les extraits de différentes espèces de *Citrus* est du possiblement à la variation de composition de ces espèces en antioxydants principalement les composés phénoliques (Pooter et Schamp, 1986), qui sont considérés comme de bons donateurs d'électrons et d'hydrogènes. C'est le cas des espèces de *C.limon* et *C.clementina* qui montrent déjà des teneurs élevées et proches en polyphénols, c'est pour cette raison ils ont présenté les meilleures capacités antioxydantes vis-à-vis le radical DPPH[•].

II.3.2 Test du radical ABTS^{•+}

D'après les résultats obtenus de ce test, on a remarqué qu'il y'a une dégradation de couleur avec l'augmentation des concentrations des extraits. Cette dégradation indique la réduction de l'ABTS^{•+} et que nos extraits présentent un effet scavenger du radical ABTS^{•+}.

Les résultats de l'activité antiradicalaire des extraits de feuilles sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'ABTS^{•+} par rapport aux différentes concentrations des extraits.

L'évaluation de l'activité scavenger de nos six extraits ainsi que celle d'antioxydants de référence utilisés (acide gallique et quercétine) est représentée dans le tableau VII et (annexe III.5) respectivement.

Pour estimer l'activité antioxydante du radical ABTS^{•+} des extraits de *Citrus*, les IC₅₀ (concentration qui inhibe 50% du radical ABTS^{•+}) ont été calculées par le logiciel Origin 9 version 2022 (Tableau VII).

Tableau VII : Activité antioxydante des extraits de feuilles de *Citrus* par le test ABTS.

Extraits	Pourcentage d'inhibition(%) pour 20 µg/ml	IC ₅₀ (µg/ml)
C.C.M	22,86	46,1±0,071
C.C.U	40,88	26,72±1,33
C.L.M	30,19	37,85±4,53
C.L.U	28,78	41,53±3,65
C.A.M	19,86	63,05±1,20
C.A.U	26,41	43,03±1,87

Les résultats obtenus montrent que les extraits de feuilles de *C. limon*, *C. clementina* et *C. aurantiifolia* obtenus par macération et ultrason, présentent un pouvoir piègeur du radical ABTS^{•+} avec des pourcentages variant de 19,86% à 40,88% pour une concentration de 20 µg/ml d'extrait. Cette activité reste assez inférieure à celle obtenue avec l'acide gallique ou la quercétine qui présentent un pouvoir piègeur d'ABTS^{•+} dépassant 60% et 80% pour une concentration de 7µg/ml de la quercétine et l'acide gallique respectivement (annexe III.5).

Le tableau VII montre que l'extrait de *C. clementina* obtenu par ultrason (*CLU*) présente une meilleure capacité antioxydante vis-à-vis le radical ABTS^{•+} avec une concentration inhibitrice de 26,72±1,33µg/ml suivi par l'extrait *C.limon* obtenu par macération (*C.L.M*) avec une IC₅₀ de 37,85±4,53 µg/ml.

L'activité la plus faible a été observée dans l'extrait de *C.aurantifolia* obtenu par macération (*C.A.M*) qui présente la concentration inhibitrice la plus élevée avec 63,05±1,20 µg/ml.

L'activité anti-radicalaire des extraits obtenus par ultrason est légèrement meilleure par rapport à celle des extraits obtenus par macération avec une moyenne de (37,09 µg/ml et 49 µg/ml) pour les extraits de l'ultrason et macération respectivement.

Des travaux montrant que les composés phénoliques spécialement les flavonoïdes sont impliqués dans l'activité anti-radicalaire. **Floegel et al. (2011)** ont montré une relation positive entre l'activité de piégeage du radical cationique ABTS^{•+} et la teneur en composés phénoliques, ce qui est en plein accord avec nos résultats.

Dans le cas de l'extraction par ultrason, l'extrait *C.clementina* présente une meilleure activité anti-radicalaire, cela s'exprime par leur richesse en composés phénoliques (figure 24) notamment les flavonols (figure 27) suivi par *C.limon* et enfin *C.aurantifolia*. Cette dernière a montré la plus faible teneur en phénols totaux et en flavonols, donc une faible activité scavenging du radical ABTS^{•+}.

Bien que les polyphénols soient les composés qui effectuent la majeure partie de l'activité antioxydante, il convient de noter que l'activité antioxydante obtenue peut être affectée par des composés non phénoliques tels que les sucres, les lipides et la chlorophylle. **Heim et al. (2002)** ont montré que les groupes hydroxyles des polyphénols et flavonoïdes jouent un rôle important dans le pouvoir antioxydant.

II.3.3 Test de réduction du fer

Après environ 30 minutes d'incubation de la solution ferricyanure de potassium-extrait, on a remarqué qu'il y'avait un virage de couleur du jaune vers le bleu-vert avec l'augmentation des concentrations des extraits. Ce changement de couleur indique que les antioxydants présents dans les extraits ont réduit le fer ferrique en fer ferreux. L'intensité de la couleur dépend du pouvoir réducteur des composés présents dans le milieu réactionnel (Zou *et al.*, 2004).

Les résultats de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits et celui du standard sont illustrés dans la figure 30.

Pour une même concentration d'extraits obtenus par macération et ultrason (50 µg/ml), l'activité FRAP des extraits de *Citrus* évaluée par le changement des absorbances à 700 nm est clairement inférieure à celle du standard avec l'acide ascorbique. De plus, il est important de noter que l'activité réductrice de fer dépend de la concentration de l'extrait, plus la concentration est élevée plus le pouvoir réducteur augmente.

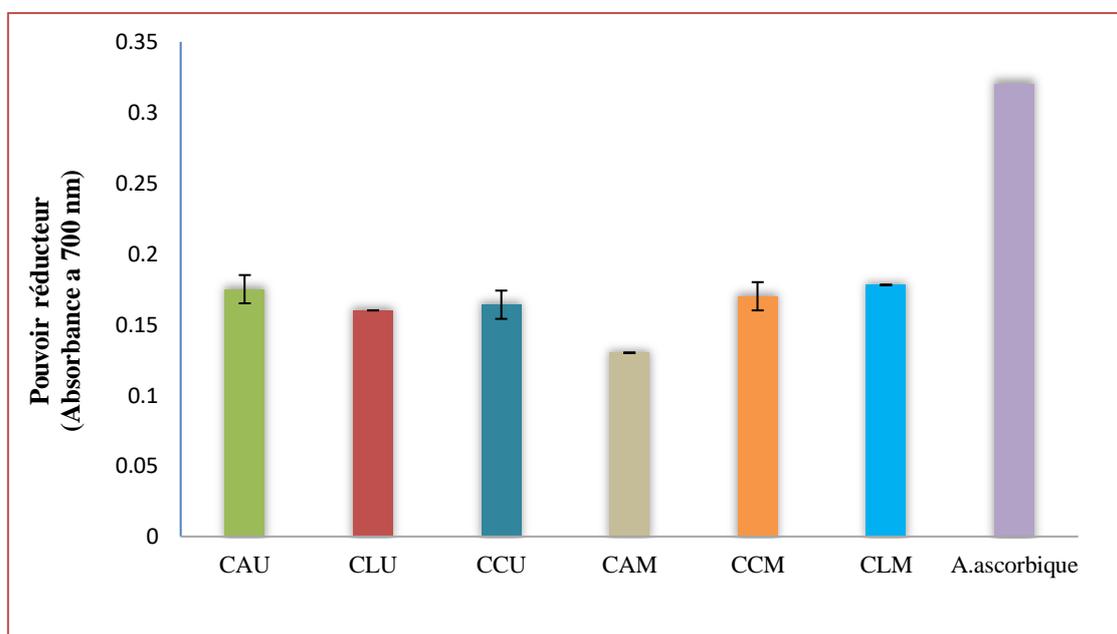


Figure 30 : Potentiel réducteur des extraits de macération et ultrasons des feuilles de *Citrus* à une concentration de 50 µg/ml et du standard (Acide ascorbique) à 10 µg/ml. Les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3). Les barres verticales représentent les écarts types.

Selon les résultats ci-dessus (figure 30), le pouvoir réducteur des extraits de *Citrus* obtenus par macération sont classés comme suite : *C.limon* ($0,178\pm 0,00$) > *C.clementina* ($0,17\pm 0,01$) > *C.aurantiifolia* ($0,13\pm 0,00$). Alors que la capacité réductrice des extraits obtenus par ultrason montre que *C.aurantiifolia* a le pouvoir le plus grand ($0,175\pm 0,01$) suivi par *C.clementina* ($0,164\pm 0,01$) et enfin *C.limon* avec ($0,16\pm 0,00$).

La capacité réductrice peut-être due à la nature des antioxydants présents dans chaque extrait, au lieu et au moment de la récolte, aux facteurs environnementaux, aux conditions et méthodes d'extraction et à la polarité du solvant utilisé.

II.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne des différents extraits obtenus par ultrason et macération sont déterminées par la technique de diffusion sur gélose Muller-Hinton, qui a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de six souches bactériennes.

La souche cible sera qualifiée de résistante (-) pour les diamètres moins de 8 mm, sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm (Himed, 2014).

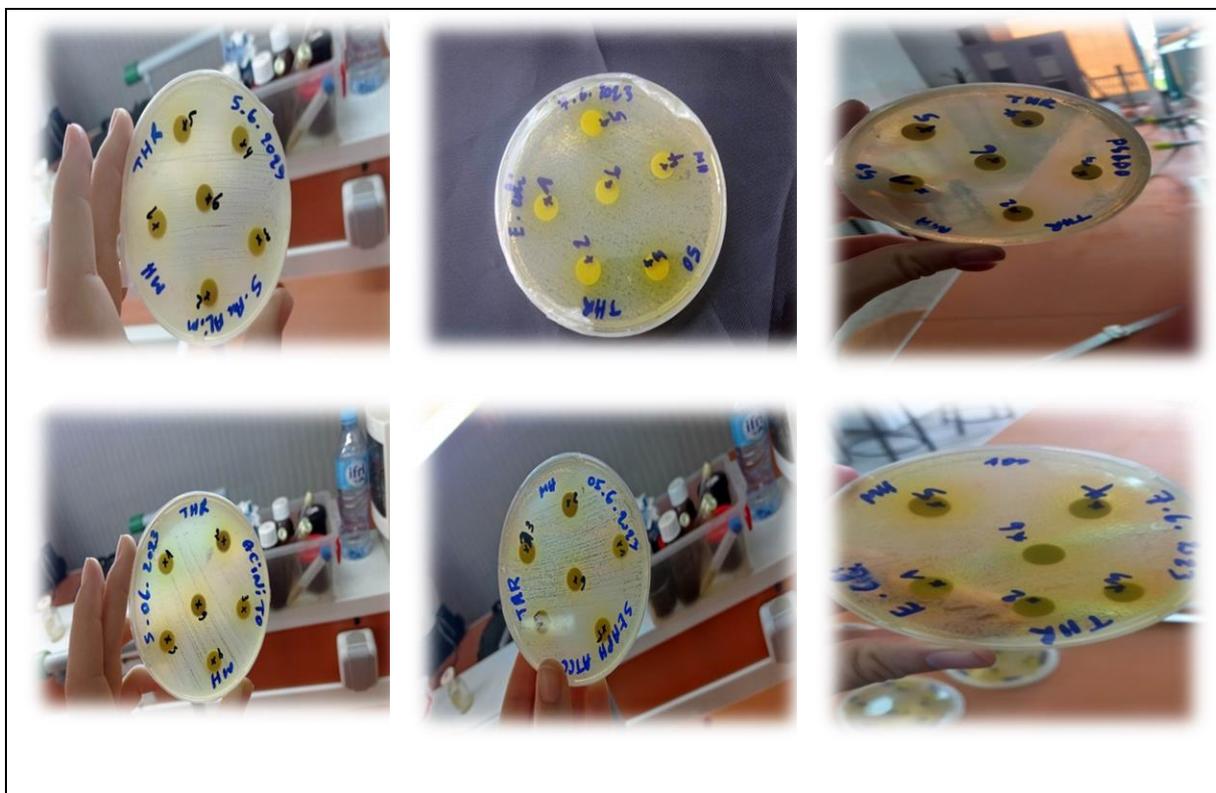


Figure 31: Activité antimicrobienne des extraits de feuilles d'agrumes après 24h d'incubation.

D'après les résultats montrés dans la figure 31, aucune zone d'inhibition n'est apparue sur les six boîtes de pétri.

Les extraits des feuilles d'agrumes testés (*C.L.M*, *C.C.M*, *C.A.M*, *C.L.U*, *C.C.U*, et *C.A.U*) n'ont donc pas d'effets sur les souches bactériennes.

Des études ont montré que les polyphénols et flavonoïdes présents dans les extraits de feuilles, sont capables de se lier à certaines protéines et enzymes de la bactérie en altérant l'équilibre enzymatique, du fait de leur richesse en groupements phénoliques (**Ozawa *et al.*, 1987**), et comme la cible principale de ces composés naturels est la membrane bactérienne des germes, ils rendent la membrane perméable, effet précurseur de leur mort (**Rhayour, 2002**).

L'absence des zones d'inhibition autour des disques indique que les bactéries n'ont pas subi de lyse cellulaire, ce qui signifie que les principes actifs présents dans nos extraits peuvent ne pas avoir été immobilisés sur la membrane bactérienne, ou qu'ils peuvent ne pas être présents en quantité suffisante pour provoquer la mort bactérienne.

Le manque d'activité de nos extraits peut être dû à plusieurs facteurs, notamment au fait que nos extraits n'ont pas eu d'effet sur les souches étudiées, ou que le milieu gélosé utilisé ne permettait pas une bonne diffusion des molécules bioactives contenues dans nos extraits.

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion et perspectives

Les agrumes sont une précieuse source de nutriments qui aident au bon fonctionnement de notre corps grâce aux substances bioactives qu'ils contiennent.

Cette étude a pour objectif d'effectuer une évaluation qualitative et quantitative de différentes classes de composés phénoliques dans les feuilles de trois variétés de *Citrus* récoltées dans la Wilaya de Béjaïa. Nous avons également étudié leur activité antioxydante et antimicrobienne.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé l'extraction par macération à température ambiante et sous agitation ainsi que l'extraction assistée par ultrasons en utilisant de l'éthanol comme solvant. Nous avons observé que l'extrait de *Citrus limon* présente le meilleur rendement d'extraction quelle que soit la méthode d'extraction utilisée.

Les différents données obtenues ont révélé la présence de diverses catégories de composés phénoliques ainsi que de composés liposolubles dans les extraits de feuilles de *Citrus*. Les taux de ces composés varient d'un extrait à l'autre, cela signifie que la méthode d'extraction affecte progressivement leur concentration.

La mesure de la capacité antioxydante de nos extraits de feuilles par les techniques de DPPH, ABTS et FRAP a montré une dépendance à la méthode d'extraction. Ainsi, pour chaque test, un extrait s'est révélé supérieur aux autres en terme de pouvoir antioxydant.

Pour l'évaluation des pouvoirs antibactériens, aucun des six extraits n'a montré d'effet sur les souches bactériennes testées, malgré les différentes concentrations utilisées.

En résumé, cette étude révèle que les feuilles de *Citrus limon*, *Citrus aurantifolia* et *Citrus clementina* sont d'excellentes sources de composés phénoliques avec une bonne capacité antioxydante. Ces composés pourraient potentiellement être utilisés comme alternatives à la conservation des aliments, ou dans le domaine pharmacologique pour se protéger contre les radicaux libres qui conduisent au développement de diverses pathologies.

Il convient de souligner que la majorité des recherches sur les propriétés biologiques (activité antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire et antidiabétique) des feuilles d'agrumes sont également préliminaires et demandent des études plus poussées *in vitro* ou

encore *in vivo*. De plus, l'usage des feuilles d'agrumes à des fins curatives doit être encadré par des spécialistes de la santé, étant donné que la concentration et la préparation des extraits peuvent changer et nécessitent une utilisation adéquate.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- **Abd Ghafar, M.F., Nagendra, M., Prasad, K., Weng, K.K., & Ismail, A. (2010).** Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from *Citrus* species. *Af J Biotechnol*, 9 (3): 326-330.
- **Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. (2004).** Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem*, 84: 551-562.
- **Arias, B. A. & Ramon-Laca, L. (2005).** Pharmacological properties of *Citrus* and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 89-95.
- **Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994).** Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *BI J Pharm*, 49: 462-468.
- **Aubert, B., & Vullin, G. (1997).** Pépinières et plantations d'agrumes. Editions Quae.
- **Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- **Barros, L., Ferreira, M.J., Queiros, B., Ferreira, I.C.F.R. & Baptista, P. (2007).** Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 103, 413–419.
- **Baudin, B. (2020).** Stress oxydant et protections antioxydantes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2020 (522), 22-30.
- **Bayr, H. (2005).** Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33, S498-S50.
- **Bessesen, D.H. (2001).** The Role of Carbohydrates in Insulin Resistance. *Journal of Nutrition* (2001)131: 2782S – 2786S.
- **Bolou G.E.K, Attioua B., N'Guessan A.C., CoulibalyA., N'Guessan J.D., Djaman A.J. (2011).** Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* ; *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liégé* ; 80 : 772-790.
- **Bossokpi, I.P.L. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloides* LAM (*Rutaceae*). Thèse de pharmacie, Bamako, pp: 133.

- **Bousbia, N. (2011).** Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaires (Doctoral dissertation). p. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique p31-p54.
- **Bozin B., Mimica-dukic N., Samojlik I. et Igić R. (2008).** Phenolic as antioxidant in garlic (*Allium sativum* L., *Alliaceae*). Food Chemistry, 111(4), 925-929.
- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol, 28: 25-30.
- **Burak M & Imen Y (1999).** Flavonoids and their antioxidant properties. Turkiye Klin Tip Bil Derg 19, 296-304.
- **Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, AG., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.L., Sauvaigo, S. (2002).** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. Biol. Chem. 383 : 933–943.
- **Caggia, C., Palmeri, R., Russo, N., Timpone, R., Randazzo, C. L., Todaro, A., & Barbagallo, S. (2020).** Employ of *Citrus* by-product as fat replacer ingredient for bakery confectionery products. Frontiers in Nutrition, 7, 46.
- **Camille Migdal, Mireille Serres (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. Université Lyon 1, EA 41-69, laboratoire de recherche dermatologique, pavillon R, Hôpital Édouard Herriot, 69437 Lyon Cedex 03, France.
- **Catalano, L., Franco, I., De Nobili, M., & Eita, L. (1999).** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. Agrochimica, 43: 193-205.
- **Chainani-Wu N. Diet and oral (2002).** Pharyngeal, and esophageal cancer. Nutr Cancer. 2002; 44:104-126.
- **Chemat, F., Huma, Z., Khan, M.K. (2011).** Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry. 18, 813-835.
- **De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A. (1999).** Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. Biochem Syst Ecol 1999; 27:445-59.
- **De Pooter, H.L., & Schamp, N. (1986).** Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In: Progress in essential oil research. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin, pp: 139-150.

- **Dionne, S. D., Yammarino, F. J., Atwater, L. E., & James, L. R. (2002).** Neutralizing substitutes for leadership theory: Leadership effects and common-source bias. *Journal of applied psychology*, 87(3), 454.
- **DSA. (2021).** Document fourni par la direction des services agricoles de Bouira.
- **Escartin I. (2011).** Guide des agrumes. Fondation d'entreprise pour la protection Et la valorisation du patrimoine végétal. L'Institut Klorane.p.3-p.13
- **Essadik, F., Habsaoui, A., Kribii, A., Ounine, K., Kribii, A., & Rifi, H. (2014).** Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits des oranges amères (*Citrus aurantium* L.). Proceedings of « Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué », Rabat, 17-18
- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biol*, 331: 372-379.
- **FAO.(2020).** *Citrus* Fruit Fresh and Processed Statistical Bulletin 2020. <https://www.fao.org/search/fr/>.
- **FAOSTAT. (2021).** Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://fao.org>.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.
- **Floegel, A., Kim, D., Chung, S., Koo, S.I., & Chun, O.K. (2011).** Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Comp Anal*, 24: 1043-1048.
- **Ganga A.A. and Mosase K.W. (2001).** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*, 107-113 (2001).
- **Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, J.M. (2005).** Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*, 53: 1370-1373.
- **Ghédira, K., et Goetz, P. (2015).** *Citrus aurantium* L. var. amara Link. *Phytothérapie*, 13(5), 320-327. Doi : 10.1007/s10298-015-0983-6.
- **Gollouin F., Tone IliN. (2013).** Des fruits et des graines comestibles du monde entier. Edition Brigitte Peyrot Poos, Paris Lavoisier SAS.PP. 186-195.

- **Hachemaoui, K. et Oumbiche, N. (2013).** Activités antioxydante et antibactérienne des polyphénols des feuilles de *Citrus reticulata blanco* (mandarine).
- **Hadrich, B., Dahak, K., Abdenouri, N., & Kechaou, N. (2008).** Etude de séchage des feuilles de bigaradier. *Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08 Alger*, pp: 145-149.
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62 :10 : 628-638.
- **Hamia C, Guergab A, Rennane NE, Birache M, Haddad M, Saidi M, Yousfi M. (2014).** Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressium*. *Annales des Sciences et Technologie*, 6(1) : 33-39
- **Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., & Xia, W. (2009).** Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from *Citrus* mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*. *Sep Sci Technol*, 70: 63-70.
- **Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., & Bobilya D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship; *J Nutr Biochem*, 13: 572-584.
- **Himed L., Merniz S., Bnbraham M. (2014).** Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation. *Algerian Journal of Natural Products*. Algeria
- **Hong, J.H., Kim, M.J., Park, M.R., Kwag, O.G., Lee, I.S., Byun, B.H., Lee, S.C., Lee, K.B., Rhee, S.J. (2004).** Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin. Chim. Acta*. 340 : 107-115.
- **Hulbert, A.J. (2005).** On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J. Theor. Biol.* 234: 277-288.
- **Iwashina T (2013).** Flavonoid properties of five families newly incorporated into the order Caryophyllales (Review). *Bull Natl Mus Nat Sci* 39, 25-51.
- **Kelebek H., Selli S., Canbas A. et Cabaroglu T. (2009).** HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish. *Cv. Microchemical Journal*, 91: 187–192.
- **Kerboua M., (2001).** L'agrumiculture en Algérie. *Proceeding of the Mediterranean research network on certification of Citrus (MNCC): 1998- 2001.*
- **Khefifi, H. S. (2015).** Etudes physiologiques et génétiques de caractères morpho-physicochimiques des fruits d'agrumes au cours de la maturation jusqu'à l'abscission. Montpellier. France. pp18-31.

- **Khettal, B., Kadri, N., Tighilet, K., Adjebli, A., Dahmoune, F., & Maiza-Benabdeslam, F. (2017).** Phenolic compounds from *Citrus* leaves: antioxidant activity and enzymatic browning inhibition. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 14(1).
- **Kim, D. k., Lee, C.Y. (2004).** Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 253–273.
- **Koechlin, K. (2006).** *Nutrition Clinique et Métabolisme* Volume 20, Issue 4, Pages 165-17.
- **Lien, E., T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls & J. D. Radolf (1999).** Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 33419-33425.
- **Liu, Y., Heying, E., et Tanumihardjo, S. A. (2012).** History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive reviews in Food Science and Food safety*, 11(6), 530-545. Doi: 10.1111.
- **Loussert R., (1985).** Les agrumes. Paris, France, J.B.Bailliere.136pp.
- **Loussert R.,(1989).** Les agrumes arboriculture. Ed. Technique agricoles méditerranéennes, Paris, 113 p.
- **M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., Ghoul, M. (2015).** Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioproducts Processing*. 96, 161-170.
- **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Sarni-Manchado, P. (2006).** Composés phénoliques dans la plante. Structure, biosynthèse, répartition et rôles. Les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC. Lavoisier. Paris. 390-399.
- **Maisuthisakul, P., R. Pongsawatmanit & M. H. Gordon (2007).** Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw. *Food Chemistry*, 100, 1620-1629.
- **Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., & Andoh, T. (1999).** Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *J Agric Food Chem*, 47: 1749-1754.

- **Maurice N. (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle Ed. Lavoisier; Paris; p. 12-14.
- **Menichini, F., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Conforti, F., De Luca, D., Statti, G.A., Cindio, B., Menichini, F., & Tundis, R. (2011).** Phytochemical profile, antioxidant, antiinflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food Chem Toxicol*, 49: 1549-1555.
- **Millet, F. (2014).** Huiles essentielles et essence de citronnier (*Citrus limon* (L.) Burm. f.). *Phytothérapie*, 12(2), 89-97.
- **Moore, G. A. (2001).** Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *TRENDS in Genetics*, 17(9), 536-540.
- **Mothana R.A.A., Lindequist U. (2005).** Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra; *Journal of Ethno pharmacology*; (96): 177–181.
- **Muanda, F. N. (2010).** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat en Chimie organique. Ecole doctorale SESAMES Université Paul Verlaine-Metz, 294.
- **Mutahar S, S., Mutlag M, A. O., & Najeeb S, A. Z. (2012).** Antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Food and Nutrition Sciences*, 2012.
- **Muthiah, P., Umamaheswari, M., & Asokkumar, K. (2012).** *In vitro* antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of *Citrus*. *Int J Phytol*, 2: 13-20.
- **Mutin G. (1977).** La Mitidja. Décolonisation et espace géographique .Ed. Office presse anniversaire, Alger ,607p.
- **Niu, Y. H., Wang, L., Wan, X. G., Peng, Q. Z., Huang, Q., & Shi, Z. H. (2021).** A systematic review of soil erosion in *Citrus* orchards worldwide. *CATENA*, 206, 105558.
- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nut*, 44: 307-315.
- **Ozawa T., Lilley T.H. & Haslam E. (1987).** Polyphenol interactions: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit, *Phytochemistry*. Vol. 26 (11), 2937-2942.
- **P. B. Raja, A. A. Rahim, A. K. Qureshi, et K. Awang. (2014).** « Green synthesis of silver nanoparticles using tannins », *Mater. Sci.-Pol.*, vol. 32, no 3, p. 408–413.
- **Pamplona, R., Portero. Otin, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A., Barja, G. (2000).** Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech. Ageing. Dev.* 112: 169-183.

- **Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016).** Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- **Pastre, J. (2005).** Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat d'université : Vétérinaire. Université de Paul-Sabatier-Toulouse.116.
- **Paul, A., & Cox, P. A. (1995).** An Ethnobotanical survey of the uses for *Citrus aurantium* (*Rutaceae*) in Haiti. *Economic Botany*, 49(3), 249.
- **Pierangeli G. Vital., Windell L. Rivera. (2009).** Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. *J. Medicinal Plants Res*, 3(7): 511-518.
- **Pincemail, J. (1998).** Espèces oxygénées en médecine humaine: une approche didactique. *Vaisseaux. Cœur. Poumon*. 3 : 133–8.
- **Praloran, J.C. (1971).** Les agrumes, Maisonneuve G.P., Larose, Paris.
- **Rahmouni M, et Yaiche H. (2014).** Activité antioxydante et antibactérienne des extraits des feuilles et des écorces de *Citrus reticulata* et *Citrus clementina*.
- **Rapisarda, P., Bianco, M. L., Pannuzzo, P., & Timpanaro, N. (2008).** Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Postharvest biology and technology*, 49(3), 348-354.
- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26: 1231-1237.
- **Rebour H. (1948).** La culture des agrumes en Algérie. Documents Algériens. Série économique. Agrumiculture. N°49, 4P.
- **Rentzsch, M., Wilkens, A., & Winterhalter, P. (2009).** Non-flavonoid phenolic compounds. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 509-527). Springer, New York, NY.
- **Rhayour K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de doctorat en biologie. Université de Sidi Mohamed Ben Abdellah, Maroc. 158p.
- **Rosler, K.-H. A., Wong, D. P. C., et Mabry, T. J. (1985).** Problems with Ultraviolet Spectroscopy of Flavonoids Using Sodium Acetate in Methanol. *Journal of Natural Products*, 48(5), 837-840.

- **Ryan, L. (2013).** Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *International journal of food*.
- **Schauenberg P., Paris F. (2006).** Guide des plantes médicinales. Ed. Dalachaux et Nieslé .Paris. 330 p.
- **Shohaib. T, Shafique M., Dhanya N, Madhu C. Divakar. (2011).** Importance of flavonoides in therapeutics; *Hygeia Journal for Drugs and Medicines (J.D.M)*; 3 (1): 1-18.
- **Sieniawska, E., & Baj, T. (2017).** Tannins. *Pharmacognosy*, 199–232.
- **Singleton, V., & Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticulture*, 16: 144-158.
- **Stahl W, Sies H. (2005).** Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta* , May 30;1740(2):101-7.
- **Tessier, F., & Marconnet, P. (1995).** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & sports*, 10(1), 1-13.
- **Tighilet karim. (2013).** Effets antioxydants et anti-enzymes du brunissement des extraits de feuilles de *Citrus*.
- **Tighilet, K., & Khettal, B. (2014).** Effets antioxydants et anti-enzymes du brunissement des extraits de feuilles de *Citrus*. Thèse de magister. Université de Bejaia.
- **Tighilet, K., Palacios, F., Khettal, B., & de los Santos J. (2022).** GC-MS and LC-QTOF-MS Phytochemical analysis, antiproliferative and antioxidant activities of stems extracts of *Retama monosperma* grown in Algeria. *Research Journal of Biotechnology*, 17(2).
- **Uchiyama S, Sumida T, Yamaguchi M. (2004).** Oral administration of beta-cryptoxanthin induces anabolic effects on bone components in the femoral tissues of rats in *vivo*. *Biol Pharm Bull* February; 27(2):232-5.
- **Van den Berg, R., Haenen, G.R., van den Berg, H., & Bast, A. (1999).** Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem*, 66: 511-517.
- **Wang, Y.C., Chuang, Y.C., & Ku, Y.H. (2007).** Quantitation of bioactive compounds in citrus fruit cultivated in Taiwan. *Food Chem*, 102: 1163-1171.
- **Webber H.J., Reuther W et Batchelor L.D. (1967)** .The *Citrus* Industry, volume 1: History, world distribution, botany and varieties. Edition. University of California Press.

- **Whitman C Stewart., Elzbieta M Kurowska., John A Manthey, Alan Daugherty Kurowska EM. (2005).** Nobiletin, a *Citrus* flavonoid isolated from tangerines, selectively inhibits class A scavenger receptor-mediated metabolism of acetylated LDL by mouse macrophages. *Atherosclerosis*, January; 178(1):25-32.
- **Xu, G., Ye, X., Liu, D., Ma, Y., & Chen, J. (2008).** Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort. ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuoyou) during maturity. *J Food Comp Anal*, 21(5): 382-389.
- **Y. Shirmohammadli, D. Efhamisisi, et A. Pizzi. (2018).** « Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review », *Ind. Crops Prod.*, vol. 126, p. 316– 332.
- **Youn, J.-Y., Siu, K. L., Lob, H. E., Itani, H., Harrison, D. G. & Cai, H. (2014).** Role of vascular oxidative stress in obesity and metabolic syndrome. *Diabetes*, 63, 2344-2355.
- **Zeghad N. (2009).** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne; Mémoire de magister; Option du Biotechnologie végétale ; Université Mentouri Constantine ; pp 84.
- **Zou, Y., Lu, Y., & Wei, D. (2004).** Antioxidant activity of a flavonoid rich extract of *Hypericum perforatum* L. *In vitro*. *J Agric Food Chem*, 52: 5032-5039.

Annexes

Annexe I : Matériels non biologique

Appareillage	Verreries et autres	Réactifs et solutions
Etuve d'incubation	Béchers	Ethanol et Méthanol
Balance de précision.	Entonnoir	Carbonate de sodium (Na_2CO_3)
Réfrigérant	Éprouvette graduée	Trichlorure d'aluminium (AlCl_3)
Spectrophotomètre	Fioles	Acide 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ($\text{ABTS}^{\cdot+}$)
Moulin à café	Tubes à essais	Quercétine, Acide gallique
Bain marie	Barreau magnétique	Folin-Ciocalteu (0.1N)
Tamiseur	Portoir à tubes	Persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$)
Autoclave	Spatule	2,2-diphényle-1- picrylhydrazyl (DPPH)
pH mètre	Pipettes graduées	Acide Ascorbique
Agitateur	Boîtes de pétri	Acétate de sodium ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)
Bain ultrasons	Ecouvillons	Chlorure ferrique (FeCl_3)
Plaque chauffante	Pipettes Pasteur	Ferricyanure de potassium ($\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$)
Plaque agitatrice		Acide trichloracétique TCA ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$)
		Diméthyle sulfoxyde (DMSO)



Figure: Bain marie.

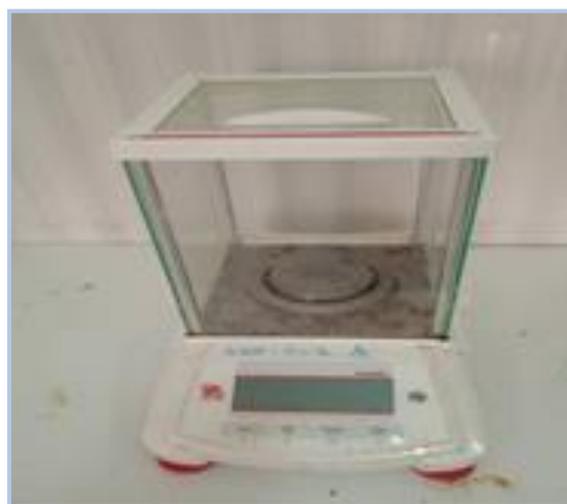


Figure: Balance de precision.



Figure : Spectrophotomètre UV/Vis.



Figure: Etuve de séchage microbologique.

Annexe II : Préparation des solutions

+ Solution de l'acide gallique

- Dissoudre 1 mg d'acide gallique dans un volume de 1 ml d'éthanol à 70%.

+ Solution de Carbonate de sodium à 6%

- Dissoudre 6g de Na_2CO_3 dans 100 ml de l'eau distillée.

+ Solution de Folin-Ciocalteu à 0,1N

- Ajouter 5 ml du réactif Folin-Ciocalteu dans 45 ml d'eau distillée.

+ Solution de Quercétine

- Dissoudre 1 mg de quercétine dans 1ml d'éthanol 70%.

+ Solution de Trichlorure d'aluminium à 2%

- Dissoudre 2g d' AlCl_3 dans 100 ml de l'eau distillée.

+ Solution d'acétate de sodium à 5%

- Dissoudre 5g d'acétate de sodium dans 100ml de l'eau distillée

+ Solution de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à 1%

- Dissoudre 1g de ferricyanure de potassium dans 100ml de l'eau distillée

+ Solution d'acide trichloracétique à 10%.

- Dissoudre 10g d'acide trichloracétique dans 100ml de l'eau distillée

+ Solution radical ABTS^{•+}

- Mélanger une solution de 7 mM d'ABTS (36mg ABTS en poudre + 10ml eau distillée) avec une solution de 2,5 mM du persulfate de potassium ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$) (6,6mg du persulfate + 10ml eau distillée). La solution ABTS^{•+} a ensuite été stockée à l'abri de la

lumière et à température ambiante pendant 16 heures, puis diluée avec de l'eau distillée pour obtenir une DO de $0,700 \pm 0,02$ à 734 nm.

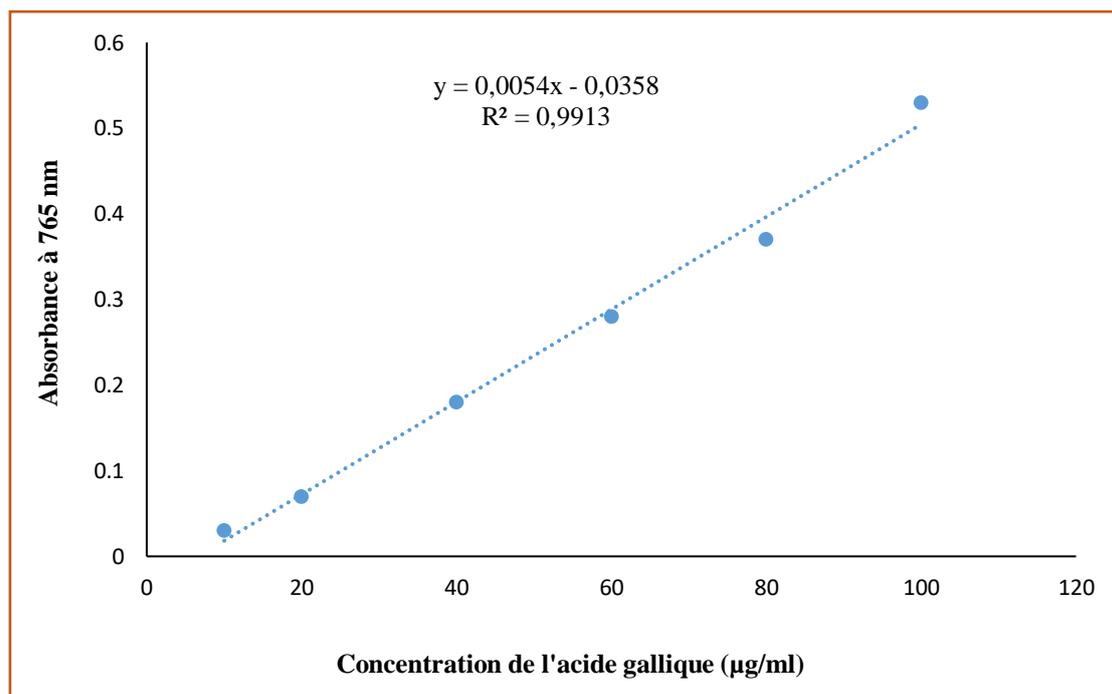
✚ Solution de DPPH

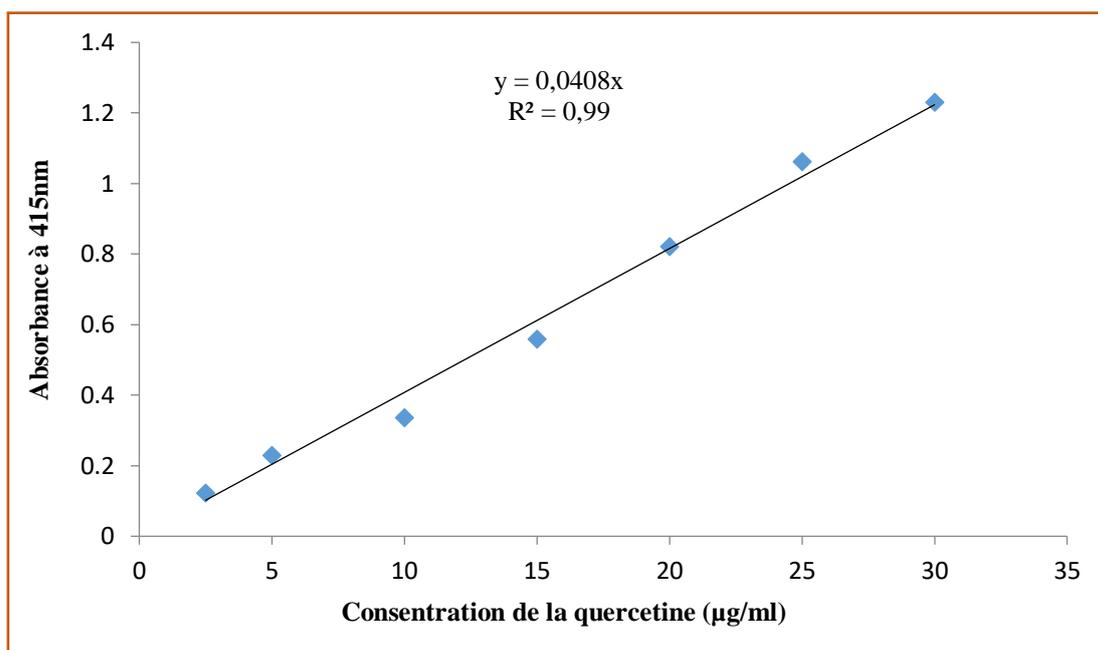
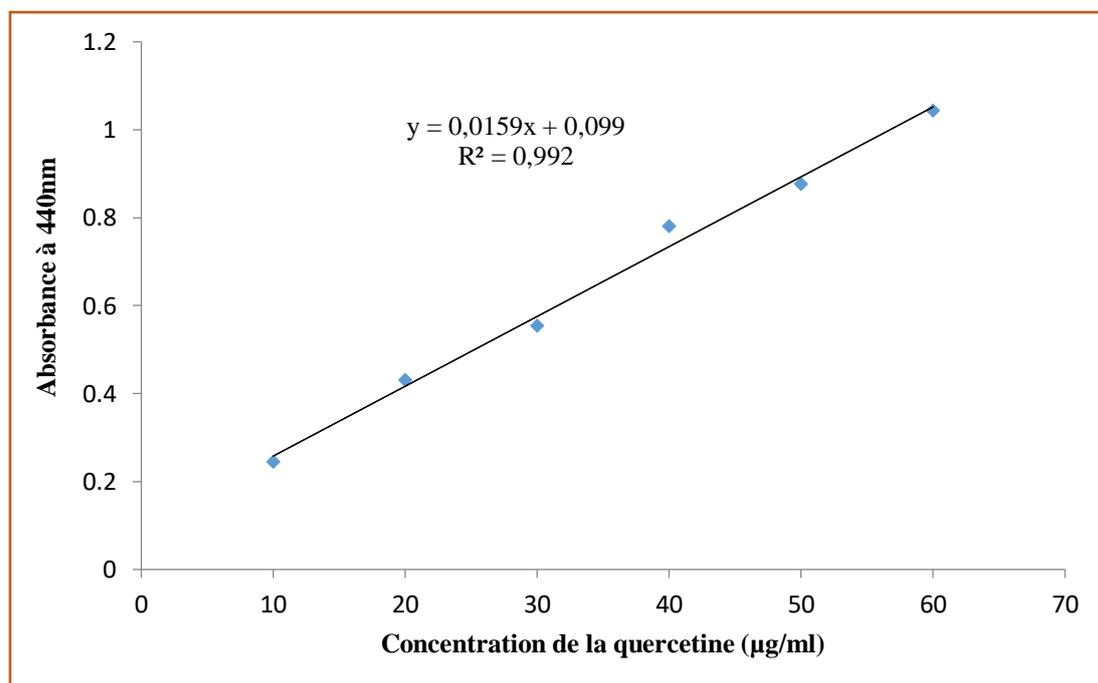
- Mélanger dans un Bécher 2.4 mg de DPPH avec 100 ml de méthanol. Le mélange est maintenu sous agitation continue pendant une heure après enrobage par le papier aluminium.

✚ Solution tampon phosphate à pH=6,6

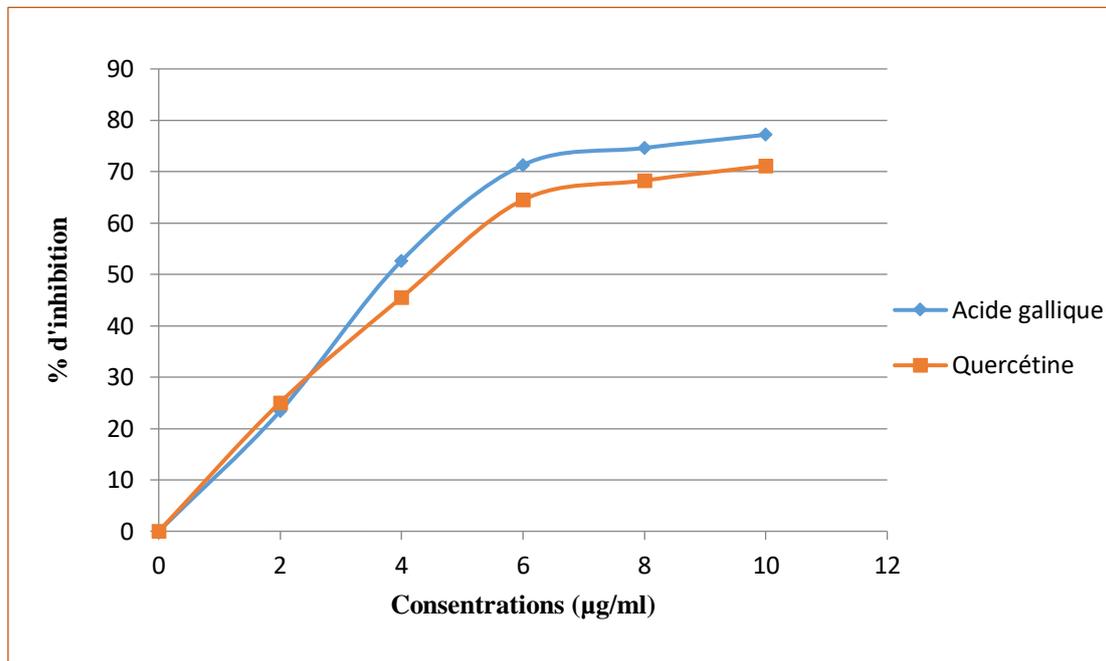
- Solution de di-hydrogénophosphate de potassium NaH_2PO_4 : 2,4 g/100 ml d'eau distillée.
- Solution de di-sodium hydrogénophosphate : Na_2HPO_4 : 2,84 g/100 ml d'eau distillée.
- Mélanger 50 ml Na_2HPO_4 avec 50 ml NaH_2PO_4 , jusqu'à 6,6.

Annexe III.1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.

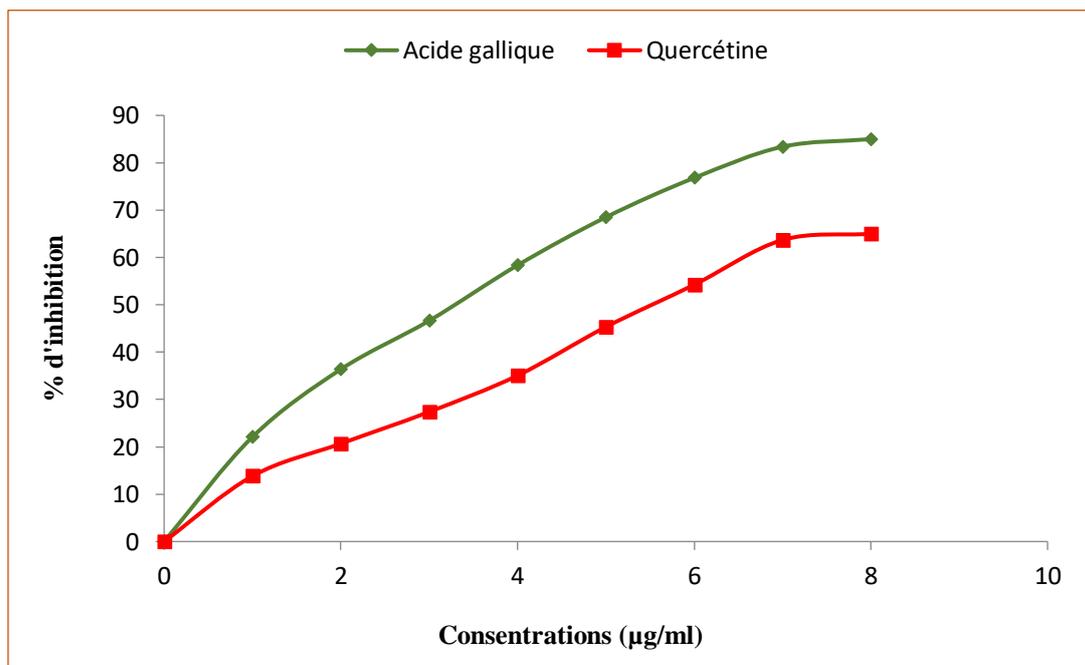


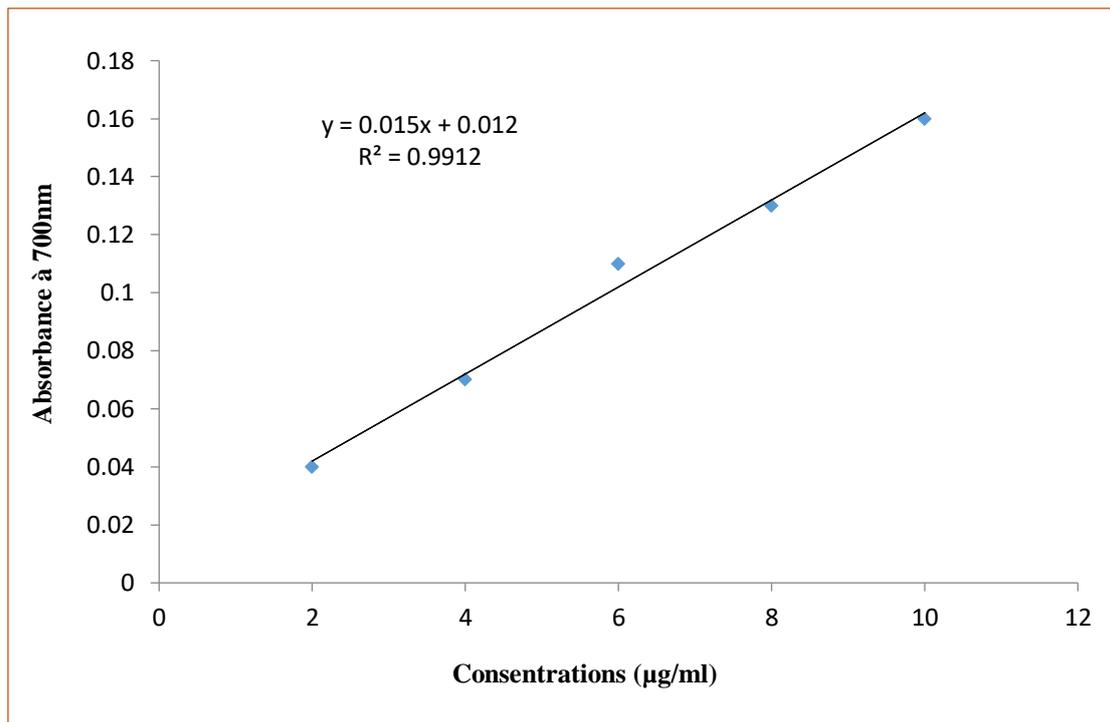
Annexe III.2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.**Annexe III.3 :** Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonols.

Annexe III.4 : Courbe d'activité scavenging du radical DPPH des standards (Quercétine et l'Acide Gallique).



Annexe III.5 : Courbe d'activité scavenging du radical ABTS des standards (Quercétine et l'Acide Gallique).



Annexe III.6 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique pour le pouvoir réducteur.**Annexe IV :** Préparation des milieux de culture.**+ Gélose nutritive**

- Dissoudre 28g de poudre de la gélose nutritive dans un litre d'eau distillée.
- Faire bouillir avec agitation jusqu'à la dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

+ Milieu Muller-Hinton

- Dissoudre 38g de la poudre MH dans un litre d'eau distillée.
- Faire bouillir avec agitation jusqu'à la dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

Annexe V : Souches bactériennes cibles.

	Souche cible	ATCC	pathogénicité	Antibiorésistance
S ₁	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 6633	Pathogène	Imipenème, Amikacine
S ₂	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 610	Pathogène	β lactame, Imipenème, Amikacine
S ₃	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline (SARM)	ATCC 43300	Pathogène	Méticilline
S ₄	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Clinical Sample	Pathogène	Oxacilline, erythromycine, clindamycine et mupirocine
S ₅	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souche de laboratoire	Pathogène (Pneumonie)	Quinolones, piperacilline-tazobactam
S ₆	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Pathogène	Béta-lactames

Résumé

Les agrumes, parmi les plantes qui occupent une place très importante que ce soit au niveau mondial ou en Algérie. Ils ont servi de pharmacothèque naturelle pour l'homme, en vu de leurs propriétés thérapeutiques. Dans notre travail, les extraits éthanoliques des feuilles de *C. limon*, *C. clementina* et *C. aurantiifolia* obtenus par deux méthodes différentes à savoir la macération et l'ultrason ont été étudiés pour déterminer leur contenu en substances bioactives. En premier lieu, une étude quantitative a été réalisée, par un dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux, flavonoïdes et flavonols) et des pigments liposolubles des extraits de feuilles de trois espèces de *Citrus*. Ainsi que, l'évaluation de leurs activités antioxydantes (effet scavenger du radical DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur) et antibactériennes par la méthode de diffusion des disques. D'après les résultats obtenus, les extraits de *Citrus clementina* sont les plus riches en polyphénols quelle que soit la méthode d'extraction utilisée. Tandis que l'extrait obtenu par ultrason de cette espèce est le plus riche en flavonols contrairement à la macération. Les extraits de *Citrus aurantiifolia* enregistrent la teneur la plus élevée en flavonoïdes pour les deux méthodes d'extractions. Concernant le dosage des composés liposolubles dans les feuilles de *Citrus* étudiées, a montré que la chlorophylle (a) est le composé le plus dominant dans les trois espèces par rapport aux autres pigments. Les résultats de l'activité antioxydante indiquent que le pouvoir antioxydant diffère d'un test à un autre et il dépend de la méthode d'extraction appliquée. Enfin, l'activité antibactérienne s'est avérée négative pour toutes les espèces et avec toutes les souches bactériennes testées, cela peut être due à l'inefficacité des composés bioactifs de nos extraits vis-à-vis les bactéries.

Mots clés : *Citrus*, activité antioxydante, composés phénoliques, activité antibactérienne.

Summary

Citrus is one of the most important plants in the world, as well as in Algeria. They have served as a natural pharmacotherapeutic for mankind, thanks to their therapeutic properties. In our work, ethanolic extracts of *C. limon*, *C. clementina* and *C. aurantiifolia* leaves obtained by two different methods, namely maceration and ultrasound, were studied to determine their content in bioactive substances. Firstly, a quantitative study was carried out, by assaying phenolic compounds (total polyphenols, flavonoids and flavonols) and fat-soluble pigments in leaf extracts from three *Citrus* species. Their antioxidant (DPPH radical scavenger effect, ABTS and reducing power) and antibacterial activities were assessed using the disk diffusion method. According to the results obtained, *Citrus clementina* extracts are the richest in polyphenols whatever the extraction method used. In contrast to maceration, the extract obtained by ultrasound from this species is the richest in flavonols. Extracts from *Citrus aurantiifolia* recorded the highest flavonoid content for both extraction methods. The analysis of fat-soluble compounds in *Citrus* leaves showed that chlorophyll (a) was the most dominant compound in all three species, compared with other pigments. Antioxidant activity results indicate that antioxidant power differs from one test to another and depends on the extraction method applied. Finally, antibacterial activity was negative for all species and with all bacterial strains tested, which may be due to the ineffectiveness of the bioactive compounds in our extracts against bacteria.

Key words: *Citrus*, antioxidant activity, phenolic compounds, antibacterial activity.

ملخص

الحمضيات، من بين النباتات التي تحتل مكانة مهمة للغاية سواء على المستوى العالمي أو في الجزائر. تم استخدامها كأدوية طبيعية للإنسان، نظرًا لخصائصها العلاجية. في عملنا، تمت دراسة المستخلصات الإيثانولية لأوراق *C. limon* و *C. clementina* و *C. aurantiifolia* التي تم الحصول عليها بطريقتين مختلفتين: النقع والموجات فوق الصوتية لتحديد محتواها في المواد النشطة بيولوجيًا. أولاً، تم إجراء دراسة كمية، عن طريق تحديد المركبات الفينولية (إجمالي البوليفينول والفلافونويد والفلافونول) والأصبغ القابلة للذوبان في الدهون لمستخلصات أوراق ثلاثة أنواع من الحمضيات. أيضاً، تقييم أنشطتها المضادة للأكسدة (تأثير DPPH الجذري و ABTS والقدرة الاختزالية) ومضادات البكتيريا بطريقة انتشار الأقراص. بناءً على النتائج التي تم الحصول عليها، فإن مستخلصات الحمضيات كليمنتينا هي الأغنى في البوليفينول بغض النظر عن طريقة الاستخراج المستخدمة. في حين أن المستخلص الذي تم الحصول عليه عن طريق الموجات فوق الصوتية لهذا النوع هو الأغنى في الفلافونول على عكس النقع. تحتوي مستخلصات الحمضيات *C. aurantiifolia* على أعلى محتوى من الفلافونويد لكلا طريقتي الاستخراج. فيما يتعلق بتحديد المركبات القابلة للذوبان في الدهون في أوراق الحمضيات المدروسة، أظهر أن الكلوروفيل (أ) هو المركب الأكثر انتشاراً في الأنواع الثلاثة مقارنة بالأصبغ الأخرى. تشير نتائج النشاط المضاد للأكسدة إلى أن فاعلية مضادات الأكسدة تختلف من اختبار إلى آخر وتعتمد على طريقة الاستخراج المطبقة. أخيراً، كان النشاط المضاد للبكتيريا سلبياً لجميع الأنواع ومع اختبار جميع السلالات البكتيرية، قد يكون هذا بسبب عدم كفاءة المركبات النشطة بيولوجياً في مستخلصاتنا تجاه البكتيريا.

الكلمات الرئيسية: الحمضيات، النشاط المضاد للأكسدة، البوليفينول، الأوراق، النشاط المضاد للبكتيريا