

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2022

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

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par :

M^{lle} Taibi Amel & M^{lle} Roudjane Katia

Thème

**Optimisation de l'extraction des principes actifs des
feuilles de *C. clementina***

Soutenu le : 06/07/2022

Devant le jury composé de :

<i>Mr. Tighrine</i>	<i>Abderrahmane</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mr. Tighilet</i>	<i>Karim</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>Mr. Chergui</i>	<i>Achour</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

Année Universitaire : 2021/2022



Remerciement



En premier lieu et avant tout, louange à **Dieu** le tout puissant de nous avoir accordé l'opportunité, la bonne santé, l'énergie et la volonté pour mener à terme notre formation de master II en Biochimie Appliqué et pouvoir réaliser ce projet de fin d'étude.

Nous adressons nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à notre encadreur **Mr Tighelt Karim** Maître à la faculté de Biologie, Université de Bouira qui a accepté de diriger ce travail, son aide à plusieurs reprises, sa disponibilité, ses précieux conseils et suggestions et la confiance qu'il nous a accordés nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous remercions à **Mr Chergui Achour**, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions à **Mr Tighrine Abderrahmane**, d'avoir accepté de présider ce travail.

Nos vifs remerciements à tous les membres du laboratoire de Biologie de Faculté de Science de la Vie et de la Nature de Bouira et aussi aux étudiantes doctorantes **Kassouar Sabrina** et **Saada Ilham** et précisément au responsable de laboratoire **Djouahra Monia** qui ont mis à notre disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long la période de recherche et leurs aides et conseils avisés.

Enfin, on adresse nos sincères sentiments de gratitude et de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Mr Arab A, **Mr Oudjite Farid**, et madame **Hamani S** responsable de Laboratoire de chimie, et madame **Laalmi F** responsable de laboratoire de l'institut technologique de l'université de Bouira et **Mr Bakouri**.

Nos sincères gratitude à tous nos chers enseignants, tout le département Biologie.

Amel & Katia



Dédicace



*C'est avec l'aide et la grâce d'**Allah** de m'avoir donné la capacité d'écrire, de réfléchir, la force d'y croire et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie :*

*À ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde. **Mes chers parents** qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie. Qui m'ont apporté son appui durant toutes mes années d'études, pour ses sacrifices et soutien et qui m'ont donné la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité.*

A la mémoire de mes grands-parents et mon oncle maternelle

*A mes adorables sœurs : **Hassina, Nadjate, Nadia** et leur marré, **Lynda** et leur marré **Rachid** et la petite **Dalia**.*

*Mes chers frères : **Nacer** et **Razique** et sa famille et leur enfant **Housseme, Inass** et **Ritadj**.*

Toute ma famille paternelle et maternelle

*À mon Binôme **Katia** qui sont partagées avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.*

*A mes chère amies **Yasmin** et **Iman** Je te remercie pour ton amitié chère à mon cœur et je te souhaite tout le bonheur du monde.*

A toute personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes étude.

Amel



Dédicace



Je dédie ce modeste travail à :

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

Mes frères Saïd, Samir, auquel je souhaite une très bonne continuité et réussite dans la vie.

Mes sœurs Souad, Yasmine, que j'aime beaucoup.

A ma chère binôme Amel que j'aime beaucoup plus qui a toujours été avec moi contre vents et marées et ma belle amie Yasmine qui me soutient dans ma vie, et à ma chère grand-mère ou plutôt ma deuxième mère qui a toujours voulu que tu sois à mes côtés en ce moment.

Toute la promotion de Biochimie appliquée.

Tous ceux qui me sont chers.

Liste des figures

Figure 1 : Fruit d'orange .	8
Figure 2 : Fruit de mandarine.	8
Figure 3 : Fruit de clémentine .	9
Figure 4 : Fruit de citron .	9
Figure 5 : Structure de flavones .	15
Figure 6 : Structure de flavanols .	15
Figure 7 : Structure de flavonones .	16
Figure 8 : Structure de flavononoles .	16
Figure 9 : Structure d'isoflavones.	17
Figure 10 : Structure d'anthocyanes.	17
Figure 11 : Classification des tanins .	18
Figure 12 : Structure de coumarine.	19
Figure 13 : Structure de chalcones.	19
Figure 14 : Photographier de la feuille de <i>C. Clementina</i> .	23
Figure 15 : Structure et spectre d'absorbance UV/Vis du radical DPPH' et de sa forme réduite.	29
Figure 16 : Comparaison entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales obtenus avec les extraits de <i>C. Clementina</i> .	35
Figure 17 : Teneur en polyphénols totaux des extraits éthanolique des feuilles de <i>C. clementina</i> . Les résultats sont la moyenne de 3 essais.	36
Figure 18 : Teneur en flavonoides dans extraits éthanolique des feuilles de <i>C. clementina</i> . Les résultats sont la moyenne de 3 essais.	37
Figure 19 : Teneurs en flavonols des extraits de <i>C. clementina</i> . Les valeurs portant. Les résultats sont la moyenne de 3 essais.	39
Figure 20 : Teneurs pigments liposolubles des extraits de <i>C. clementina</i> . Les résultats sont la moyenne de 3 essais.	40
Figure 21 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extraits de <i>C. clementina</i> avec une concentration de 25 µg / ml.	41
Figure 22 : Pouvoir antioxydant total du test au phosphomolybdène par les extraits de <i>C. clementina</i> . Les résultats sont la moyenne de 3 essais.	43

Liste des tableaux

Tableau I : Quantité de production d'agrumes en Tonnes par pays	5
Tableau II : Composition de quelques fruits des agrumes (pour 100 g).	10
Tableau III : Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de <i>C. clementina</i> par macération.	25
Tableau IV : Construction du plan expérimental.	33

Liste des Abréviations

AlCl₃	Chlorure d'Aluminium.
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène.
BBD	model Box-Behnken.
C	Citrus.
DO	Densité Optique.
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrozyle.
ET	Ellagitanins.
EQ	Equivalent Quercétine.
EAA	Equivalent Acide Ascorbique.
GT	Gallotanins.
H3PW12 O40	Acide phosphotungstique.
H3PM012 O40	Acide phosphomolybdique.
H₂SO₄	Acide sulfurique.
IC₅₀	Concentration Inhibitrice 50 %.
INRA	Institut National de Recherche en Agro-Alimentaire.
MS	Matière Sèche.
MRS	Reponse Surfaces Methodology.
NaOAc	Acétate de sodium.
PPM	Phosphomolybdate.
PES	poids de l'extrait sec (g).
PPI	poids de la poudre initial (g).
TPT	Teneur Totale en Phénols.
USDA	United States Department of Agriculture.

Table des matières

Remerciment

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des Abréviations

Introduction	1
I. Généralités sur les agrumes	4
I.1. Définition.....	4
I.2. Distribution géographique	4
I.2.1. Dans le monde	4
I.2.2. En Algérie	5
I.3. Production des agrumes	5
I.3.1. Dans le monde	5
I.3.2. En Algérie	5
I.4. Classification et Taxonomie	6
I.5. Caractéristiques générales des citrus	7
I.5.1. Système racinaire	7
I.5.2. Système aérienne.....	7
I.6. Description botanique des agrumes	8
I.6.1. Orange (<i>Citrus sinensis (L.)</i>).....	8
I.6.2. Mandarine (<i>Citrus reticulata</i>)	8
I.6.3. Clémentine (<i>Citrus clementina</i>)	8
I.6.4. Citron (<i>Citrus limon (L.)</i>).....	9
I.7. La valeur nutritive des agrumes.....	9
I.8. Propriétés biologiques des citrus	10
I.8.1. Propriétés nutritionnelles.....	10
I.8.2. Propriétés thérapeutiques	11
I.9. Composition photochimique des feuilles de citrus	11
I.10. Utilisation traditionnelle des feuilles de citrus	11
II. Métabolites secondaires.....	14
II.1. Généralité.....	14
II.2. Composés phénoliques	14
II.2.1. Flavonoïde	14
1) Flavones.....	15

2) Flavanols.....	15
3) Flavonones.....	15
4) Flavononoles.....	16
5) Isoflavones.....	16
6) Anthocyanes	17
II.2.2. Tanins	17
1) Les tanins hydrolysables.....	17
2) Les tanins condensés	18
II.2.3. Coumarines.....	18
II.2.4. Les chalcones	19
II.3. Propriétés biologiques des composés phénoliques	19
II.3.1. Activité antioxydante	19
II.3.2. Activité antibactérienne.....	20
II.3.3. Activité antimicrobienne	Erreur ! Signet non défini.
II.3.4. Activité anti cancéreuse	20
II.3.5. Activité anti inflammatoire	20
II.3.6. Activité thérapeutique	Erreur ! Signet non défini.

Étude expérimentale

I. Matériel et méthodes.....	23
I.1. Préparation de la matière végétale.....	23
I.2. Procédure d'extraction.....	24
I.3. Optimisation de l'extraction	24
I.4. Calcul du rendement.....	24
I.5. Conception expérimentale	24
I.6. Analyse des données.....	25
I.7. Vérification du modèle	25
I.8. Dosage des composés phénoliques.....	26
I.8.1. Dosage des polyphénols totaux	26
I.8.2. Dosage des flavonoïdes	27
I.8.3. Dosage des flavanols	27
I.8.4. Dosage des pigments liposolubles.....	27
I.9. Évaluation de l'activité antioxydante	28
I.9.1. Test DPPH.....	28
I.9.2. Test de phosphomolybdène	30
I.10. Analyse statistique des résultats	30

II. Résultats et Discussion	32
II.1. Rendement d'extraction.....	32
II.2. Teneur en composés phénoliques	35
II.2.1. Teneur en polyphénols	35
II.2.2. Teneur en flavonoïdes	37
II.2.3. Teneur en flavonols	38
II.2.4. Teneurs en pigments liposolubles	39
II.3. Evaluation des activités antioxydantes des extraits de <i>C. clementina</i>	40
II.3.1. Activité de piégeage du radical DPPH.....	41
II.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test phophomolybdène.....	42
Conclusion	45
Références bibliographiques	48
Annexe	57
Rèsume	63

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont les premiers réservoirs de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme l'une des sources de molécules prometteuses dans tous les domaines de santé, à la fois dans le traitement et la prévention de certaines pathologies, comme le cancer et dans la production des médicaments anticancéreux pour la période 1981-2019 sont d'origine naturelle (**Newman & Cragg, 2020; Yabrir et al., 2019**).

Ces plantes médicinales contiennent une très large gamme des composés chimiques qui sont utilisées dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaire. Selon un rapport publié par l'organisation mondiale de la Santé, il existe actuellement environ 20 000 espèces des plantes utilisées à des fins médicinales (**Abudunia et al., 2017**), et plus de 170 000 molécules bioactives ont déjà été identifiées à partir des plantes et constituent 70 % des principes actifs des médicaments (**Moretti & Aubertin, 2007**).

Les composés phénoliques sont en effet parmi les composés bioactifs qui sont dotés de multiples vertus thérapeutiques, ils jouant un rôle important dans la lutte contre les cancers, la peroxydation lipidique, les maladies inflammatoires et les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, etc.) ce qui explique leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments (**Wang, Li, & Bi, 2018**).

Cet intérêt accru pour les substances naturelles d'origine végétale est lié surtout à leurs propriétés biologiques. En santé humaine, il est communément admis que de nombreuses pathologies telles que le vieillissement, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), cardiovasculaires (Athéroscléroses), cancers et les maladies inflammatoires sont directement ou indirectement, lie à un déséquilibre dans la balance existant au niveau physiologique entre les radicaux oxygénés et les antioxydants (enzymatiques ou non enzymatiques) suite à un stress oxydatif (**Matteo & Esposito, 2003**) ; (**Gliszczyńska-Świgło, 2006**).

Ce déséquilibre en faveur des espèces oxygénées engendre des dommages au niveau cellulaire, qui se traduisent par des pathologies pouvant être létales. Afin, de faire face à ces pathologies dues en partie à ces radicaux, des composés antioxydants de synthèses tels que le butyle d'hydroxytoluène (BHT) et le butyle d'hydroxy anisole (BHA) sont utilisés comme principes actifs. Malgré, les résultats encourageants obtenus avec ces antioxydants, il est de

plus en plus démontré que leurs utilisations sont susceptibles de manifester des effets secondaires, voire même toxique, notamment une augmentation du risque d'apparition de certaines tumeurs (**Manian, Anusuya, Siddhuraju, & Manian, 2008**).

Pour faire face aux effets néfastes de ces antioxydants de synthèse, plusieurs études ont mis l'accent sur l'utilisation de substances naturelles efficace, sans ou présentant moins d'effets secondaires, issus de plantes notamment ceux des fruits et légumes qui sont considérés comme source importante des multiples substances bioactives notamment en composés phénoliques et en vitamines (**Weisburger, 2002**).

Dans le cadre de valoriser des substances végétales en application pharmaceutique s'inscrit l'objectif de notre travail de recherche qui consiste à la valorisation des substances actives de la flore algérienne particulièrement les plantes du genre *Citrus* dont les agrumes constituent une des principales cultures pérennes en Algérie, spécialement les groupes appartenant aux oranges et clémentines (**Kerboua, 2002**).

En effet, les agrumes sont parmi des plantes aromatiques nommées les Rutacées (**Hosni et al., 2010**), c'est une source importante d'une immense variété des composés bioactives contenant un grand nombre des molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Zou et al., 2016**) ; (**Satari & Karimi, 2018**). Parmi les variétés d'agrumes bien connus : l'orange, le citron, le pamplemousse, le bigarade, la mandarine et la clémentine (**El-Otmani, Ait-Oubahou, & Zacarías, 2011**).

Notre travail de recherche consiste à déterminé les meilleures conditions d'extraction des principes actifs des feuilles de clémentine, d'un autre côté, effectue une estimation quantitative des teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et flavanols contenus dans les extraites éthanoliques.

Pour cela, ce travail est divisé en deux grandes parties : Une partie bibliographique et partie expérimentale. La partie bibliographique de cette étude inclue deux chapitres. Dans le premier chapitre, nous nous sommes intéressés à la description botanique de notre matériel végétale à savoir les citrus. Le deuxième chapitre a été consacré à une étude bibliographique sur les principales classes des métabolites secondaires et leurs importances.

La partie expérimentale décrivant le matériel et la méthodologie réalisée et les résultats obtenus : dosage des composés phénoliques des extraits des feuilles de *C. clementina*, ainsi que l'évaluation des activités antioxydantes par test DPPH et phosphomolybdène.

Chapitre I :

Généralités sur les

agrumes

I. Généralités sur les agrumes

I.1. Définition

Les citrus, aussi appelés emprunts d'agrumes (fruits acides), sont des petits arbres ou arbustes, dont ceux de la famille des Rutacées avec des hauteurs varient entre 2 et 10 mètres selon les espèces (**Bachès & Bachès, 2002**).

On les trouve plus couramment dans les climats de type méditerranéen (habituellement près de l'équateur, 40°N à 40°S de latitude) (**Rihani, 1991**). Les variétés d'agrumes les plus célèbres et les plus précieuses sur le plan commercial sont les oranges, les citrons, les pamplemousses et les mandarines (**Liu, Heying, & Tanumihardjo, 2012**).

Les citrus sont l'une des cultures fruitières les plus importantes au monde, disponible et répandu dans le monde entier, contribuant ainsi à la nutrition humaine. Les agrumes sont appréciés par les consommateurs pour leur couleur attrayante, leur saveur et leur arôme agréables (**Rock & Fardet, 2014; Zou et al., 2016**).

I.2. Distribution géographique

I.2.1. Dans le monde

Il existe 140 genres et 1300 espèces d'agrumes, qui sont répartis dans le monde. C'est une culture pérenne à longue durée de vie et cultivée dans plus de 100 pays à travers le monde. Ils sont la troisième plus grande culture fruitière après les pommes et les bananes, avec une production d'environ 100 millions de tonnes et une superficie de culture de plus de 7,2 millions d'hectares.

Les arbres d'agrumes ont des feuilles persistantes qui nécessitent un sol limoneux sableux, très sensible à la température et nécessitant des températures chaudes de 20 °C la nuit et 35 °C le jour pour pousser et murir correctement (**Savita & Nagpal, 2012**).

Ces espèces sont largement cultivées dans les régions tropicales et subtropicales où les températures sont majoritairement chaudes. Parmi les pays producteurs d'agrumes les plus importants, on a le Brésil, les États-Unis, l'Espagne, l'Italie, l'Égypte, Mexique, Chine et l'Inde. Selon l'historique des agrumes on se trouve trois centres de diversification primaire (**Aubert, 1994**).

- Le Nord-Est de l'Inde, les régions proches de la Birmanie et de la Chine, auraient abrité la diversification de *C. medica* et l'apparition de *C. aurantifolia*, *C. limon*, *C. aurantium* et *C. sinensis*.
- La Malaisie et l'Indonésie sont citées comme centre d'origine de *C. grandis*.
- Le Vietnam, le Sud de la Chine et le Japon seraient la zone de diversification de *C. reticulata*.

I.2.2. En Algérie

L'Algérie parmi les pays producteurs des agrumes dans le monde constitue une source d'emploi et d'activité économique importante. Le secteur agrumicole algérien couvre 59 443 ha avec un taux de production de 1 341 994 tonnes et un rendement de 22,39 tonnes par hectare en 2015 (Aroua, Kaydan, Achiri, & Biche, 2020).

I.3. Production des agrumes

I.3.1. Dans le monde

La production mondiale des fruits d'agrumes est estimée à 122 millions tonnes, pour toutes les variétés, elles sont essentiellement dans les régions méditerranéennes et tropicales. Les oranges représentent la moitié de productions avec 48,83 millions tonnes, suivies par les mandarines, les clémentines, les citrons, limes et les pamplemousses. La Chine est le plus grand producteur au monde suivi par le Brésil, alors que les États-Unis sont le cinquième plus grand producteur (Tableau I) (USDA, 2020).

Tableau I: Quantité de production d'agrumes en Tonnes par pays (USDA, 2020).

Pays producteurs	Variétés			
	Orange	Tangerine /mandarine	Grapefruit	Limes et limones
Chine	110	28 000	5,200	-
Mexique	75	-	534	3,217
Afrique du Sud	1, 240	630	374	650
États unis	450	797	343	885
Turquie	190	1,750	250	1,400
Argentine	85	770	-	1,650
Brazil	11	-	-	-
Maroc	120	1,360	-	-

I.3.2. En Algérie

En Algérie, le secteur d'agrumiculture couvre une superficie de 45 040 hectares, ce qui représente 11 % de la surface cultivée dans le pays, constitués par divers groupes d'agrumes spécialement les oranges (48 400 hectares) et les clémentines avec une superficie de 10 817 hectares (Berraf-Tebbal et al., 2020). La région de Mitidja est la plus cultivée avec 15 809 hectares, suivies par la région de Chlef (5777 hectares) et Alger avec une surface de 5065 hectares (Berraf-Tebbal et al., 2020).

I.4. Classification et Taxonomie

Les agrumes sont des plantes angiospermes dicotylédones, appartenant à la famille des Rutacées, avec 160 genres et 1900 espèces. Les six genres sexuellement d'agrumes vrais sont : *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Citrus*, *Eremocitrus* et *Clymenia* (Ollitrault, Curk, & Krueger, 2020).

Les classifications des citrus sont basées essentiellement sur les critères morphologiques, anatomiques et chimiques, d'après Swingle la taxonomie des citrus est la suivante : (Ollitrault et al., 2020).

Règne : Végétale

Embranchement : *Magnoliophyta* (ou angiospermes)

Sous-embranchement : *Magnoliopsida* (ou dicotylédones)

Classe : *Eudicotes*

Sous-classe : *Archichlomydeae*

Ordre : *Germinales (Rutales)*

Famille : *Retaceae*

Sous-famille : *Aurantioideae*

Tribus : *Citreau*

Sous-tribu : *Citrinae*

Genre : *Poncirus, Fortunella et Citrus*

I.5. Caractéristiques générales des citrus

Les agrumes sont des petits arbres et arbrisseaux toujours verts, possèdent un système racinaire et un système aérien (Manner, Buker, Smith, Ward, & Elevitch, 2006).

I.5.1. Système racinaire

Les racines occupent plus de 70 % de la taille de l'arbre formé par le porte-greffe, leur axe peut dépasser 2 mètres sous la surface (Manner et al., 2006).

- ❖ **Les racines principales** : Elle assurent l'ancrage de l'arbre au sol, très solides et présentes par sa persistance et son abondance (Manner et al., 2006).
- ❖ **Les racines secondaires** : Elle joue un rôle important dans l'absorption des éléments minéraux et indispensables à l'alimentation de l'arbre en éléments nutritifs (Manner et al., 2006).

I.5.2. Système aérienne

a) Feuilles

Sont persistants simples et denses ovales ou elliptique, unifoliées, et des pétioles articulés et ailés. Ont une taille variée entre 4 à 8 cm et une capacité à produire des essences ayant une odeur caractéristique et d'un autre caractère d'adaptation à des hivers peu rigoureux (Bachès & Bachès, 2002) et un champ d'application dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques (Coste, Gattefosse, & Guillot, 1968).

b) Fleurs

Sont axillaires, parfumées, simples souvent parfaites de couleur blanche. Leur diamètre et variés entre 2 à 4 cm (0,8 à 1,6), souvent très odorants (Manner et al., 2006).

c) Fruits

Le fruit est un hespéridé, une baie charnue et indéhiscente qui sont différentes au niveau de la taille, la couleur et la forme (Manner et al., 2006). Le fruit possède différentes parties : l'écorce, la pulpe, les pépins (Bachès & Bachès, 2002).

d) Graine

Les graines sont blanchâtre pâle à verdâtres, aplaties, anguleuses et poly-embryonnées (Manner et al., 2006). Présentent un stockage récalcitrant ou intermédiaire comportement et ne peut donc pas être stocké au sec à basse température.

I.6. Description botanique des agrumes

I.6.1. Orange (*Citrus sinensis* (L.))

C'est l'un des fruits les plus consommés et les plus répandus au monde, il est généralement de forme ronde et sa couleur et son goût est variés selon les variétés. Ils sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour la fabrication de jus d'orange et dans l'industrie cosmétique pour la fabrication des parfums (Vashisth & Kadyampakeni, 2020).



Figure 1 : Fruit d'orange (Lo Piero, 2015).

I.6.2. Mandarine (*Citrus reticulata*)

C'est l'une des baies sphériques, sa couleur est orange vif, douce et parfumée, les pôles sont plats, plus petits que l'orange, et comporte de nombreux pépins. En raison de leur haute teneur en vitamines vitamine C (40 %) et A (10 %), ils sont utilisés dans le secteur alimentaire pour la fabrication de concentrés de jus d'orange et dans le secteur médical. Aussi connue sous le nom mandarine d'Algérie (Vashisth & Kadyampakeni, 2020).



Figure 2 : Fruit de mandarine (Ferenčić, Gluhic, & Dudaš, 2016).

I.6.3. Clémentine (*Citrus clementina*)

Aussi connue sous le nom de mandarine d'Algérie, c'est un fruit issu de l'hybridation de la mandarine et de l'orange amère (bigarade). Sa couleur est orange, son goût sucré, sa peau est très fine tirent ces caractéristiques des mandarines. Dans le domaine alimentaire elles sont

utilisées pour la fabrication de jus, alors que dans le secteur médical elles sont utilisées pour réduire les troubles cardiaques (**Bassal, 2009**).



Figure 3 : Fruit de clémentine (Thermoz & Allain, 2014).

I.6.4. Citron (*Citrus limon* (L.))

C'est une baie de forme ovale, de couleur jaune vif, épaisse, au goût très acide et juteux en raison de la pulpe entourée de quelques pépins, ils contiennent de nombreuses poches à huile essentielle. Considéré comme un antiscorbut bien connu en raison de sa richesse en vitamine C, il contient des propriétés médicinales intéressantes, et la production de jus de citron dans le secteur alimentaire permet de faire des boissons rafraichissantes (**Jayaprakasha & Patil, 2007**).



Figure 4 : Fruit de citron (Lobstein & Marinier, 2016).

I.7. La valeur nutritive des agrumes

En termes d'importance économique, les agrumes sont considérés comme le premier groupe de fruits et leur valeur nutritionnelle varie d'une variété à l'autre (**Rock & Fardet, 2014**).

Les variétés d'agrumes telles que les oranges, les mandarines, les pamplemousses et les citrons sont des aliments riches en antioxydants, en vitamine A et en polyphénols, ces derniers ayant une valeur énergétique importants. De plus, les citrus sont une source nutritive riche en

vitamine C, B6 et contiennent de l'acide ascorbique et de l'acide folique, potassium et calcium (Tableau n II) (El-Otmani et al., 2011).

Tableau II : Composition de quelques fruits des agrumes (pour 100 g) (El-Otmani et al., 2011).

Nutriment (g)	Orange	Mandarine	Pamplemousses	Lime	Clémentine
Eau	86,75	85,17	88,06	88,98	85,17
Énergie (kcal)	47	53	42	29	53
Protéine	0,94	0,81	0,77	1,10	0,81
Lipide	0,12	0,31	0,14	0,30	0,31
β- carotène (µg)	71	155	686	3	155
Fibres	2,4	1,8	1,6	2,8	1,8
Calcium (mg)	40	22	12	26	37
Magnésium(mg)	10	9	9	8	12
Phosphore (mg)	14	18	8	16	20
Potassium (mg)	181	135	148	138	166
Vitamine C (mg)	53,2	26,7	31,2	53	26,7
Vitamine A(UI)	225	681	1150	22	83,3
Vitamine E (mg)	0,2	0,2	0,15	0,15	0,15
Folate (mg)	30	16	13	11	16

I.8. Propriétés biologiques des citrus

Le citron est une plante vivace qui nécessite beaucoup d'eau pour remplir ses fonctions physiologiques, augmentant sa valeur et sa haute qualité.

I.8.1. Propriétés nutritionnelles

Les citrus ont une importance économique et constituent des composés bioactifs naturels qui possèdent une activité biologique puissante. Cette dernière apporte des quantités suffisantes de vitamine C nécessaire pour éviter l'apparition des maladies comme le scorbut (Buxeraud & Faure, 2021), ainsi que des fibres alimentaires à haute teneur en pectine qui abaisse le cholestérol dans l'organisme (LIME, 2022).

Les agrumes sont des plantes vivaces qui nécessitent beaucoup d'eau pour remplir ses fonctions physiologiques, augmentent ainsi leurs valeurs nutritives et leurs qualités (El-Otmani et al., 2011).

I.8.2. Propriétés thérapeutiques

Les citrus sont l'une des cultures fruitières avec une quantité importante de composés phytochimiques actifs qui assurent une bonne protection pour la santé humaine. Selon une étude française de l'INRA, les flavonoïdes présents dans les agrumes réduisent le risque artériel et optimisent la résistance et la capacité de dilatation des vaisseaux sanguins. De plus, les bioflavonoïdes sont des substances chimiques très efficaces pour combattre l'inflammation au niveau cellulaire et assurant une bonne résistance aux attaques microbiennes (**Tripoli, La Guardia, Giammanco, Di Majo, & Giammanco, 2007**).

La teneur en vitamine C présente dans les agrumes stimule le système immunitaire en augmentant la production de globules blancs qui interviennent dans la défense dans l'organisme (**Rendeiro et al., 2016**). La synergie naturelle de ces derniers avec les flavonoïdes assure des effets bénéfiques sur la santé et la beauté de la peau (**Bharti, Rani, Krishnamurthy, & Arya, 2014**).

L'activité antioxydante de naringine (un flavonoïde) confère des nombreuses activités à différents niveaux de l'organisme et réduit les risques des certains troubles cardiovasculaires dont l'athérosclérose (**Tripoli et al., 2007**).

I.9. Composition phytochimique des feuilles de citrus

Les feuilles d'agrumes contiennent un nombre importants des composés phénoliques qui mise en évidence la capacité de résistance naturelle de la plante et influencent l'activité des adultes (**Lotmani, Kolaï, Berkani, & Bouzouina, 2008**). Cette dernière est riche en flavonoïdes sous différentes formes : Flavones, flavanols, sous forme aglycone, mono-glycosylée, bi et tri glycolyse (**Crozier et al., 2006**).

Ainsi que de grandes quantités d'éléments minéraux tels que l'azote, le calcium et le magnésium, nécessaires à la croissance des plantes et à l'amélioration de la qualité des fruits, ont été constatées chez les feuilles des agrumes (**Aoudache & Arib, 2019**).

I.10. Utilisation traditionnelle des feuilles de citrus

Les espèces de la famille des agrumes ont été identifiées comme faisant partie des espèces utilisées traditionnellement, qui impliquant les différentes parties de la plante et qui contribuent à lutter contre diverses maladies (**Mohib et al., 2018**).

Les huiles essentielles des feuilles de citrus jouent un rôle important, en effet, ils sont utilisés comme antifongique pour la préservation des légumes secs (**Boughendjioua, 2019**).

Dans la médecine traditionnelle, les feuilles citrus sont utilisés pour évaluer la présence des flavonoïdes qui considère comme métabolite secondaire efficace avec des effets antibactériens et antifongiques (**Mohib et al., 2018**).

De plus, elles sont utilisées dans le domaine pharmaceutique puisque les feuilles des citrus contiennent des flavonoïdes qui sont connus pour leurs effets thérapeutiques dans le traitement des certaines maladies telles que le cancer (**KunduSen et al., 2011**).

Dans le secteur cosmétique, les feuilles des agrumes sont utilisées pour la fabrication de savons, parfums et des produits de soins de la peau grâce à leur richesse en principe actif tel que la lutéoline qui réduisent l'hyperpigmentation de la peau (**Coste et al., 1968**). Alors que dans l'industrie alimentaire elles sont employées pour prévenir le rancissement des lipides (**Coste et al., 1968**).

Chapitre II :

Métabolite Secondaire

II. Métabolite secondaire

II.1. Généralité

Les composés bioactifs sont synthétisés par les plantes, champignons, bactérie ayant des effets toxicologique et pharmacologique chez l'homme. Les produites du métabolisme des plantes sont nommées métabolites qui sont subdivisés en deux catégories : métabolites primaires et le métabolites secondaires, ce dernier est biosynthétisé à partir de métabolite primaire protéine, lipide, glucide (**Bouabid et al., 2016**).

Ils sont localisé dans des compartiments de la plante à des moments précise et jouent un rôle important dans les interactions de la plante avec son environnement et participe aussi à la survie de l'organisme dans son écosystème (**Bouabid et al., 2016**). Il existe plus de 8500 métabolites déjà identifiés, dont les groupes les plus importants sont les alcaloïdes, les composés phénoliques et les terpénoïdes (**Adjatin et al., 2018**).

II.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules hydrosolubles, aromatiques appartient au type de métabolite secondaire des végétaux. Ils diffèrent entre eux selon le nombre, la position de groupement phényle (C6) et d'un hydroxyle (-OH) et selon la présence de substance non phénolique telle que les groupements glucosides. Il joue un rôle dans la défense des plantes contre les agressions environnementales, dans la reconnaissance entre les plantes (allélopathie). Ce groupe de principes actifs comporte les polyphénols, les flavonoïdes, la lignine, les tanins et les coumarines (**Manthey, Grohmann, Berhow, & Tisserat, 2000**).

II.2.1. Flavonoïde

Le nom de flavonoïde provient du terme « flavus » qui signifie jaune. Ce sont des composés naturels appartient à la famille des polyphénols (**Huet, 1982**), plus abondantes dans les plantes supérieures de certaines familles telles que les rutacées qui sont synthétisées à partir des acides aminés aromatiques la phénylalanine, tyrosine avec des unités acétates par intervention de l'enzyme phénylalanine-ammonialyase qui catalyse la conversion de la L-phénylalanine en acide transcinnamique (**Zou et al., 2016**).

Au cours de développement des organes chez les agrumes les flavonoïdes sont accumulés en quantités importantes, ces composés ont différentes fonctions comme la protection des

végétaux contre la radiation UV, les herbivores et les insectes. Il existe six types des flavonoïdes (Liu et al., 2012).

1) Flavones

Les flavones sont omniprésentes dans la plante, constituent l'une des plus grandes sous classes des flavonoïdes (80 %). Au niveau de leur structure, ils possèdent deux noyaux l'un contient deux hydroxyles phénoliques en position C5 et C7, soit libres, ou estérifié et l'autre est substitué en 3 et 4 ou encore en 3 et 5. Cette dernière contient le squelette 2-phényle-1,4-benzopyrone avec des groupes hydroxyle généralement à la position 5 et 7 et aussi à la position 4 ou 3. Ces composés jouent plusieurs fonctions dans les plantes, ils sont les principaux pigments de fleurs de couleur blanche et crème, avec un potentiel antiradicalaire telle que l'apigénine (Tripoli et al., 2007).

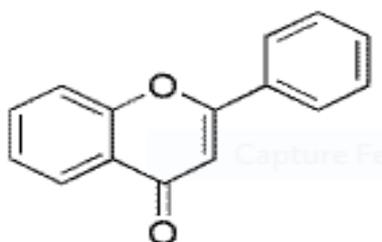


Figure 5 : Structure de flavones (Tripoli et al., 2007).

2) Flavanols

Les flavanols sont des molécules présentes dans les plantes sous différentes formes, c'est l'une des sous-classes des flavonoïdes les plus courantes, possède un noyau 2-phénylchromane en C6, C3, C6 (Wang et al., 2018). Ce dernier contient le squelette 3-hydroxy-2-phénylchromone. Ces composés jouent un rôle crucial, ils sont considérés comme une source d'antioxydants comme le kaempférol (Crozier et al., 2006).

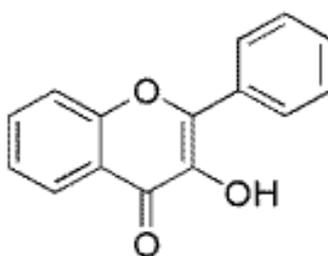


Figure 6 : Structure de flavanols (Arima et al., 2002).

3) Flavonones

Les flavonones sont des composés qui se caractérisent par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d'un centre asymétrique. Il ne possède pas le groupement OH en position C3, les citrus sont parmi les rares espèces qui contiennent les flavonones ayant une saveur variable telle que l'orange et le citron. Ils sont composés d'un noyau de flavane qui est formé par deux cycles aromatiques liés par un autre cycle nommé cycle de dihydropyrone, cette structure est générique parmi eux : la naringénine (Khan & Dangles, 2014; Rendeiro et al., 2016).

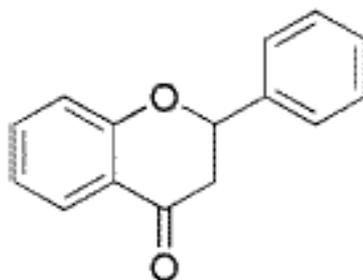


Figure 7 : Structure de flavonones (Arima, Ashida, & Danno, 2002).

4) Flavonoles

Les flavonoles sont des substances omniprésentes dans les végétaux. Ils possèdent une structure à trois cycles, deux cycles aromatiques qui sont substitués par de nombreux groupes hydroxyles, se distinguent des catéchines par la présence d'un OH en position 4, ils possèdent trois atomes de carbones asymétriques (Crozier et al., 2006).

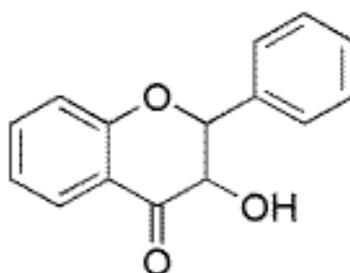


Figure 8 : Structure de flavonoles (Tripoli et al., 2007).

5) Isoflavones

Les isoflavones sont un sous-groupe des flavonoïdes sous forme de 7-O-D-glucosides avec des quantités mineures sous forme libre. Ils jouent un rôle important dans l'interaction entre les microorganismes et les plantes. Parmi eux on a la gènesiste, la daïdzine (Crozier et al., 2006).

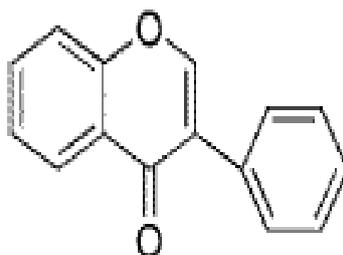


Figure 9 : Structure d'isoflavones (Tripoli et al., 2007).

6) Anthocyanes

Les anthocyanes, du grec « anthos » qui signifie fleur et « Kyanos » qui veut dire bleu-violet. Ils sont des pigments vacuolaires de couleurs allant roses au bleu en passant par le rouge, le mauve et le violet, ils sont très abondants dans les fruits et les fleurs. Ces composés sont des dérivés du cation 2-phényl-1-benzopyrylium (flavylium) porteur de 3 cycles aromatiques conjugués d'où l'absorption de lumière en visible parmi eux : Pelargonidine (Bar-Ya'akov, Tian, Amir, & Holland, 2019).

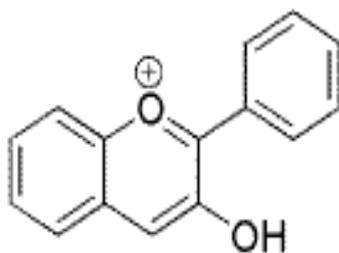


Figure 10 : Structure d'anthocyanes (Tripoli et al., 2007).

II.2.2. Tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires hétérogènes, complexes solubles dans l'eau caractérisée par la présence d'un groupe hydroxyle lié au cycle benzénique. Ils sont biosynthétisés par les plantes supérieures, présentes généralement dans les tiges, les graines, les racines, les feuilles et les écorces. On distingue deux types des tanins selon leurs structures et leurs propriétés : les tanins condensés et les tanins hydrolysables (Figure 11) (Crozier et al., 2006).

1) Les tanins hydrolysables

C'est une classe des composés polyphénoliques qui se trouve couramment dans une variété des fruits et des plantes qui subdivisé en deux groupes : les ellagitanins (ET) et les gallotanins (GT), cette dernière contient des monomères simples ou des oligomères complexes,

ils sont caractérisés par la présence d'autres composés tels que le D glucose, l'acide phénol et l'acide gallique dans le cas des gallotannins et l'acide éllagique dans le cas des ellagitannins (Crozier et al., 2006).

2) Les tanins condensés

Ils sont connus sous nom proanthocyanidines ou tanins catéthiques qui correspondent à des polymères de flavan-3-ols liés entre elles par des liaisons carbone-carbone, on distingue les prodelphinidines (dérives de gallocatéchine, épigallocatéchine et leurs esters galliques) et les procyanidine (dérives de catéchine, épicatechine et leurs esters galliques), cette dernière joue plusieurs fonctions parmi aux : la protection des plantes contre les infections fongique et bactérienne, favorise la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse (Crozier et al., 2006).

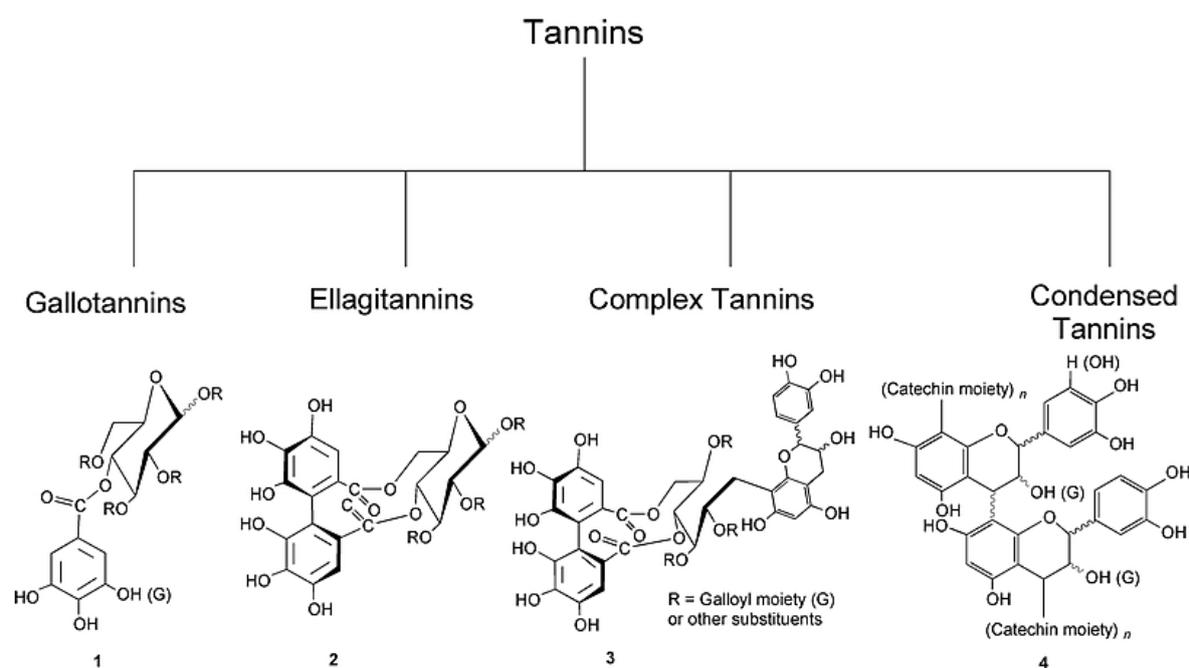


Figure 11 : Classification des tanins (Khanbabaee & Van Ree, 2001).

II.2.3. Coumarines

C'est un groupe de métabolite secondaire dérivés de composé phénolique, possède neuf atomes de carbones avec un noyau benzo pyranone-2 ou « coumarine basique ». Dans la nature ils sont sous forme libre ou combinés avec des sucres généralement dans les feuilles, les fruits,

les fleurs et les racines. Il existe deux classes l'une est nommée furanocomarines et l'autre nommé phénylcomarines (Zou et al., 2016).

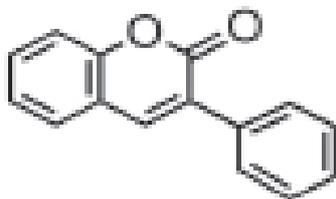


Figure 12 : Structure de coumarine (Zou, Xi, Hu, Nie, & Zhou, 2016).

II.2.4. Les chalcones

Ils sont caractérisés par l'absence de l'hétérocycle C centrale et la présence d'un chaînon tri carbonée cétonique α et β insaturée qui relie entre les deux cycles A et B (saturée dans le cas des dihydrochalcones), ces cycles sont équivalents aux cycles A et B des autres flavonoïdes, mais la numérotation est inversée, parmi ces composés on a : le butéine et le phlorétine (Khan & Dangles, 2014).

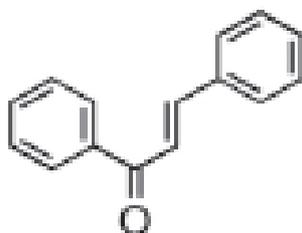


Figure 13 : Structure de chalcones (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2006).

II.3. Propriétés biologiques des composés phénoliques

II.3.1. Activité antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de réduire les dommages induits par les radicaux libres dans l'organisme et de limiter la prolifération de ce dernier en agissant sur les composés oxygénés très réactifs. Ils participent également à la chélation des métaux-prooxydants et à l'inhibition de la peroxydation lipidique (Muscatello, Zoccali, & Bruno, 2018).

II.3.2. Activité antibactérienne

Les antibiotiques utilisés pour le traitement des infections bactériennes et parfois pour la sélection de souches multi résistantes (**Tripoli et al., 2007**). Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes et les tanins présentent une toxicité vis-à-vis des microorganismes, cette toxicité peut être liée à l'inhibition des hydrolases ou d'autre interaction qui bloqué les adhésifs microbiens, les protéines et les transporteurs de l'enveloppe cellulaire (**Arima et al., 2002**).

II.3.3. Activité anti cancéreuse

Certaines plantes sont riches en métabolites secondaires comme les flavonoïdes qui sont considérés comme des agents antiprolifératifs et cytotoxiques vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. L'interaction des enzymes de la famille CYP avec les flavonoïdes, notamment avec les résidus d'acides aminés des sites actifs de CYP2C9 et CYP1A2 provoque un métabolisme oxydatif par le cytochrome P450 qui induit des produits de conversion qui inhibent la croissance de cellule tumorale (**KunduSen et al., 2011**).

II.3.4. Activité anti inflammatoire

Les flavonoïdes présentent un effet anti inflammatoire (**Muscatello et al., 2018**) capable de bloquer les activités enzymatiques tel que le 5-lipoxygénase et la cyclooxygénase (**Mohib et al., 2018**).

Etude Expérimentale

Matériel Et Méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Préparation de la matière végétale

Les feuilles de *C. clementina* (clémentinier) ont été cueillies à partir d'arbres cultivés au niveau d'Institut National de Recherche en Agro-Alimentaire (INRA) situé dans la région d'Oued Ghir, wilaya de Béjaïa (latitude : 36°42'20.25"N ; longitude 4°57'32.69" E ; altitude 89 m). La cueillette a été réalisée de manière aléatoire en Mars 2022.



Figure 14 : Photographie de la feuille de *C. clementina*.

Une fois récoltées, les feuilles ont été nettoyées à l'eau courante et débarrassée de poussières et d'autres impuretés, puis mises à sécher à l'ombre, à température ambiante et sous aération continue pendant sept jours puis transférée à l'étuve à 40°C, jusqu'à stabilisation du poids. Les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un moulin à café jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène puis tamisée à l'aide d'un tamiseur de marque « **RETSCH** » de 200 µm de diamètre.

La taille des particules de l'échantillon influence grandement le rendement d'extraction, une meilleure extraction est obtenue avec des particules de plus petit calibre, dont la surface de contact avec le solvant est beaucoup plus importante (Nacz & Shahidi, 2004).

La poudre fine homogène obtenue a été conservée dans des récipients en verre hermétiquement fermés, étiquetés et stockés à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'utilisation.

I.2. Procédure d'extraction

La méthode d'extraction utilisée est la macération. Elle consiste en une extraction solide liquide, la poudre végétale est mise en contact prolongé avec un solvant à température ambiante et sous agitation pour extraire les principes actifs.

I.3. Optimisation de l'extraction

Pour l'optimisation de la procédure d'extraction par macération, les paramètres influençant le procédé d'extraction tel que la concentration du solvant, le temps de contact entre la poudre et le solvant ainsi que la ration entre la poudre et le solvant ont été sélectionnés suite à une recherche bibliographique.

Une quantité de poudre des feuilles de *C. clementina* a été placée dans un bucher contenant des quantités d'éthanol. La suspension a été extraite à différentes concentrations de solvant et temps de macération sous agitation température ambiante et à l'abri de la lumière afin d'éviter les phénomènes d'oxydation.

La macération a été poursuivie sans agitation durant 24 heures à 4°C. Le macérât a été filtré sur papier Wattman N°3 et le filtrat obtenu a été évaporé à sec dans l'étuve à 40°C et cela jusqu'à évaporation complète du l'éthanol. L'extrait récupéré a été conservé dans des flacons en verre hermétiquement fermés et à l'abri de la lumière.

Un nombre de 15 essais a été réalisé avant d'obtenir l'optimum, puis une extraction dans les conditions optimales obtenues par MSR a été réalisée. Pour les expériences de l'optimisation MSR et de validation du modèle, le rendement en composés phénoliques et activités antioxydantes a été pris en considération.

I.4. Calcul du rendement

Les taux d'extraction ont été calculés par rapport à la matière sèche initiale selon la formule suivante :

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

- *PES* : poids de l'extrait sec (g).

- *PPI* : poids de la poudre initial (g).

I.5. Conception expérimentale

Le plan utilisé dans notre travail est le plan de Box-Behnken qui comprend trois variables et trois niveaux factoriels (**Radojković et al., 2012**). Les variables indépendantes utilisées dans le présent travail étaient la concentration de l'éthanol (X_1 , %, v/v), la ration solide / liquide (X_2 , Ration) et le temps d'extraction (X_3 , min). Les niveaux codés et non codés des variables indépendantes et le plan expérimental ont été donnés dans le (**Tableau III**). La valeur codée 0 représente le point central des variables et a été répétée pour une erreur expérimentale. Les points factoriels ont été codés comme ± 1 .

Tableau III : Conditions d'extraction utilisées dans l'étude préliminaire de l'extraction des composés phénoliques des feuilles de *C. clementina* par macération.

	X_1 Concentration d'éthanol (%)	X_2 Ration solide /liquide (mg / mL)	X_3 Temps (min)
-1	40	0.1	30
0	60	0.15	105
+1	80	0.2	180

I.6. Analyse des données

Toutes les données expérimentales ont été centrées à l'aide de trois mesures. La procédure de régression de surface de réponse du logiciel Origin a été utilisée pour analyser les données expérimentales. Les données expérimentales ont été ajustées à un modèle polynomial de second ordre et des coefficients de régression ont été obtenus. Le modèle polynomial généralisé du second ordre utilisé dans l'analyse de surface de réponse était l'équation suivante :

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i x_i + \sum_{i=1}^3 a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 a_{ij} x_i x_j \quad (i \neq j)$$

Où a_0 , a_i ; a_{ii} et a_{ij} , sont les coefficients de régression pour les termes d'intersection, linéaire, quadratique et d'interaction, respectivement ; x_i et x_j sont les variables indépendantes.

I.7. Vérification du modèle

Les conditions optimales pour l'extraction des composés phénoliques et des activités antioxydantes dépendant de la composition du solvant, de la ration solide / liquide et du temps d'extraction ont été obtenues à l'aide des équations prédictives de MSR. Les valeurs expérimentales et prédites ont été comparées afin de déterminer la validité du modèle.

I.8. Dosage des composés phénoliques

I.8.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des différents extraits des feuilles de *C. clementina* a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu selon la technique décrite par (Ghedadba et al., 2015) avec quelques modifications.

Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀) de couleur jaune.

Cette technique est basée sur le changement de la coloration de ce réactif de jaune au bleu lorsqu'il est complexé à certaine molécule principalement les composés phénoliques qui réagissent avec leur fonction -OH.

Cette réaction est caractérisée par le développement d'une coloration bleu foncé dont l'absorbance est suivie à une longueur d'onde entre 725 nm et 765 nm. La détermination la concentration des polyphénols à partir d'une courbe d'étalonnage à l'aide des concertations connus du standard : l'acide gallique (Cicco, Lanorte, Paraggio, Viggiano, & Lattanzio, 2009).

Mode opératoire

200 µl d'extrait éthanolique des feuilles de citrus sont mélangés à 1,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu à 0,1 N, puis incubé pendant 5 min à l'obscurité, ensuite, 1,5 mL d'une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 6 % sont ajoutés à ce mélange qui est incubé pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée 765 nm à l'aide d'un spectromètre du type « **OPTIMA** » avec l'utilisation de l'acide gallique comme témoin positif dans les mêmes conditions réactionnelles.

La concentration des polyphénols totaux a été exprimée en milligramme équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche (mg EAG/mg MS).

I.8.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur des flavonoïdes totaux dans les extraits des feuilles des *C. clementina* a été estimée par un dosage colorimétrique décrite par (Bouyahya, Abrini, Bakri, & Dakka, 2017) avec quelque modification.

Principe

Les flavonoïdes contiennent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 qui est susceptible de donner un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium).

Mode opératoire

1 mL de la solution d'extraits sont additionnés à 1 mL du mélange d' $AlCl_3$, après incubation à température ambiante pendant 10 min, l'absorbance a été mesurée à 415 nm contre un témoin préparé dans les mêmes conditions.

La quantité des flavonoïdes a été exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ / g MS) en ce réfèrent à une courbe d'étalonnage établi dans les mêmes conditions avec la quercétine comme flavonoïdes standards (Doumbia, Fofie, Haidara, Denou, & Sanogo, 2021).

I.8.3. Dosage des flavanols

La quantification des flavanols dans nos extraites a été déterminer par la méthode d'acétate de sodium décrite par (Jimoh, Adedapo, & Afolayan, 2010).

Mode opératoire

1 mL d'une solution d' $AlCl_3$ à 2 % et 3 mL d'une solution d'acétate de sodium à 5 % ont été mélangés avec 1 mL de chaque extrait. Les tubes à essai sont ensuite incubés pendant 2 h et 30 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à $\lambda = 440$ nm par un spectrophotomètre UV visibles. Une gamme d'étalons du quercétine a été préparée dans les mêmes conditions Afin de quantifier la quantité de flavonls exprimée en milligramme d'équivalente de quercétine par gramme de la matière sèche (mg EQ / g MS) (Oyedemi, Bradley, & Afolayan, 2010).

I.8.4. Dosage des pigments liposolubles

La chlorophylle a et b, les β carotènes ainsi que les lycopènes sont parmi des pigments liposolubles. Leur dosage nécessite l'utiliser des solvants organiques ou un mélange de solvants et peuvent ensuite être déterminé par différentes méthodes physicochimiques comme la spectrophotométrie.

Mode opératoire

Une quantité de 150 mg de poudres est introduite dans un mélange de 10 mL d'acétone-hexane (4/6 V/V). Après agitation pendant 1 min la solution est filtrée à l'aide du papier whatman N 03, puis l'absorbance du filtrat a été réalisé à des différentes longueurs d'onde : 453 nm, 505 nm, 645 nm, 653 nm. La quantité de pigments liposolubles a été calculés ont utilisent l'équation suivante et exprimée en microgrammes par gramme de matière sèche ($\mu\text{g} / \text{g}$ de matière sèche) (Nagata & Yamashita, 1992).

β carotène (mg/100 mL) = $0,216 \times A_{663} - 1,220 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$.

Lycopène (mg/100 mL) = $-0,0458 \times A_{663} + 0,204 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$.

Chlorophylle a (mg/100 mL) = $0,999 \times A_{663} - 0,0989 \times A_{645}$.

Chlorophylle b (mg/100 mL) = $-0,328 \times A_{663} + 1,77 \times A_{645}$.

I.9. Évaluation de l'activité antioxydante

I.9.1. Test DPPH

Le radical DPPH est l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation entre la structure et l'activité antioxydante des composés phénoliques des extraits de plantes. Il contient un électron non apparié sur l'atome du pont formé par les deux azotes (Martins et al., 2013).

Principe

L'activité antiradicalaire est mesurée par la dégradation du DPPH qui est un radical synthétique de couleur violette. La couche électronique de ce dernier est saturée en contact d'antioxydant. Ce qui explique la variation de sa couleur violette en couleur jaune (Agbodan, Dotse, Koumaglo, & Saloufou, 2015).

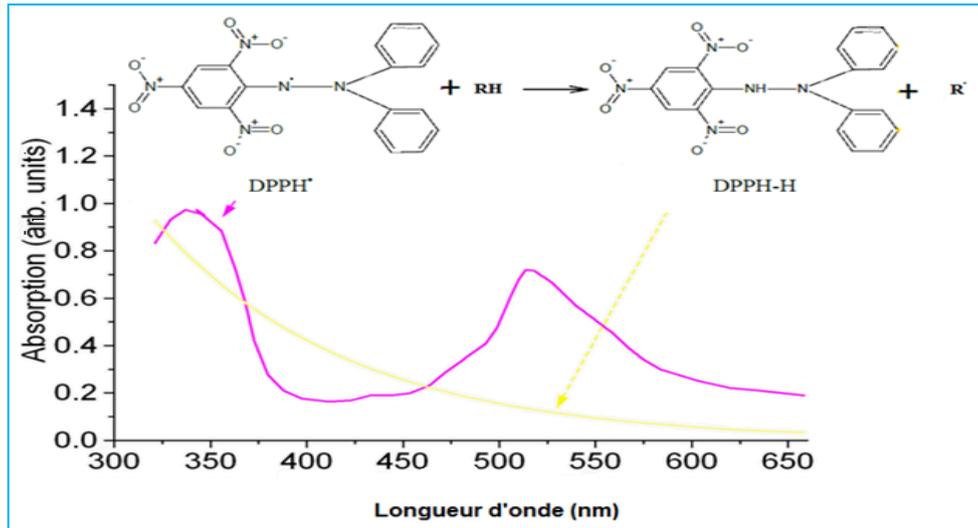


Figure 15 : Structure et spectre d'absorbance UV/Vis du radical DPPH[•] et de sa forme réduite (Dransfield, Guest, Lyth, McGarvey, & Truscott, 2000).

Mode opératoire

1,25 mL d'extrait éthanolique de feuille de citrus à différentes concentrations allant de 25 à 200 µg / mL mélangés avec 25 µl de la solution de DPPH (5 mM). Après incubation pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante on mesure l'absorbance à $\lambda = 517$ nm contre :

Témoin négatif : 1,25 mL de l'éthanol avec 25 µl de DPPH.

Témoin positif : deux antioxydants standards ont été utilisé à savoir l'acide gallique et quercétine.

Le test est répété trois fois de façon indépendante, l'activité anti radicale a été estimé en pourcentage selon la formule suivants : (Loe, Ngaba, Kamdom, Mpondo, & Dibong, 2018)

$$I \% = [A_0 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

Avec :

I % : pourcentage de piégeage du radical DPPH.

A0 : DO de témoin (éthanol + DPPH).

A1 : DO de l'extrait + DPPH.

A2 : DO de blanc (extrait + éthanol).

I.9.2. Test de phosphomolybdène

Cette méthode est basée sur la réduction de Mo⁺⁶ en Mo⁺⁵ et la formation d'un complexe phosphate/Mo⁺⁵ de couleur verte dans un milieu acide avec un maximum d'absorption à 695 nm (Nagavani, Raghava, Ravi, & Raghava, 2010).

Le test au phosphomolybdate a été réalisé selon la méthode décrite par (Prieto, Pineda, & Aguilar, 1999). 200 µl d'échantillons à différentes concentrations ont été mélangés avec 2 mL d'une solution de phosphomolybdate (acide sulfurique à 0.6 mM, phosphate de sodium à 28 mM et molybdate d'ammonium à 4 mM). Après 90 minutes d'incubation dans un bain-marie à 95 °C, l'absorbance de mélange a été mesurée à 695 nm.

Pour le contrôle positif, l'échantillon est remplacé par l'acide ascorbique, par contre, le contrôle négatif, quant à lui, a été constitué par 200 µl de méthanol. La capacité réductrice des extraits a été exprimée en milligrammes équivalents d'acide ascorbique par gramme d'extraits (EAA/g extrait).

I.10. Analyse statistique des résultats

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

Résultats et Discussion

II. Résultats et Discussion

II.1. Rendement d'extraction

L'optimisation de l'extraction des composés phénoliques et des activités antioxydantes à partir des feuilles de *C. clementina* a été étudiée en utilisant la méthodologie de surface de réponse (MSR). Cette dernière permet d'étudier l'influence de chacun des paramètres (solvant, temps, etc.) et d'analyser l'interaction entre ces facteurs.

La méthode de surfaces de réponse (MSR) est une technique visant à déterminer les variations de la réponse vis-à-vis des facteurs d'influences significatives ; elle s'est révélée être un outil important pour déterminer les effets de chaque facteur et les interactions entre eux, ce qui permet de traiter l'optimisation efficacement. Les procédures de MSR impliquent une stratégie expérimentale, des méthodes mathématiques et inférence statistique, qui permettent aux utilisateurs de mener une exploration empirique efficace du système étudié.

La MSR peut être appliquée à tout système qui possède les éléments-clés suivants : (1) un critère d'efficacité mesurable à l'échelle continue (exemple : le temps d'extraction) et (2) des variables indépendantes quantifiables incontrôlables, qui affectent les performances du système (telles que le solvant et la méthode de séchage). Donnée dans ces conditions, la MSR propose des techniques permettant de trouver la réponse optimale du système de manière efficace **(Krishnaiah et al., 2014) ; (Goupy et Creighton, 2006)**.

Le principal avantage de la MSR est que le montant des données nécessaires à l'évaluation, à l'analyse et à l'optimisation réduit considérablement le nombre d'expériences nécessaires. La MSR est une méthode plus rapide et plus économique pour recueillir des résultats de recherche que l'expérience classique à une variable à la fois. La méthode de surface de réponse nécessite trois étapes :

- La construction du plan expérimental,
- La modélisation de la réponse,
- Les représentations graphiques,

Les plans utilisés dans le cadre d'une étude de MSR sont des plans quadratiques tels que les plans centraux composites (Box-Wilson) ou les plans de Box-Behnken. La modélisation de la réponse est réalisée à l'aide de techniques de régression qui permettent de relier une réponse (y) à un ensemble de facteurs x_i soit :

$$Y = x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$$

L'optimisation de l'extraction des principes actifs des feuilles de *C. clementina* par la MSR est étudiée suivant le modèle de *Box-Behnken* se basant sur la maximisation des rendements comme des variables de réponses, Trois paramètres (variables indépendantes), la concentration du solvant (Ethanol 40-80 %), la ration solide/liquide (1/2-1/10) et le temps de macération (30-180 min) sont étudiés. Les gammes (les extrémités inférieures et supérieures) de chaque variable indépendante sont déterminées en se basant sur les résultats de la littérature,

Les niveaux des facteurs, les valeurs mesurées et prédites des rendements d'extractions sont représentées dans le (Tableau n IV).

Tableau IV : Construction du plan expérimental.

N°	Temps (min)	Ration solide / liquide (g / mL)	Concentration Ethanol / eau (%)	Valeurs réels (%)	Valeurs prédites (%)	Ecart-types
1	180	0,15	80	12,80	13,11	-0,3125
2	30	0,15	80	23,30	18,11	5,19
3	105	0,1	80	21,70	21,22	0,4843
4	105	0,2	80	9,70	11,84	-2,14
5	30	0,1	60	18,90	21,14	-2,24
6	180	0,1	60	11,30	16,14	-4,84
7	105	0,15	60	14,20	14,87	0,6657
8	105	0,15	60	15,70	14,87	0,8343
9	105	0,15	60	16,56	14,87	1,69
10	180	0,2	60	8,00	6,76	1,24
11	30	0,2	60	9,30	11,67	-2,46
12	180	0,15	40	13,70	9,79	3,91
13	30	0,15	40	14,30	14,79	-0,4875
14	105	0,2	40	6,80	8,52	-1,71
15	105	0,1	40	19,40	17,89	1,51

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent une influence de la concentration de solvant sur le rendement d'extraction, Il s'avère que l'utilisation du l'éthanol à 80 % (avec une ration de 1/6,65 et un temps de macération de 30 min) est la meilleure combinaison pour l'extraction des composés phénoliques (23,30), Cette variation du rendement est due probablement à la différence de polarité des composés existant dans la poudre des feuilles de *C. clementina* (Naczk & Shahidi, 2004).

Cependant, les valeurs prédites indiquent que la concentration idéale du l'éthanol doit être égale ou au voisinage de 60 % pour donner le rendement le plus important, Par contre le rendement le plus faible a été obtenue lorsque le milieu d'extraction est composé de 40 % de solvant, une ration solide/liquide de ½ avec un temps d'extraction de 105 min.

D'un autre côté, le temps de contact entre le solvant et le matériel végétal peut influencer la libération progressive de composés à partir de la matrice végétale vers le solvant, et donc cela influence l'efficacité de l'extraction (Michiels, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommès, 2012). Par contre, un temps de contact prolongé n'améliore pas toujours l'efficacité de l'extraction en favorisant l'oxydation des composés phénoliques. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par plusieurs auteurs (Chirinos, Rogez, Campos, Pedreschi, & Larondelle, 2007).

Les résultats obtenus indiquant l'accord entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites (Tableau IV) Le graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues (Figure 16) montre que les valeurs des modèles concordent avec les réponses mesurées, toutes les valeurs des rendements appartiennent à l'intervalle de confiance.

L'analyse de la Variance (ANOVA) permet de calculer un paramètre statistique très utile qui est le coefficient de détermination (R^2). Ce paramètre statistique est le rapport de la somme des carrés des réponses calculées (corrigées à la moyenne), La valeur retrouvée de ce coefficient de détermination qui est de $R^2 = 0,7305$, indique une bonne corrélation entre les valeurs retrouvées dans notre étude et les valeurs prédite. En revanche on note un écart-type supérieure à 3 pour l'extrait 2 et 6 ce qui est due probablement aux erreurs de manipulation.

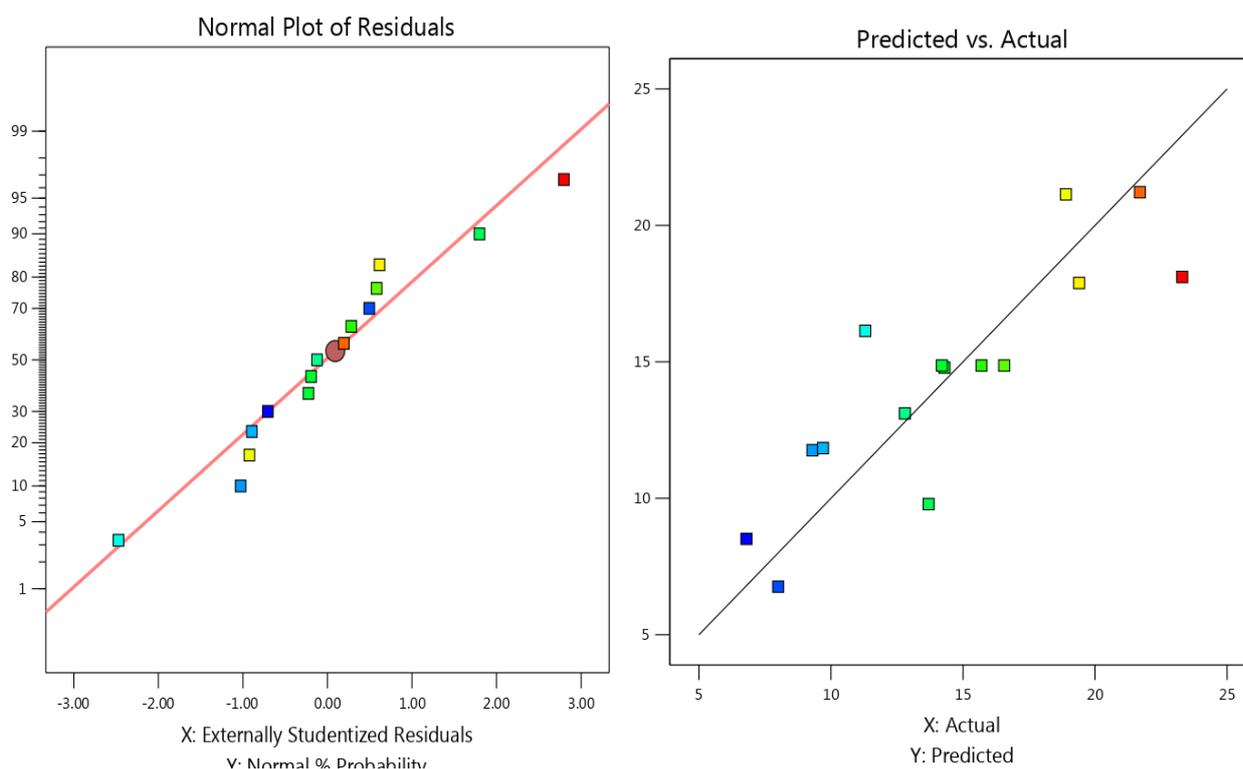


Figure 16 : Comparaison entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales obtenus avec les extraits de *C. clementina*.

II.2. Teneur en composés phénoliques

II.2.1. Teneur en polyphénols

Les teneurs en polyphénol totaux (TPT) des extraits éthanoliques de *C. clementina* ont été évalués selon la méthode colorimétrique (Folin-Ciocalteu) utilisant l'acide gallique comme un standard.

Les taux en composés phénoliques dans les extraits des feuilles de citrus obtenus (**Figure 17**) montrent que les feuilles de *C. clementina* renferment des teneurs en polyphénols non négligeables au vu de ce qui est rapporté en littérature, ces taux varient de 21,77 mg EAG / g MS à 92,30 mg EAG / g MS.

Au vu des résultats obtenus, on remarque que l'extrait 11 renferme la teneur la plus élevée ($92,30 \pm 2,48$ mg EAG / g MS) suivie de celle de l'extrait 3 avec un taux de $91,82 \pm 3,91$ mg EAG / g MS. En revanche l'extrait qui présente le taux le plus faible en teneur en polyphénols parmi tous les extraits est le N° 14 avec une teneur de $21,77 \pm 0,43$ mg EAG / g MS.

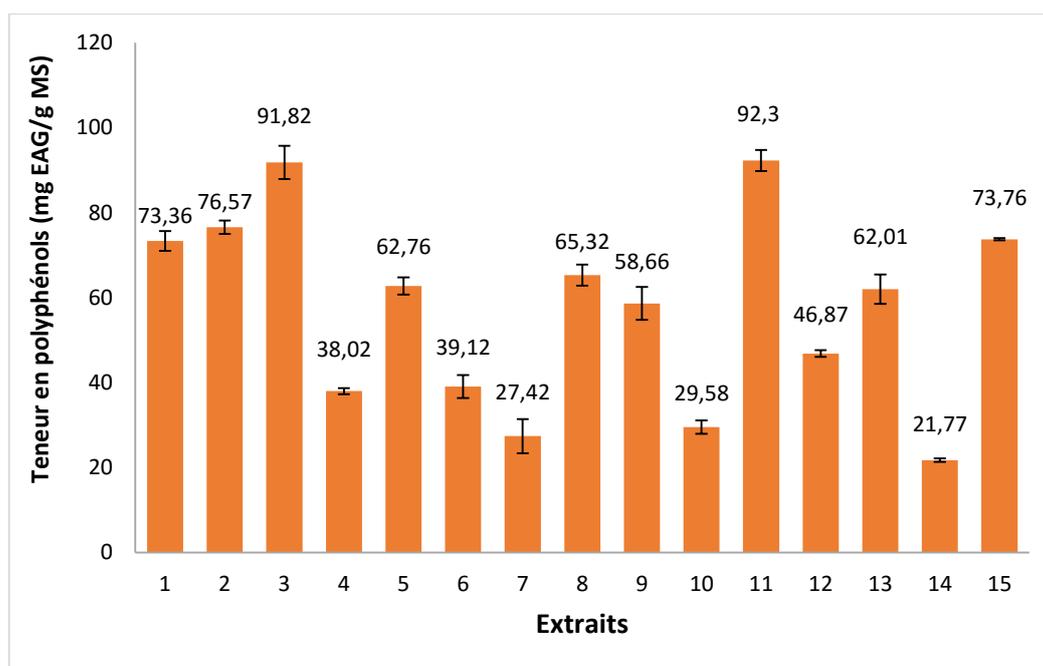


Figure 17 : Teneur en polyphénols totaux des extraits éthanolique des feuilles de *C. clementina*. Les résultats sont la moyenne de 3 essais.

Les résultats obtenus sont largement supérieurs à ceux rapportés par (Muthiah, Umamaheswari, & Asokkumar, 2012) qui ont montré que la teneur en composés phénoliques totaux dans les extraits de *C. aurantium*, *C. limetta* et de *C. limon* varie entre 07,39 et 33,05 mg / g dans l'ordre suivant : *C. aurantium* > *C. limetta* > *C. limon*,

De plus, les taux de polyphénols dans nos extraits éthanoliques de feuille de *C. clementina* obtenue avec la combinaison des trois paramètres (temps d'extraction, ration solide/liquide, pourcentage de solvant) varient considérablement avec la variation de ces paramètres.

La combinaison qui nous a permis d'avoir le taux le plus important c'est 80 % d'éthanol avec une ration 1/5 avec un temps de macération de 30 min.

Ces concentrations sont plus élevées que celles d'autres espèces de citrus comme *C. medica* vr, *Diamante* (Menichini et al., 2011) ou *C. sinensis* (Bejar, Mihoubi, & Kechaou, 2012), ainsi que celle de (Khettal et al., 2017).

Cette variation dans les concentrations des extraits est influencée par la variation des trois paramètres utilisés. De plus, plusieurs autres facteurs peuvent influencer les taux des composés phénoliques tels que la présence de certains groupements chimiques (l'acide ascorbique, les acides organiques, les sucres, les amines aromatiques), qui peuvent également réagir avec le réactif de Folin- Ciocalteu (Ghafar, Prasad, Weng, & Ismail, 2010), mais aussi la période de la récolte et le type de l'espèce (Makkar, Singh, & Dawra, 1988), le mode de conservation des

substrats d'extraction et le degré de maturation des feuilles (Sharma, Goswami, Singh, Chhonkar, & Singh, 2001).

II.2.2. Teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes sont l'un des groupes les plus répandus des métabolites secondaires chez les plantes. Les résultats du dosage des flavonoïdes dans les extraits de feuilles de *C. clementina* présentés dans la (Figure 18) montrent que le taux des flavonoïdes varie selon la variation de trois paramètres étudiés. La teneur en flavonoïde la plus importante obtenue est celle de l'extrait 11 avec un taux de $53,33 \pm 0,18$ mg EQ / g MS, suivi de l'extrait 2 ($25,11 \pm 1,52$ mg EQ / g MS), alors que l'extrait 1 et 3 ont la même teneur avec un taux de 21 mg EQ / g MS. Par contre l'extrait qui a présenté la teneur la moins élevée est celle de l'extrait 14 avec un taux de $4,18 \pm 0,18$ mg EQ / g MS.

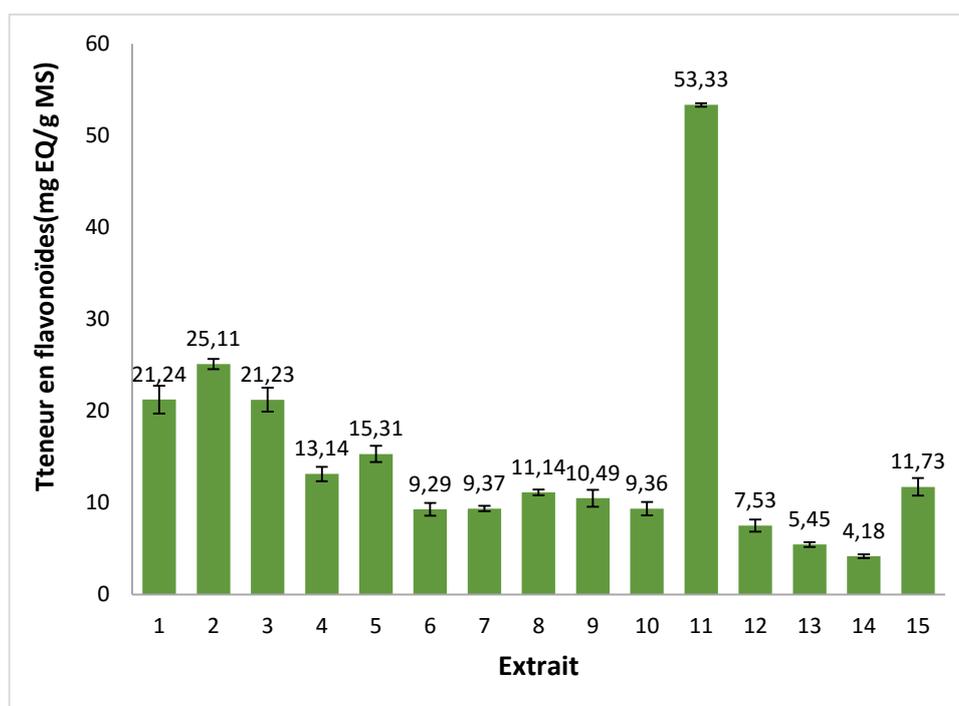


Figure 18 : Teneur en flavonoïdes dans extraits éthanolique des feuilles de *C. clementina*. Les résultats sont la moyenne de 3 essais.

Les résultats obtenus ont utilisé une concentration de l'éthanol à 80 % sont supérieures à celles rapporté par (Khettal et al., 2017) qui ont utilisé l'eau et le méthanol comme solvant d'extraction ($46,248 \pm 2,583$ et $07,99 \pm 0,417$ mg EQ / g MS, respectivement). De plus nos résultats indiquent que les feuilles de *C. clementina* renferment des concentrations en flavonoïdes plus importantes que les autres feuilles de citrus (*C. aurantiifolia*, *C. aurantium*, *C. limetta* et de *C. limon*).

Il semblerait que dans les extraits éthanoliques, les flavonoïdes comme polyphénols soient majoritaires pour tous les extraits étudiés. Ainsi, la proportion des polyphénols en flavonoïdes dans les extraits éthanoliques de feuilles de *C. clementina* est comprise entre 57,77 % et 32,79 % pour les extraits 11 et 2.

Les résultats obtenus concernent les proportions de flavonoïdes dont les polyphénols totaux sont plus importants que ceux rapportés par des études antérieures comme celle de **(Bougandoura & Bendimerad, 2013)** qui ont déduit que les flavonoïdes représentent 43,24% des phénols totaux dans les extraits méthanoliques, par contre, ce taux ne dépasse pas 24,84 % dans les extraits aqueux.

Bien que les résultats obtenus tendent à dire que les polyphénols des feuilles de citrus solubles dans l'éthanol sont à majorité des flavonoïdes. Des études rapportées par **(Muthiah et al., 2012)** suggèrent que les proportions des flavonoïdes par rapport aux polyphénols totaux dépendent à la fois de l'espèce de citrus utilisé, mais aussi de la partie étudiée.

Parmi les polyphénols et flavonoïdes à large distribution dans les citrus : la rutine ($362,85 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{g MS}$), la quercitine ($185,37 \pm 0,11 \mu\text{g} / \text{g MS}$) et la naringine ($688,11 \pm 0,05 \mu\text{g} / \text{g MS}$), trouvés dans les extraits méthanoliques des fleurs de *C. aurantium* **(Karimi, Oskoueian, Hendra, Oskoueian, & Jaafar, 2012)**, tandis que le flavonoïde le plus abondant dans les feuilles du citronnier est l'hésperidine **(Del Río et al., 2004)**.

II.2.3. Teneur en flavonols

La teneur en flavanols totaux de nos extraits a été estimée par la méthode d'acétate de sodium et la concentration des flavanols a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine **(Annexe VII.3)**. L'équation linéaire obtenue à partir de cette courbe est $Y = 0,0088 x$ avec $R^2 = 0,9946$.

Les résultats obtenus **(Figure 19)**, indiquent que l'extrait 11 renferme le taux le plus important par rapport aux autres extraits, suivi par l'extrait 8 avec une teneur de $57,33 \pm 1,72$ et $51,07 \pm 1,58 \text{ mg EQ} / \text{g MS}$ respectivement. En revanche les extraits 7 et 4 sont les moins riches en flavonols avec des teneurs de l'ordre de $15,92 \pm 3,15$ et $18,46 \pm 2,41 \text{ mg EQ} / \text{g MS}$ respectivement.

Cependant, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la littérature, car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité des comparaisons entre les études (Oroian & Escriche, 2015).

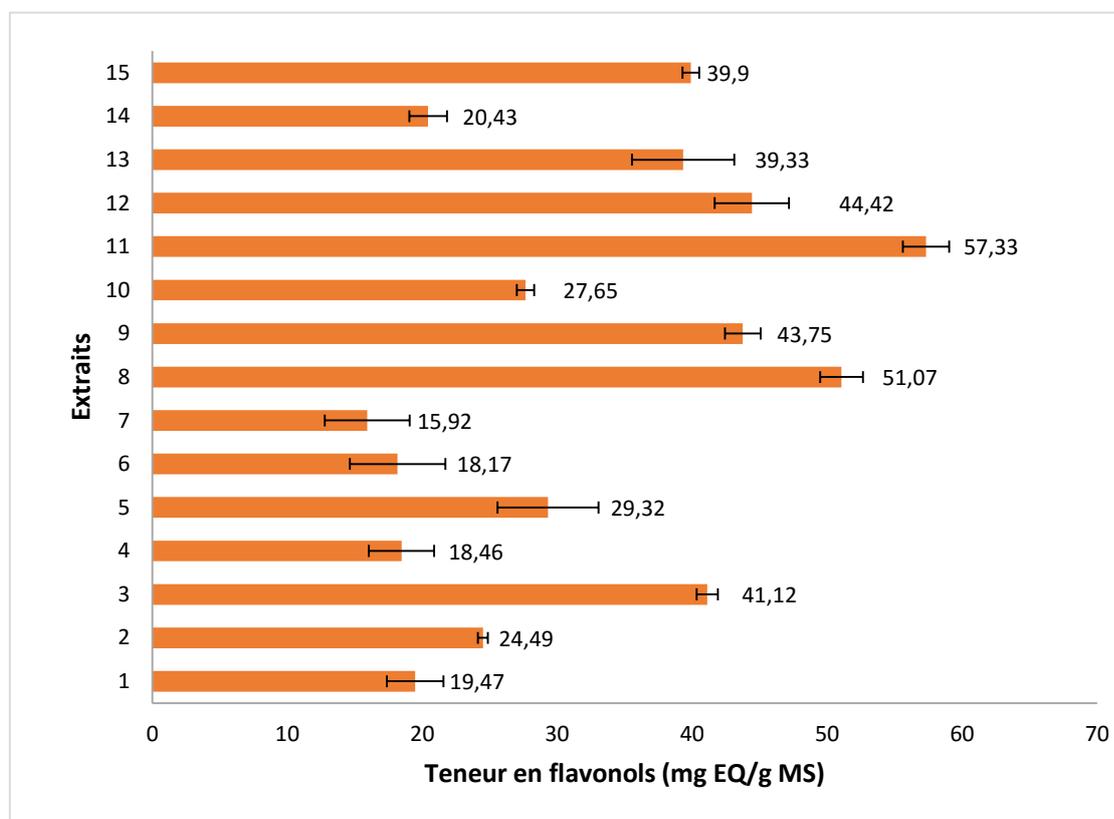


Figure 19 : Teneurs en flavonols des extraits de *C. clementina*. Les valeurs portant). Les résultats sont la moyenne de 3 essais.

II.2.4. Teneurs en pigments liposolubles

Le dosage des pigments liposolubles (caroténoïdes, lycopène et chlorophylle) des extraits étudiés a indiqué que la chlorophylle (a) était le pigment prédominant chez les feuilles de *C. clementina* avec une concentration de $49,40 \pm 4,26$ mg / g MS, suivies par lycopène avec $36,13 \pm 2,87$ mg / g MS. Alors que la chlorophylle b était le pigment liposoluble le moins abondant dans nos extraits ($7,59 \pm 0,01$ mg / g MS).

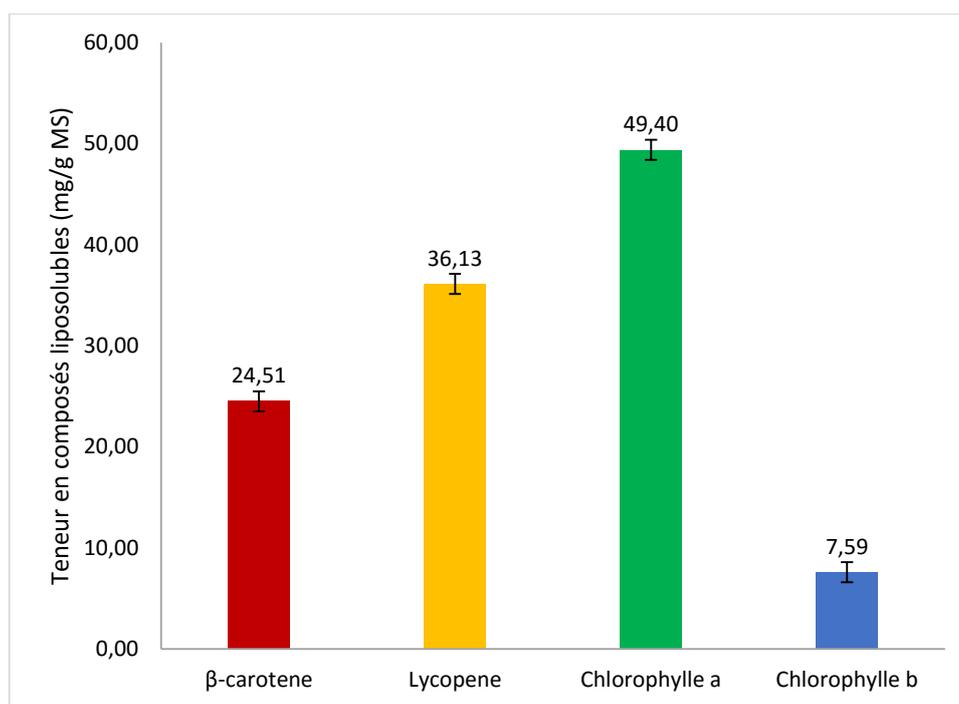


Figure 20 : Teneurs pigments liposolubles des extraits de *C. clementina*. Les résultats sont la moyenne de 3 essais.

Les pigments liposolubles jouent un rôle très important dans la lutte de l'organisme contre diverses maladies, car ils sont connus pour avoir une activité antioxydante et réduire le risque de maladies causées par les radicaux libres, comme certains types de cancer (**Barros et al., 2013**).

La chlorophylle est également connue pour son implication dans la protection des membranes mitochondriales contre les dommages oxydatifs provoqués par divers radicaux libres à travers l'inhibition de la peroxydation lipidique (**Lecerf, Luc, & Fruchart, 1994**).

La variation de la teneur en antioxydants dans les différents extraits peut s'expliquer par le changement des paramètres expérimentaux. De plus, cette variation peut également être affectée par plusieurs facteurs, tels que le moment de la récolte, la nature du solvant utilisé, la présence et l'interaction d'autres groupements chimiques ainsi que la partie de la plante utilisée pour l'extraction (**Nacz & Shahidi, 2004**).

II.3. Evaluation des activités antioxydantes des extraits de *C. clementina*

Plusieurs études ont illustré l'importance des antioxydants naturels dans les domaines de l'industrie agroalimentaire, pharmaceutiques et cosmétique (**Kong et al., 2010**).

II.3.1. Activité de piégeage du radical DPPH

L'activité anti radicalaire est calculée par la méthode du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), cette méthode est fréquemment utilisée pour sa simplicité. Elle est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydante qui donne un hydrogène ou un électron.

Les résultats de ce test ont montré que les extraits éthanoliques de *C. clementina* présentent des capacités de piégeages des radicaux de DPPH variables selon la variation des paramètres expérimentaux (**Figure 21**).

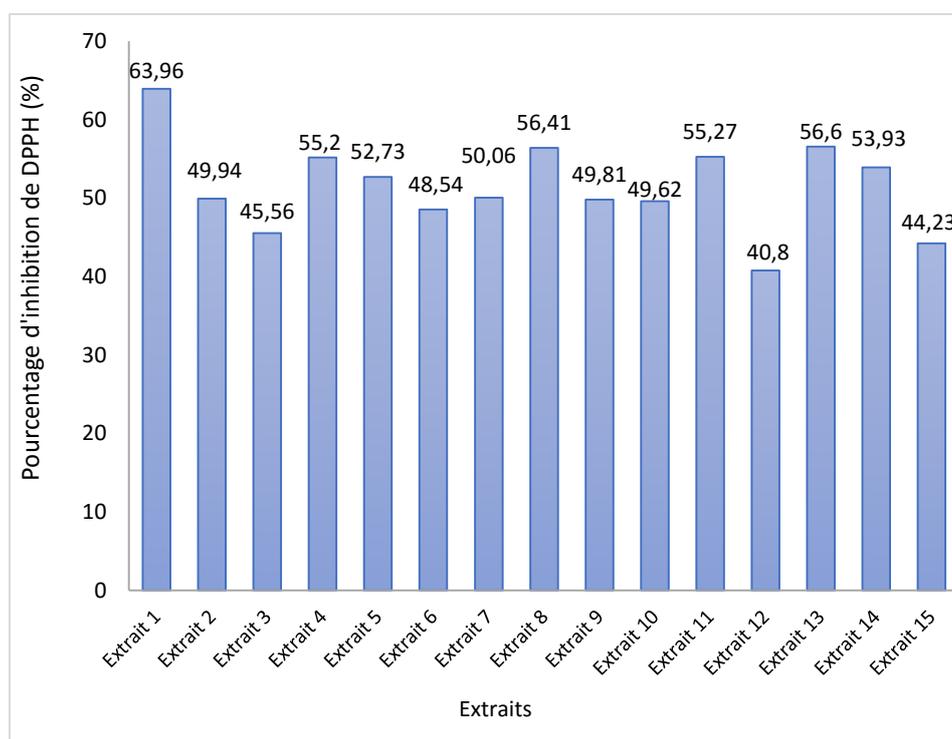


Figure 21 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH des extraits de *C. clementina* avec une concentration de 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Les pourcentages de piégeage varient de 40,80 % à 63,96 % avec seulement une concentration de 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Selon les résultats obtenus on remarque que les extraits présentent des taux d'inhibition très proches entre elles. L'extrait éthanolique 1 de *C. clementina* avait le taux de piégeage le plus élevé avec un pourcentage de 63,96 %, suivi des extraits 13 et 8 avec des taux d'inhibitions de 56,60 et 56,41 respectivement, tandis que l'activité la plus faible a été observée dans l'extrait 12 (40,80 %).

Toutefois, cette activité scavenger de nos extraits reste largement inférieure à celle obtenue avec l'acide gallique et la quercétine. Ces deux polyphénols purs utilisés comme référence présentent un pouvoir piégeur du DPPH dépassant les 90 % pour une concentration de 0,01 mg/mL (**Annexe VII.4**).

Comparons nos résultats avec ceux rapportée par (**Khettal et al., 2017**) qui ont travaillé sur les extraits aqueux et méthanoliques de plusieurs variétés de citrus, on remarque que nos extraits sont nettement meilleurs. Nous constatons également que nos extraits sont plus efficaces que ceux rapportés par (**Muthiah et al., 2012**), qui a travaillé sur les extraits de feuilles de *C. limetta* et de *C. aurantium* (C50 de 0,148 et 0,142 mg/mL respectivement), ainsi que ceux rapportés par (**Marzouk, 2013**) pour *C. aurantium* (EC50 = 0,190 mg / mL).

Les Résultats obtenus sont dus probablement à la richesse de nos extraits en métabolites secondaires de type phénolique car les polyphénols et les flavonoïdes sont de bons donneurs d'électrons et/ou d'hydrogène, et que leur pouvoir antioxydant varient d'un composé à l'autre (**Nacz & Shahidi, 2004**).

Pour une même espèce végétale, la variabilité dans les résultats de l'activité anti-radicalaire du DPPH rapportés peut s'expliquer par la nature de la partie utilisée de la plante, son degré de maturation, mais aussi par le procéder d'extraction applique (**Xu, Ye, Liu, Ma, & Chen, 2008**). L'influence du solvant d'extraction sur les résultats du test DPPH.

II.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le test phosphomolybdène

Le test de phosphomolybdène permet d'évaluer la capacité antioxydante qui est traduit par la formation d'un complexe phosphomolybdène. L'estimation de cette activité des extraits éthanoliques est exprimée en équivalence d'acide ascorbique. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme d'équivalent de l'acide ascorbique par un gramme de l'extrait (mg EAA / MS d'extrait). Chaque essai a été répété trois fois et les résultats sont illustrés dans la (**Figure 22**).

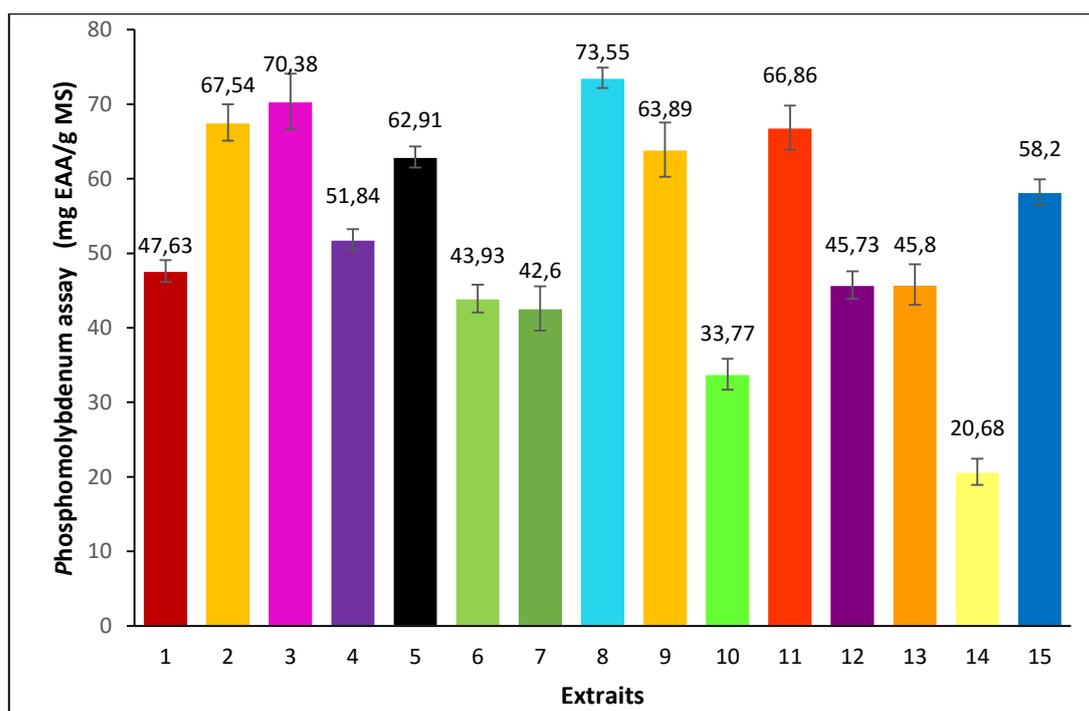


Figure 22 : Pouvoir antioxydant total du test au phosphomolybdène par les extraits de *C. clementina*. Les résultats sont la moyenne de 3 essais.

Les extraits éthanoliques 8 et 3 des feuilles de *C. clementina* ma étaient les plus efficaces, avec des valeurs de $73,55 \pm 1,38 \mu\text{g EAA/g MS}$ et de $70,38 \pm 3,73 \mu\text{g EAA/g MS}$ respectivement. En revanche, l'extrait 14 était le moins efficaces des extraits étudiés.

Plusieurs études ont montré que l'origine de l'activité antioxydante des extraits de plantes est due à la présence des composés phénoliques, et que ses pouvoirs proviennent de leurs groupements hydroxyles. De plus, la position des groupes -OH et -OCH₃ peut augmenter ou diminuer cette efficacité. En particulier, les composés avec un second groupe -OH en position ortho ou para qui ont montré une activité antioxydante plus élevée qu'en position méta (Muhammad & Haddix, 2016 Muhammad & Haddix, 2016).

Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leur propriété thérapeutique.

La présente étude a été consacré à l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques du *citrus clementina* qui représente une source des substances naturelles bioactives très important.

Ce travail de recherche avait pour objectif d'évaluer qualitativement et quantitativement les composés phénoliques contenus dans les feuilles *C. clementina* de région de Bejaia et nous nous sommes intéressés sur le dosage des composés phénoliques, flavonoïdes, flavanols et l'étude des activités antioxydantes (activité anti radicalaire DPPH, activité du test phsphomolybdène).

Pour une efficacité d'extraction des composés bioactifs à partir de la poudre feuilles de *C. clementina* la technique de la macération a été utilisée. L'étude vise à l'optimisation des meilleures conditions de l'extraction des composés phénoliques et de l'activité antioxydante par application de la méthodologie de surface de réponse (MSR).

Notre étude a été effectuée pour évaluer l'effet de différents facteurs à savoir la concentration du solvant (éthanol 40%, 60%, 80%), la durée d'extraction (30 min, 105 min, 180 min) et le rapport solide/liquide (ratio : 1/2, 1/10), sur le rendement d'extraction, la teneur des polyphénols, flavonoïdes, flavonols ainsi que leur activité antioxydante, avec un degré de signification des données ($p < 0,05$).

Le rendement le plus élevé a été obtenu à un temps de 30 min, ration 1 / 6,65 (g / mL) et une concentration en éthanol 80% avec une teneur de 23,30 EAG/100 g de MS en PPT.

L'optimisation des conditions optimales d'extraction a été réalisée par le model Box-Behnken (BBD) pour étudier les effets d'interaction des trois variables étudiées (le temps d'extraction, la concentration en éthanol ainsi que la ration).

L'analyse de la régression linéaire a montré que 96 % de la variation était expliqué par les modèles. Une valeur insignifiante de la probabilité P pour le manque d'ajustement a confirmé la validité des modèles.

Les valeurs expérimentales sont conformes à celles prédites, indiquant la pertinence du modèle et le succès de MSR pour l'optimisation des conditions d'extraction des PPT, teneur en flavonoïdes, teneur en flavonols et l'évaluation de l'Activité Antioxydante à partir de la poudre des feuilles de *C. clementina*. En perspective, il serait très intéressant d'approfondir cette étude par :

La caractérisation des composés bioactifs des extraits obtenus.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire, microbienne...etc des extraits.

Et l'élargissement de l'étude sur d'autres feuilles d'agrumes.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Abudunia, A.-M., Marmouzi, I., Faouzi, M., Ramli, Y., Taoufik, J., El Madani, N., . . . Ansar, M. (2017).** Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. *Journal de mycologie medicale*, 27(1), 90-97.
- Aroua, K., Kaydan, M. B., Achiri, T., & Biche, A. (2020).** The influence of the region and the host plant on population dynamics of *Parlatoria ziziphi* (Lucas)(Hemiptera: Diaspididae) in Mitidja (Algeria). *Eco. Env. and Conserv*, 26(1), 333-340.
- Aubert, B. (1994).** De nouveaux enjeux pour la production des mandarines et de leurs hybrides dans le Bassin méditerranéen. *Fruits*, 49(5-6), 340-343.
- Adjatin, A., Hounkpatin, A., Assogba, F., Djengue, W., Agbotta, P., Bénindicte, H., . . . Amouzou, K. (2018).** Phytochemical screening, antioxidant and cytotoxic activity of different morphotypes of *Corchorus olitorius* L. leaves in the central region of Benin Republic (West Africa). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 10(12), 195-203.
- Arima, H., Ashida, H., & Danno, G.-i. (2002).** Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(5), 1009-1014.
- Agbodan, K. A., Dotse, K., Koumaglo, K. H., & Saloufou, K. I. (2015).** Effets d'un acide fort sur la réaction de la DPPH avec deux huiles essentielles de deux plantes aromatiques acclimatées au Togo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(6), 2932-2939.
- Aoudache, K., & Arib, D. (2019).** Caractérisation de l'huile essentielle de l'orange douce variété «Thomson» et évaluation de son activité antibactérienne et antioxydante. Université Mouloud Mammeri.

B

- Bachès, B., & Bachès, M. (2002).** *Agrumes: comment les choisir et les cultiver facilement*: Ulmer.
- Bassal, M. (2009).** Growth, yield and fruit quality of 'Marisol' clementine grown on four rootstocks in Egypt. *Scientia Horticulturae*, 119(2), 132-137.
- Berraf-Tebbal, A., Mahamedi, A. E., Aigoun-Mouhous, W., Špetík, M., Čechová, J., Pokluda, R., . . . Alves, A. (2020).** *Lasiodiplodia mitidjana* sp. nov. and other Botryosphaeriaceae species causing branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. *PloS one*, 15(5), e0232448.
- Bharti, S., Rani, N., Krishnamurthy, B., & Arya, D. S. (2014).** Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta medica*, 80(06), 437-451.
- Boughendjioua, H. (2019).** Activité antifongique de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles de *Citrus reticulata*. *Revue Nature et Technologie*, 11(1), 54-57.

Bar-Ya'akov, I., Tian, L., Amir, R., & Holland, D. (2019). Primary metabolites, anthocyanins, and hydrolyzable tannins in the pomegranate fruit. *Frontiers in plant science*, 10, 620.

Bouabid, B., El Yahyaoui, O., Sammama, A., Kerrouri, S., Abdellahi, L. O., Ouaziz, N. A., . . . Bengueddour, R. (2016). Screening phytochimique de deux variétés de pamplemousse: citrus paradisi yellow et blood/[Phytochemical screening to two grapefruit varieties: citrus paradisi yellow and blood]. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 17(2), 506.

Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2017). Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. *Phytothérapie*, 15(6), 379-383.

Barros, L., Alves, C. T., Dueñas, M., Silva, S., Oliveira, R., Carvalho, A. M., . . . Ferreira, I. C. (2013). Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Industrial Crops and Products*, 44, 104-110.

Buxeraud, J., & Faure, S. (2021). La vitamine C. *Actualités Pharmaceutiques*, 60(604), S24-S26.

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

Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*(9), 14.

C

Coste, M., Gattefosse, H., & Guillot, B. (1968). Utilisation des agrumes dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. *Fruits*, 23(10), 531-541.

Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: an overview. *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*, 1, 1-25.

Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical journal*, 91(1), 107-110.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, 55(2), 217-225.

D

Doumbia, S., Fofie, Y., Haidara, M., Denou, A., & Sanogo, R. (2021). Détermination des teneurs des constituants chimiques et activités antiradicalaires d'extraits de plantes utilisées

dans le traitement traditionnel des affections hépatiques au mali. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 20(2), 80-88.

Dransfield, G., Guest, P., Lyth, P., McGarvey, D., & Truscott, T. (2000). Photoactivity tests of TiO₂-based inorganic sunscreens: Part 1: Non-aqueous dispersions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 59(1-3), 147-151.

Del Río, J., Fuster, M., Gómez, P., Porras, I., Garcia-Lidón, A., & Ortuño, A. (2004). Citrus limon: A source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food chemistry*, 84(3), 457-461.

E

El-Otmani, M., Ait-Oubahou, A., & Zacarías, L. (2011). Citrus spp.: orange, mandarin, tangerine, clementine, grapefruit, pomelo, lemon and lime *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits* (pp. 437-516e): Elsevier.

F

Ferenčić, D., Gluhić, D., & Dudaš, S. (2016). Hranjiva vrijednost mandarina (Citrus reticulata Blanco, Citrus nobilis Lour). *Glasnik zaštite bilja*, 39(3), 46-52.

G

Gliszczyńska-Świgło, A. (2006). Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food chemistry*, 96(1), 131-136.

Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, Y.-S., Haruenkit, R., Lojek, A., Číž, M., . . . Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food chemistry*, 74(3), 309-315.

Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M., Bousselfela, H., & Oueld-Mokhtar, S. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de Marrubium deserti de Noé. *Phytothérapie*, 13(2), 118-129.

Goupy, J., et Creighton, L. (2006). Introduction to experimental designs-3rd edition-Book + CD-Rom: Hachette.

Ghafar, M., Prasad, K. N., Weng, K. K., & Ismail, A. (2010). Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *African Journal of Biotechnology*, 9(3).

H

Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., . . . Sebei, H. (2010). Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food chemistry*, 123(4), 1098-1104.

Huet, R. (1982). Constituants des agrumes à effet pharmacodynamique: les citroflavonoides. *Fruits*, 37(4), 267-271.

J

Jayaprakasha, G., & Patil, B. S. (2007). In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food chemistry*, 101(1), 410-418.

Jimoh, F., Adedapo, A., & Afolayan, A. (2010). Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonorus*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 964-971.

K

Kerboua, M. (2002). L'agrumiculture en Algérie. *Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus*, 21-26.

KunduSen, S., Gupta, M., Mazumder, U. K., Haldar, P. K., Saha, P., & Bala, A. (2011). Antitumor activity of *Citrus maxima* (Burm.) Merr. leaves in Ehrlich's Ascites Carcinoma cell-treated mice. *International Scholarly Research Notices*, 2011.

Khan, M. K., & Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 85-104.

Khanbabaee, K., & Van Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18(6), 641-649.

Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian, A., & Jaafar, H. Z. (2012). Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules*, 17(2), 1203-1218.

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).

Kong, K.-W., Khoo, H.-E., Prasad, K. N., Ismail, A., Tan, C.-P., & Rajab, N. F. (2010). Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules*, 15(2), 959-987.

Krishnaiah, Y. S., Xu, X., Rahman, Z., Yang, Y., Katragadda, U., Lionberger, R., . . . Khan, M. A. (2014). Development of performance matrix for generic product equivalence of acyclovir topical creams. *International journal of pharmaceuticals*, 475(1-2), 110-122.

L

Liu, Y., Heying, E., & 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.

Lo Piero, A. R. (2015). The state of the art in biosynthesis of anthocyanins and its regulation in pigmented sweet oranges [(*Citrus sinensis*) L. Osbeck]. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4031-4041.

Lobstein, A., & Marinier, F. (2016). Huile essentielle de Citron. *Actualités Pharmaceutiques*, 55(561), 57-60.

Lotmani, B., Kolai, N., Berkani, A., & Bouzouina, M. (2008). Contribution à l'étude de l'influence des composés phénoliques des feuilles de Citrus sur l'activité des adultes de

Phyllocnistis citrella Stainton (Lepidoptera; Gracillariidae). *Recherche agronomique*, 22, 59-66.

Loe, G. E., Ngaba, G. P., Kamdom, M., Mpondo, E. M., & Dibong, S. D. (2018). Evaluation des activités anti-inflammatoire et antiradicalaire de l'extrait au vin de palme des feuilles de *Phragmanthera capitata* (Sprengel) S. Balle (Loranthaceae) récoltées sur *Psidium guajava* au Cameroun. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(1), 233-243.

Lecerf, J., Luc, G., & Fruchart, J. (1994). Vitamine E, antioxydants et athérosclérose. *La Revue de médecine interne*, 15(10), 641-649.

LIME, C. E. (2022). CITRON ET LIME. *Mars*.

M

Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P., & Manian, S. (2008). The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food chemistry*, 107(3), 1000-1007.

Matteo, V., & Esposito, E. (2003). Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 2(2), 95-107.

Moretti, C., & Aubertin, C. (2007). Stratégies des firmes pharmaceutiques: la bioprospection en question. *Les marchés de la Biodiversité. Paris: IRD*, 27-54.

Manner, H. I., Buker, R. S., Smith, V. E., Ward, D., & Elevitch, C. R. (2006). Citrus (citrus) and Fortunella (kumquat). *Species profile for pacific island agroforestry*, 2, 1-35.

Mohib, M., Afnan, K., Paran, T. Z., Khan, S., Sarker, J., Hasan, N., . . . Sagor, A. T. (2018). Beneficial role of citrus fruit polyphenols against hepatic dysfunctions: a review. *Journal of dietary supplements*, 15(2), 223-250.

Manthey, J. A., Grohmann, K., Berhow, M. A., & Tisserat, B. (2000). Changes in citrus leaf flavonoid concentrations resulting from blight-induced zinc-deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(4), 333-343.

Muscatello, M. R. A., Zoccali, R. A., & Bruno, A. (2018). Citrus Fruit polyphenols and flavonoids: Applications to psychiatric disorders *Polyphenols: mechanisms of action in human health and disease* (pp. 119-131): Elsevier.

Martins, A. C., Bukman, L., Vargas, A. M., Barizão, É. O., Moraes, J. C., Visentainer, J. V., & Almeida, V. C. (2013). The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: optimising the conditions using the response surface methodology. *Food chemistry*, 138(1), 574-580.

Makkar, H. P., Singh, B., & Dawra, R. (1988). Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *British Journal of Nutrition*, 60(2), 287-296.

Marzouk, B. (2013). Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed research international*, 2013.

Menichini, F., Loizzo, M. R., Bonesi, M., Conforti, F., De Luca, D., Statti, G. A., . . . Tundis, R. (2011). Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1549-1555.

Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommès, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food chemistry*, 130(4), 986-993.

Muthiah, P., Umamaheswari, M., & Asokkumar, K. (2012). In vitro antioxidant activities of leaves, fruits and peel extracts of *Citrus*. *International Journal of Phytopharmacy*, 2(1), 13-20.

Muhammad, G. E., & Haddix, M. (2016). Centering Black girls' literacies: A review of literature on the multiple ways of knowing of Black girls. *English Education*, 48(4), 299-336.

N

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*, 83(3), 770-803.

Naczk, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.

Nagata, M., & Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39(10), 925-928.

Nagavani, V., Raghava, R., Ravi, K., & Raghava, R. (2010). In vitro screening of *Nyctanthes arbortristis* flowers for antioxidant activity and identification of polyphenols by RP-HPLC. *Pharmacologyonline*, 2, 57-78.

Naczk, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.

O

Ollitrault, P., Curk, F., & Krueger, R. (2020). Citrus taxonomy *The Genus Citrus* (pp. 57-81): Elsevier.

Oyedemi, S., Bradley, G., & Afolayan, A. (2010). In-vitro and-vivo antioxidant activities of aqueous extract of *Strychnos henningsii* Gilg. *African Journal of pharmacy and pharmacology*, 4(2), 070-078.

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.

P

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.

R

Rendeiro, C., Dong, H., Saunders, C., Harkness, L., Blaze, M., Hou, Y., . . . Spencer, J. P. (2016). Flavanone-rich citrus beverages counteract the transient decline in postprandial endothelial function in humans: A randomised, controlled, double-masked, cross-over intervention study. *British Journal of Nutrition*, 116(12), 1999-2010.

Rock, E., & Fardet, A. (2014). Les antioxydants des agrumes: action en solitaire ou matricielle? *Phytothérapie*, 12(2), 66-75.

Radojković, M., Zeković, Z., Jokić, S., Vidović, S., Lepojević, Ž., & Milošević, S. (2012). Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, 50(2), 167-176.

Rihani, N. (1991). Valeur alimentaire et utilisation des sous-produits des agrumes en alimentation animale. *Options Méditerranéennes Série Séminaires*, 16, 113-117.

S

Satari, B., & Karimi, K. (2018). Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling*, 129, 153-167.

Savita, G. S. V., & Nagpal, A. (2012). Citrus diseases caused by Phytophthora species. *GERF bull biosci*, 3(1), 18-27.

Sharma, R., Goswami, A., Singh, C., Chhonkar, O., & Singh, G. (2001). Catecholase and cresolase activities and phenolic content in mango (*Mangifera indica* L.) at panicle initiation. *Scientia Horticulturae*, 87(1-2), 147-151.

T

Thermoz, J.-P., & Allain, Y.-M. (2014). *Les agrumes: un regard multiple, du culturel au culturel*. Paper presented at the Histoire et sciences du végétal: approches interdisciplinaires.

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

U

USDA, F. (2020). Citrus: World markets and trade: United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service.

V

Vashisth, T., & Kadyampakeni, D. (2020). Diagnosis and management of nutrient constraints in citrus *Fruit crops* (pp. 723-737): Elsevier.

W

Wang, T.-y., Li, Q., & Bi, K.-s. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 13(1), 12-23.

Weisburger, J. H. (2002). Lycopene and tomato products in health promotion. *Experimental Biology and Medicine*, 227(10), 924-927.

X

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. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 382-389.

Y

Yabrir, B., Guit, B., Houari, S., Tenoum, H., Touati, M., Adli, B., . . . Khader, M. (2019). *PhytoChem & BioSub Journal*.

Z

Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food chemistry*, 196, 885-896.

Annexes

Annexes

Annexe I : Appareillage et réactifs.

Appareillage

Tamis de marque « **RETSCH** »

Spectrophotomètre UV

Balance « **OHAUS** »

Bain marie « **P SELECTA** »

Vortex électrique

Agitateur

Etuve « **venticell** »

Vortex électrique

Solvants et réactifs

Folin-ciocalteu

Ethanol

Hexane

Acétone

Carbonate de sodium (Na_2CO_3)

2,2diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Acide gallique

Chlorure d'aluminium (AlCl_3)

Quercétine

Acide sulfurique

Phosphate de sodium

Molybdate d'ammonium

Acide ascorbique

Matériels du laboratoire

Éprouvette graduée

Porte-tubes à essai

Bécher

Papier filtre

Entonnoirs

Papier aluminium

Tubes à essai

Spatule

Fiole jaugée

Micropipette

Annexe II : préparation des solutions.

Solubilisation des extraits

(V) extrait + (V) éthanol

Dilution de réactif de Folin-ciocalteu

Folin-ciocalteu concentré.....1 ml

Eau distillée.....9 ml

Solution de carbonate du sodium (7,5%)

Carbonate du sodium7,5 g

Eau distillée.....100 ml

Solution d'acétate de sodium a 5%

Acétate de sodium.....5g

Eau distillée.....100 ml

Solution de chlorure d'aluminium ALCL₃ (2 %)

Chlorure d'aluminium.....2 g

Eau distillée.....100 ml

Solution de l'acide gallique

Acide gallique.....2 mg
Ethanol.....100 ml

Préparation de la solution de PPM

Préparation de l'acide sulfurique à 0,6 mM

Pour préparer la solution d'acide sulfurique, il faut calculer le volume initiale puis ajouter l'eau distillé jusqu'a le volume finale.

On a : $M = 17,8 \text{ M}$, $C1 = 0,6$

$V1 = 0,6 * 100 \text{ ml} / 17,8 \text{ M}$

$V1 = 3,37 \text{ ml}$

Puis dissoudre 3,37 g de l'acide sulfurique dans 100 ml d'eau distillée.

Préparation de phosphate de sodium à 28 mM

Pour préparer une solution de phosphate de sodium, il faut premièrement calculer sa masse. $m = 0,386 \text{ g}$

Puis dissoudre 0,386 g de Na_3PO_4 dans 100 ml d'eau distillée.

Préparation de molybdate d'ammonium à 4 mM

Pour préparer une solution de molybdate d'ammonium, il faut premièrement calculer sa masse. $m = 0,5 \text{ g}$

Puis dissoudre 0,5 g de molybdate d'ammonium dans 100 ml d'eau distillée.

Finalement pour préparer le tampon molybdate, on mélange les trois volumes de chaque solution (acide sulfurique, phosphate de sodium et molybdate d'ammonium)

Annexe III : Solubilisation des extrais.



Annexe IV : Résultats de dosage de polyphénols.



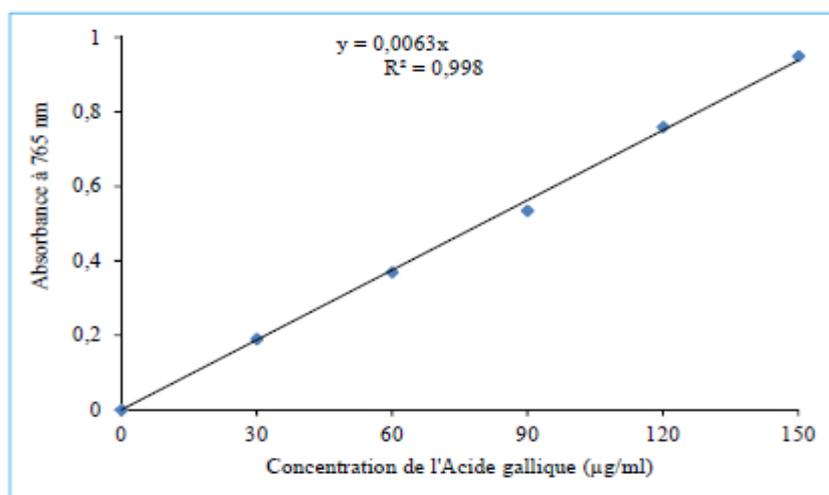
Annexe V : Résultats de dosage des flavanols.



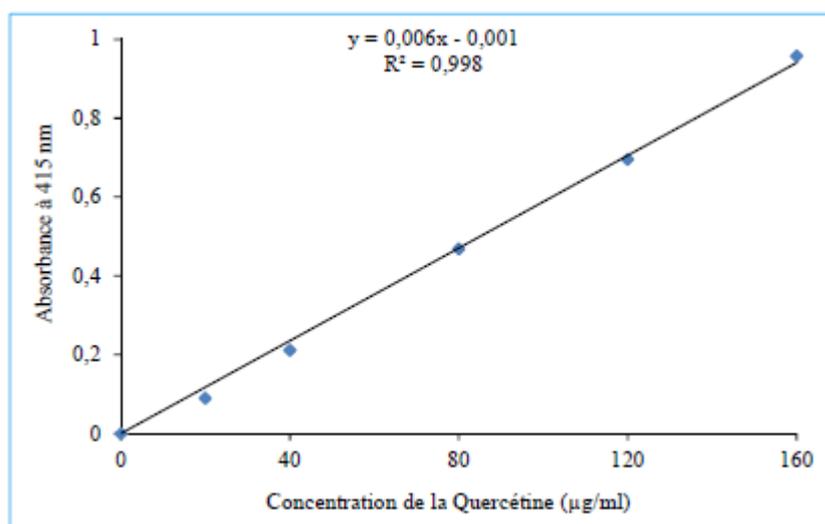
Annexe VI : Résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante par le test de phosphomolybdène.



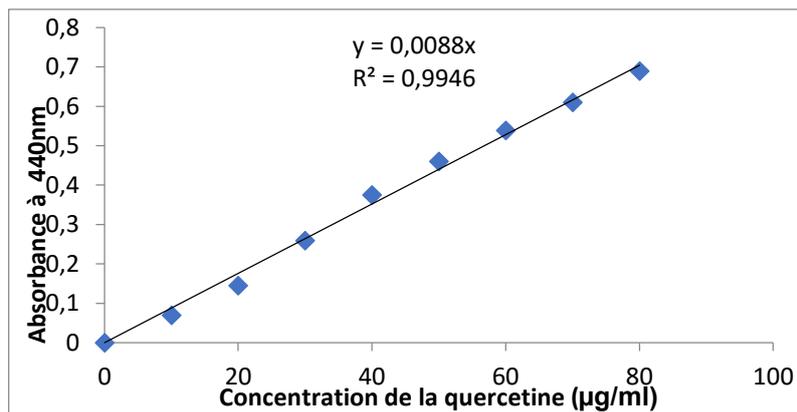
Annexe VII : Courbes d'étalonnage.



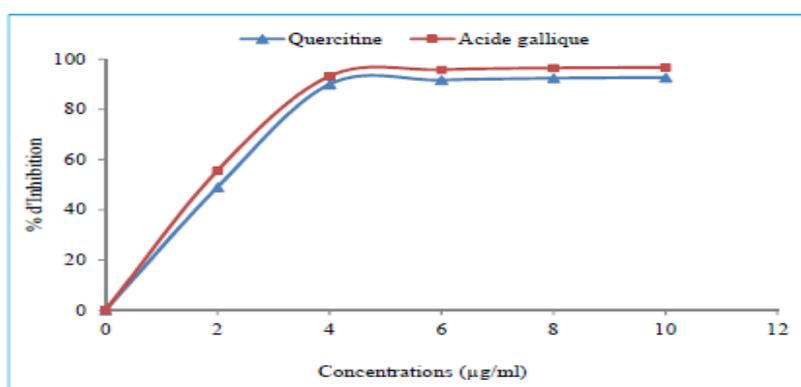
Annexe VII.1. : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols des extraits de *C. clementina*.



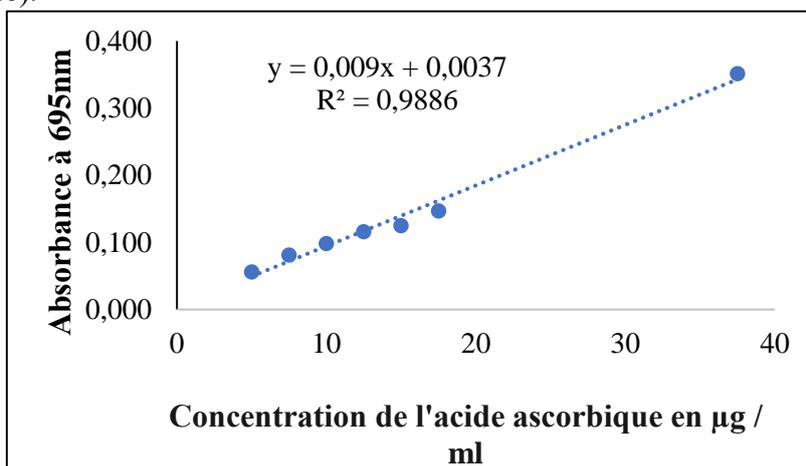
Annexe VII.2. : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes des extraits de *C. clementina*.



Annexe VII.3. : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonols des extraits de *C. clementina*.



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



Annexe VII.5 : Courbe d'étalonnage pour l'activité phosphomolybdène (acide ascorbique).

Résumé

Citrus clementina est un arbre qui appartenait à la famille des Rutacées. Dans cette étude l'extraction par l' macération a été utilisés pour extraire les composés phénoliques contenus dans les feuilles de *C. clementina*. Les conditions optimales d'extraction des composés phénoliques et l'activité antioxydante des feuilles de *C. clementina* ont été étudiées à l'aide de la méthodologie de surface de réponse (MSR). Le modèle Box-Behnken a été utilisé pour étudier les effets de trois variables indépendantes, temps d'extraction (30 à 105 min), la concentration en ethanol (40 à 80%) et la ration sur les réponses. L'analyse de régression a montré qu'environ 96% de la variation était expliquée par ce modèle. La valeur de la probabilité pour le manque d'ajustement était insignifiante, ce qui a confirmé la validité des modèles. L'analyse de la surface de réponse a montré que les paramètres d'extraction optimaux permettant d'optimiser l'extraction étaient 80% d'ethanol, 30 min et ration 1/6,65. Dans des conditions optimales, les valeurs expérimentales correspondantes pour les PPT et l'activité antioxydant étaient de $92,30 \pm 2,48$ mg EAG/100 g de MS et de 63,96% respectivement. Les valeurs expérimentales sont conformes à celles prédites, indiquant la pertinence du modèle et le succès de MSR dans l'optimisation des conditions d'extraction des PPT à partir feuilles de *C. clementina*.

Mot clé : Optimisation, Activité antioxydante, flavonoides, flavonols, DPPH.

Abstract :

Citrus clementina is a tree that belonged to the Rutaceae family. In this study maceration extraction was used to extract the phenolic compounds contained in the leaves of *C. clementina*. The optimal conditions for the extraction of phenolic compounds and the antioxidant activity of *C. clementina* leaves were studied using response surface methodology (RSM). The Box-Behnken model was used to study the effects of three independent variables, extraction time (30 to 105 min), ethanol concentration (40 to 80%) and ration on responses. Regression analysis showed that approximately 96% of the variation was explained by this model. The probability value for lack of fit was insignificant, which confirmed the validity of the models. Response surface analysis showed that the optimal extraction parameters to optimize the extraction were 80% ethanol, 30 min and 1/6.65 ratio. Under optimal conditions, the corresponding experimental values for PPT and antioxidant activity were 92.30 ± 2.48 mg EAG/100 g DM and 63.96% respectively. The experimental values are consistent with those predicted, indicating the relevance of the model and the success of MSR in optimizing the conditions for the extraction of PPTs from Clementina leaves.

Key word : optimization, Antioxidant activity, flavonoids, flavonols, DPPH.

ملخص:

Citrus clementina هي شجرة تنتمي إلى عائلة Rutaceae. في هذه الدراسة تم استخدام استخراج النقع لاستخراج المركبات الفينولية الموجودة في أوراق *C. clementina*. تمت دراسة الظروف المثلى لاستخراج المركبات الفينولية والنشاط المضاد للأكسدة لأوراق *C. clementina* باستخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM). تم استخدام نموذج Box-Behnken لدراسة تأثيرات ثلاث متغيرات مستقلة، زمن الاستخراج (30 إلى 105 دقيقة)، تركيز الإيثانول (40 إلى 80%) والحصص الغذائية على الاستجابات. أظهر تحليل الانحدار أن ما يقرب من 96% من التباين تم تفسيره بواسطة هذا النموذج. كانت القيمة الاحتمالية لعدم الملاءمة ضئيلة، مما أكد صحة النماذج. أظهر تحليل سطح الاستجابة أن معاملات الاستخراج المثلى لتحسين الاستخراج كانت 80% إيثانول و30 دقيقة ونسبة 1 / 6.65. في ظل الظروف المثلى، كانت القيم التجريبية المقابلة لنشاط PPT ومضادات الأكسدة 92.30 ± 2.48 مجم EAG / 100 جم DM و63.96% على التوالي. تتوافق القيم التجريبية مع تلك المتوقعة، مما يشير إلى أهمية النموذج ونجاح MSR في تحسين الظروف لاستخراج PPTs من أوراق Clementina.

الكلمة الأساسية: تحسين، نشاط مضادات الأكسدة، مركبات الفلافونويد، الفلافونول، DPPH.