

## Sommaire :

Introduction générale :.....	1
<b>1ère partie: Données bibliographiques</b>	
Chapitre I : les composés phénoliques .....	3
I/ Généralités :.....	3
II/ Biosynthèse des composés phénoliques :.....	3
III/ Principaux classes des composés phénoliques :.....	4
VI/ Effets biologiques des polyphénols :.....	4
V/ Les flavonoïdes : .....	5
1/ Étymologie :.....	5
2/ Découverte des flavonoïdes :.....	5
3/ Structure chimique :.....	6
4/ Classification :.....	6
5/ Biosynthèse : .....	9
6/ Distribution :.....	10
7/ Propriétés des flavonoïdes :.....	11
7-1/ Propriétés anti-radicalaires : .....	11
7-2/ Autres propriétés des flavonoïdes :.....	12
8/ Les flavonoïdes sont des produits nutraceutiques : .....	15
8-1/ Biodisponibilité des flavonoïdes :.....	16
8-2/ Consommation des flavonoïdes :.....	18
9/ Emplois thérapeutiques des flavonoïdes :.....	18
Chapitre II : Les agrumes.....	19
I/ Les agrumes :.....	19
1/ Classification des agrumes : .....	19
2/ Description morphologique et physiologique : .....	20
3/ Importance et aire de culture des agrumes au Maroc :.....	21
4/ Biodiversité des agrumes au Maroc : .....	21
II/ Le genre citrus :.....	22

1/ Caractères généraux des <i>citrus</i> : .....	22
2/ Les principaux espèces :.....	22
3/ Les flavonoïdes du genre <i>citrus</i> : .....	22

## **2ème partie: matériels et méthodes**

I/ Matériel végétal :.....	25
II/ Extraction des polyphénols :.....	25
III/ Dosage des polyphénols : .....	26
1/ Principe de la méthode de Folin ciocalteu : .....	26
2/ Expression des résultats :.....	26
IV/ Extraction des flavonoïdes :.....	26
1/ Préparation de l'extrait brut : .....	26
2/ Fractionnement de l'extrait brut :.....	27
V/ Dosage des flavonoïdes :.....	29
1/ principe :.....	29
2/ Expression des résultats :.....	29
3/ contrôle de la fiabilité de la méthode :.....	29
VI/ Analyse qualitative par HPLC: .....	29
1/ Principe : .....	29
2/ Expression des résultats :.....	30
VII/ Evaluation de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes :.....	30
2-1/ Test de blanchissement du $\beta$ - Carotène :.....	30
2-2/ Test au DPPH : .....	31

## **3ème partie: Résultats et discussion**

I/ Les polyphénols :.....	33
1/ Optimisation de l'extraction des polyphénols :.....	33
1-1/ Optimisation du matériel végétal :.....	33
<input type="checkbox"/> Par rapport aux différentes espèces d'agrumes :.....	33
<input type="checkbox"/> Par rapport aux différentes parties du fruit :.....	35
<input type="checkbox"/> Par rapport à la forme sous laquelle les zestes sont présentés :.....	36
1-2/ Optimisation du temps de l'extraction : .....	37
1-3/ Optimisation du solvant de l'extraction : .....	38

2/ Optimisation du l'enrichissement du solvant en fonction du rapport Matériel végétal/solvant : .....	39
II/ Les flavonoïdes : .....	40
1/ Teneur en flavonoïdes : .....	40
2/ Contrôle de fiabilité de la méthode : .....	41
3/ Analyse qualitative par HPLC : .....	42
4/ Activité antiradicalaire : .....	43
4-1/ Test de blanchissement du $\beta$ - Carotène : .....	43
4-2/ Test au DPPH : .....	46
Conclusion générale : .....	48
Annexe : .....	50
Références : .....	51

## Liste des figures :

**Figure 1:** Classes des composés phénoliques (Yvon Gervaise, 2004)

**Figure 2 :** les effets biologiques des polyphénols.

**Figure 3 :** squelette de base des flavonoïdes.

**Figure 4 :** Différentes positions du cycle B sur l'hétérocycle C.

**Figure 5 :** Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al*, 2001; W- Erdman *et al*, 2007)

**Figure 6 :** voies de biosynthèse des flavonoïdes (adaptées de Winkel-Shirley, 2002 (2); Forkmann et Martens, 2001 (3)).

**Figure 7 :** Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable (Tiqwari, 2001)

**Figure 8 :** Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes (Amić *et al*, 2003).

**Figure 9 :** Principaux compartiments impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes (Hollman, 2001)

**Figure 10 :** Classification des agrumes d'après Swingle

**Figure 11 :** Caractéristiques morphologique d'un *citrus*

**Figure 12 :** Structure des polyphénols présents dans le genre *Citrus*

**Figure 13 :** Protocole d'extraction des polyphénols des zestes de *citrus reticulata*

**Figure 14 :** Protocole d'extraction des flavonoïdes (Merghem et al, 1995)

**Figure 15 :** Forme libre et réduite du DPPH (Mohammedi, 2006)

**Figure 16:** Chromatogramme d'HPLC de l'E Br des zestes de mandarine enregistré à : (a) 280 nm et (b) 330 nm.

## Liste des camemberts :

**Camembert secteur :** pourcentage des polyphénols dans les zestes et le jus de la mandarine.

### **Liste des courbes :**

**Courbe 1:** Quantité des polyphénols extraite des zestes de la mandarine en fonction du temps.

**Courbe 2:** Quantité des polyphénols extraite des zestes de la mandarine par deux solvants en fonction du temps.

**Courbe 3:** Changement d'absorbance du  $\beta$ - carotène à 470 nm en présence des extraits des zestes de citrus reticulata, BHT et le contrôle négatif.

### **Liste des tableaux :**

**Tableau 1 :** Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes (W-Erdman *et al*, 2007)

**Tableau 2 :** prévention de certaines maladies par les flavonoïdes

**Tableau 3 :** Quantité des polyphénols dans l'extrait en fonction du rapport matériel végétal/solvant.

**Tableau 4 :** teneur en flavonoïdes dans différentes phases de l'extrait des zestes de citrus reticulata.

**Tableau 5:** teneur en flavonoïdes dans différentes phases de l'extrait du quercétine à concentration connue (0,5mg/g).

**Tableau 6 :** flavonoïdes d'E Br dégagés des chromatogrammes (a) et (b)

### **Liste des histogrammes :**

**Histogramme 1:** variation de la quantité des polyphénols en fonction des différentes espèces d'agrume.

**Histogramme 2:** quantité des polyphénols dans différentes parties de la mandarine.

**Histogramme 3:** quantité des polyphénols dans les deux formes des zestes de la mandarine.

**Histogramme 4:** Activité anti-oxydante relative des extraits des zestes de citrus reticulata, BHT et le control négatif.

**Histogramme 5:** Activité antiradicalaire des extraits des zestes de citrus reticulata, BHT et le control négatif.

## *Abréviation :*

AlCl<sub>3</sub> : trichlorure d'aluminium

BHT : butyle hydroxytoluène

COX : Cyclooxygénase

DPPH : 2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl

EAG/g : Equivalent d'acide gallique par gramme

EQ/g : Equivalent de quercétine par gramme

FL• : Radical flavoxyle

HIV : Human immunodeficiency virus

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

HPLC-DAD : chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrettes de diodes

IAV : L'institut d'agriculture et de vétérinaire

L'E AcOH : La phase ou la fraction d'acétate d'éthyle

L'E Br : L'extrait brut

L'E EP : La fraction d'éther de pétrole ou l'extrait lavé par l'éther de pétrole

L'E n-BuOH : La phase ou la fraction du n-butanol

LDL : Low-density lipoprotein

RH : Molécule stable

UATRS-CNRST : l'unité d'appuis technique à la recherche scientifique du centre national de la recherche scientifique et technique.

USDA : United States Department of Agriculture.

UV : ultraviolet

## Introduction générale :

Les études épidémiologiques ont suggéré les effets bénéfiques des agrumes contre de nombreuses maladies dégénératives (Benavente-Garcia, Castillo, Marin, ortuño, & Rio, 1997; Tripoli, Guardia, Giammanco, MAJO, & Giammanco, 2007).

Ces influences positives sur la santé humaine ont augmenté de manière significative la consommation des agrumes au cours des dernières années et on estime que la production mondiale d'agrumes atteint 72 millions de tonnes à la session 2007-08, dont l'orange est le plus commercialisé avec environ 45 millions de tonnes (USDA, 2008).

L'usage domestique et industriel de ces grandes quantités d'agrumes, en particulier pour la production de jus, régénèrent des déchets tels que : les zestes, les pépins..., qui comptent pour environ la moitié du poids du fruit. Ces sous-produits peuvent être utilisés pour la production de la mélasse, des pectines, des huiles de pépins et des aliments du bétail (bocco, cuvelier, Richard, & berset, 1998; Jeong et al., 2004; Li, Smith, & Hossain, 2006).

En outre, ces sous-produits d'agrumes sont une bonne source de composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes (des flavanones hétérosides) qui comprennent principalement naringine, hespéridine, narirutine, et neohespéridine.

Dans ce travail, on va procéder à l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes, des zestes d'agrumes, par un mélange eau/éthanol.

Tout d'abord, nous allons procéder aux dosages quantitatifs colorimétriques (par un spectrophotomètre UV-Vis) des polyphénols totaux, ainsi que les flavonoïdes comme étant la classe la plus importante de la famille des polyphénols. On va utiliser la méthode de Folin-Ciocalteu pour doser la teneur de ces zestes en polyphénols et on va employer la méthode d' $\text{AlCl}_3$  pour le dosage des flavonoïdes.

L'analyse qualitative des flavonoïdes va être réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Vu l'influence des paramètres expérimentaux (le solvant, le temps d'extraction, l'espèce utilisée et la taille de particules) sur la teneur des composés phénoliques, on va procéder à leur optimisation.

Actuellement, l'extraction de ces composés phénoliques des zestes du *citrus* a attiré un très grand intérêt scientifique pour les utiliser comme des antioxydants naturels principalement pour prévenir l'oxydation des lipides (Anagnostopoulou, Kefalas, papageorgiou, Assimopoulou, & Boskou, 2006; Peschel et al., 2006; Zia-ur-Rehman, 2006).

En effet, au cours des dernières années, beaucoup de recherches ont porté sur des plantes et de leurs sous-produits pour trouver des antioxydants naturels et à faible coût qui peuvent remplacer les additifs synthétiques tels que le butylhydroxytoluène (BHT). Ces additifs synthétiques pourraient être toxiques (Moure et al., 2001) et cancérigènes pour le foie, (ak & Gülçin, 2008).

Dans ce travail nous allons évaluer l'activité anti-oxydante des flavonoïdes par deux tests différents : le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et le test au DPPH pour les différentes fractions contenant des flavonoïdes.



# Chapitre I : les composés phénoliques

## I/ Généralités :

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont le produit du métabolisme secondaire des plantes.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (**Urquiaga et Leighton, 2000**). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Macheix et al, 2005**). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (**Urquiaga et Leighton, 2000**). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (**Macheix et al, 2005**).

Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**conférence internationale sur l'application des polyphénols, 2006**).

## II/ Biosynthèse des composés phénoliques :

Les polyphénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques :

➤ La voie de shikimate : C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (**Kening et al, 1995 ; Floss, 1997**).

➤ La voie de phénylpropanoïde : commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, les isoflavonoïdes, les flavonoïdes, l'acide salicylique et des précurseurs de lignine (**Hoffmann et al, 2004**).

### III/ Principaux classes des composés phénoliques :

Les composés phénoliques se répartissent en 7 classes : Acides phénoliques, Flavonoïdes, Tannins, Stilbènes, Lignanes, Saponines et Phytostérols (figure 1).

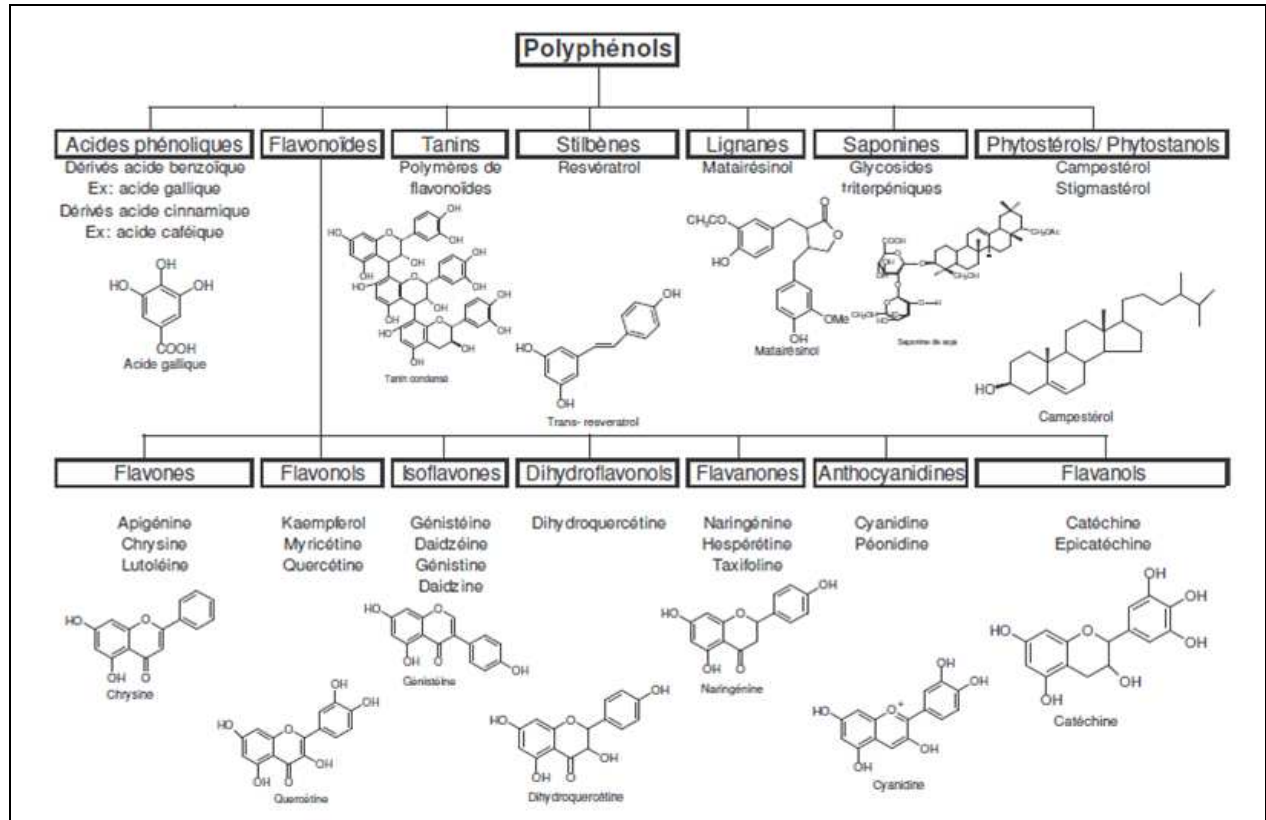


Figure 1: Classes des composés phénoliques (Yvon Gervaise, 2004)

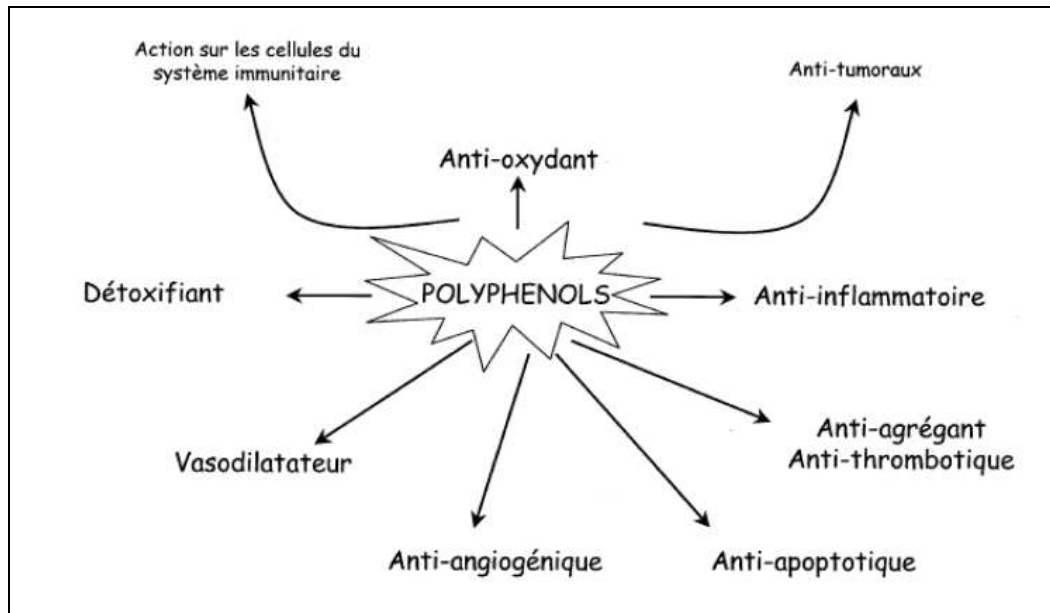
### VI/ Effets biologiques des polyphénols :

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Bahorun, 1997).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (Babar Ali *et al.*, 2007), anti-allergènes, vasodilatateurs (Falleh *et al.*, 2008) et antioxydants (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Ils sont regroupés dans la catégorie des veinotoniques et des vasculoprotecteurs.

Parmi les veinotoniques, nous citerons le Relvenet ou le Cirkant renfermant du ruténoside, le Daflont ou le Diosmilt renfermant de la diosmine. Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des anti-agrégant plaquettaire, ou hypotenseur sans résultats probants (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).



**Figure 2 : les effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).**

## V/ Les flavonoïdes :

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes (**Lhuillier, 2007**).

### 1/ Étymologie :

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (**Piquemal, 2008**), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (**Karaali et al, 2004 ; Malešev et Kuntić, 2007**).

### 2/ Découverte des flavonoïdes :

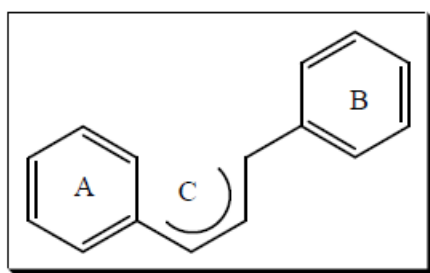
Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique **E.Chervreul** en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1930 par **Albert Szent-Györgyui**, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée

lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (**Nijveldt *et al*, 2001**).

Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées (**Ghedira, 2005; Malešev et Kuntić, 2007**). Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (**Medić-Šarić *et al*, 2004**).

### 3/ Structure chimique :

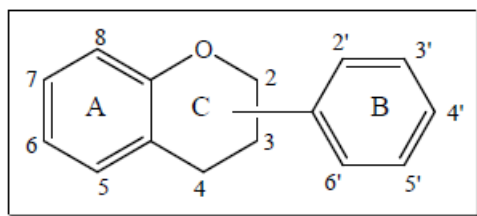
Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones (C6-C3- C6) (**Emerenciano *et al*, 2007**) constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (**W- Erdman *et al*, 2007**), portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (**Narayana, 2001; Milane 2004; Malešev et Kuntić, 2007**).



**Figure 3** : squelette de base des flavonoïdes.

### 4/ Classification :

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central (la chaîne en C3 (**Brunton, j ,1999**), le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4.



**Figure 4** : Différentes positions du cycle B sur l'hétérocycle C.

Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé Flavane.

□ Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle la flavane est appelé Flavanone.

□ Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé Flavone.

□ Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle il est désigné par le nom de Flavonol.

Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme Isoflavane (**Bouakaz, 2006**).

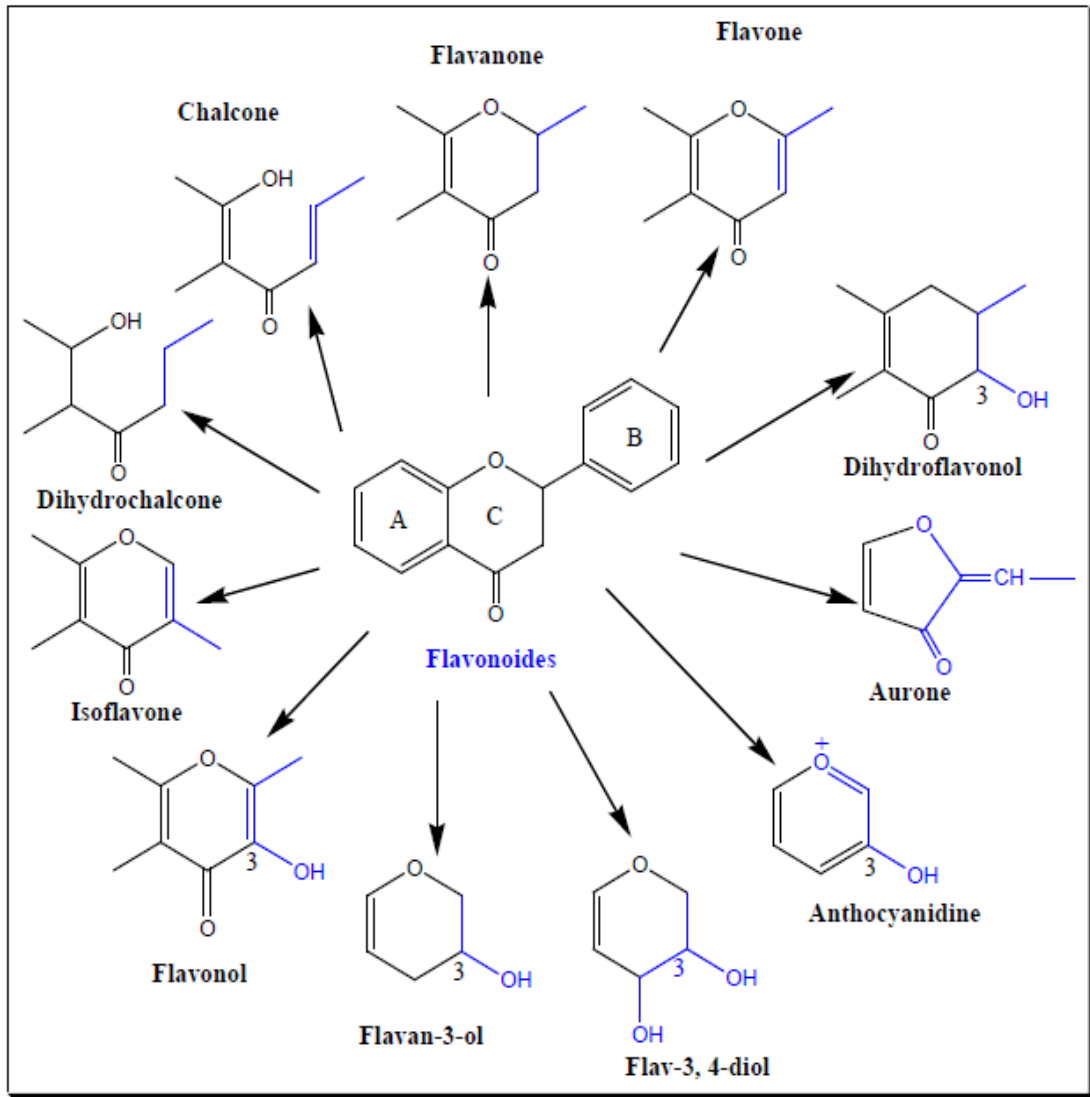
□ Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement hydroxyle, le composé est désigné par le nom isoflavanol.

□ Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement carbonyle, le composé est appelé isoflavanone.

□ Si la liaison C2-C3 dans le squelette de l'isoflavanone est insaturée le composé est nommé isoflavone.

Dans la position 4 avec un carbonyle en C-2 et une insaturation entre C-3 et C-4, le composé est dit néoflavone, ce type de composés est également appelé 4-aryl coumarine.

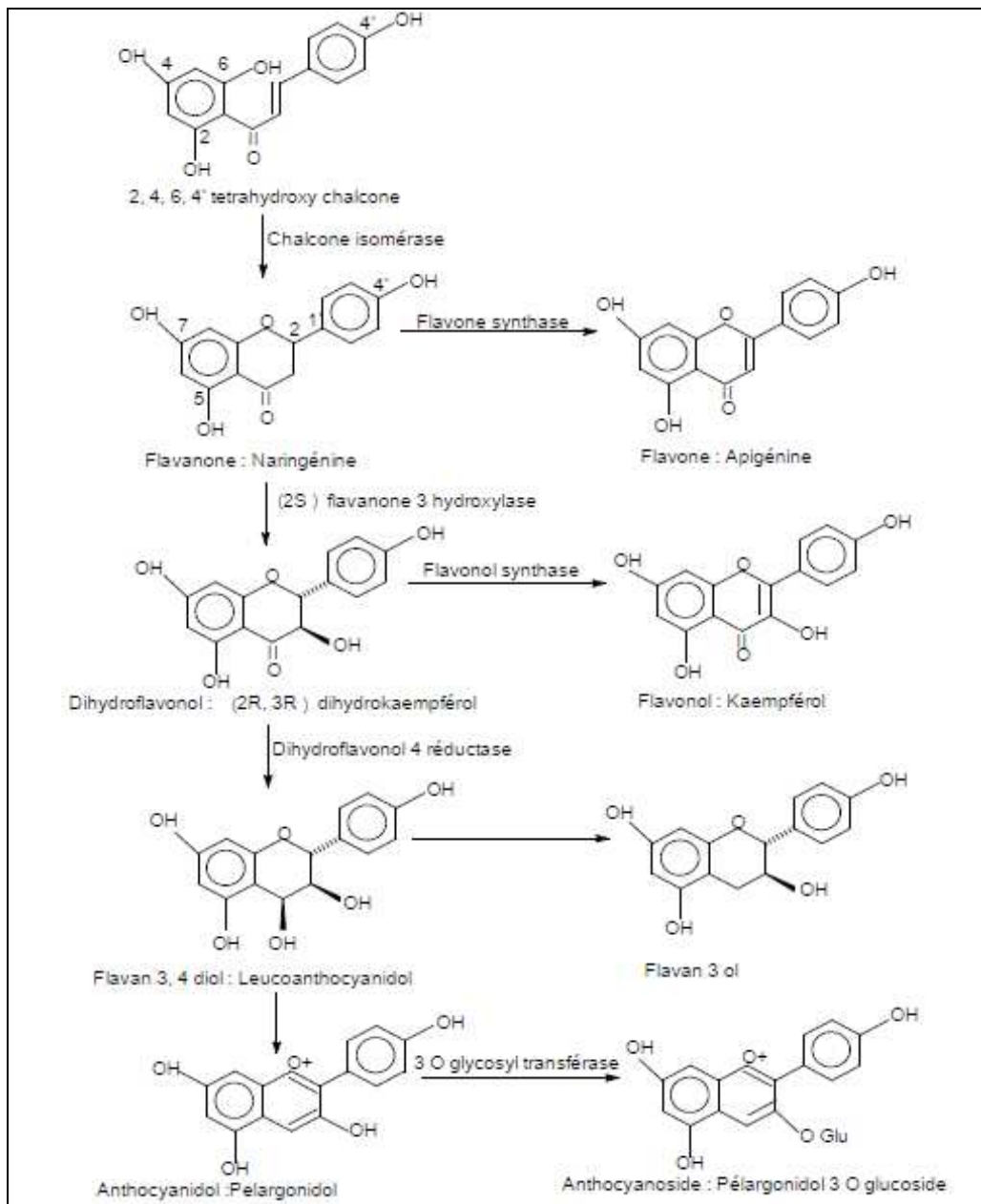
Par ailleurs, selon le degré d'hybridation des carbones de la chaîne en C-3 et le mécanisme de cyclisation de cette chaîne, on distingue d'autres squelettes flavoniques telles que les chalcones, les dihydrochalcones et les auronnes.



**Figure 5** : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al*, 2001; W- Erdman *et al*, 2007).

## 5/ Biosynthèse :

La figure suivante résume les étapes de biosynthèse des flavonoïdes :



**Figure 6 :** La voie de biosynthèse des flavonoïdes (Winkel-Shirley, 2001; Subsamanian et al, 2007).

Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elles se trouvent *in vivo* (Bouakaz, 2006).

## 6/ Distribution :

Les flavonoïdes peuvent être présents dans toutes les parties des plantes. Dans la majorité des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosylée dans les plantes car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosolubles permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et du mésophylle des feuilles, des parenchymes des tiges et racines. Les génines seules sont présentes dans les exsudats farineux de certaines plantes, dans les cuticules des feuilles, écorces et bourgeons (Lhuillier, 2007).

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple dans la propolis des abeilles (Marfak, 2003), elles mettent en oeuvre les propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leurs ruches (Lahouel, 2005).

Il est à noter que les flavanones et les flavones ont été isolés d'un corail marin et d'un petit nombre de champignons (Lhuillier, 2007). Le tableau VI représente la distribution des principaux flavonoïdes dans certains aliments :

**Tableau 1** : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes (W- Erdman *et al*, 2007)

Flavonoïdes	Exemples	Aliments	Caractéristiques
Flavonols	Quercétine Kampférol	Oignon, poireau, brocolis, pommes, chou frisé, thé.	Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.
Flavones	Lutéline	Persil, céleri.	les flavones se différent des flavonols seulement par le manque d'un OH libre en C3, ce qui affecte ainsi leur absorption aux UV, mobilité chromatographique et les réactions de coloration.
Flavonones	Naringénine, Hespéridine	Fruits du genre <i>Citrus</i> .	Sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3, le flavanone le plus abondant est la naringénine.
Isoflavones	Genistéine, Daidzéine	Graines de soja et produits qui en dériveront.	Caractérisés par leur variabilité structurale dont l'attachement du cycle B se fait en C3. Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.

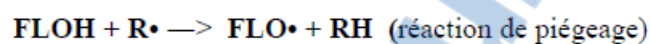


## 7/ Propriétés des flavonoïdes :

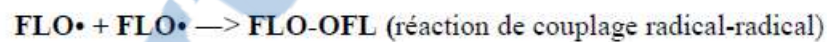
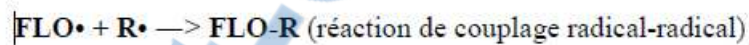
Les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par **Szent Gyorgyi (prix Nobel, 1937)**, chercheur de l'université de Szeged (Hongrie).

### 7-1/ Propriétés anti-radicalaires :

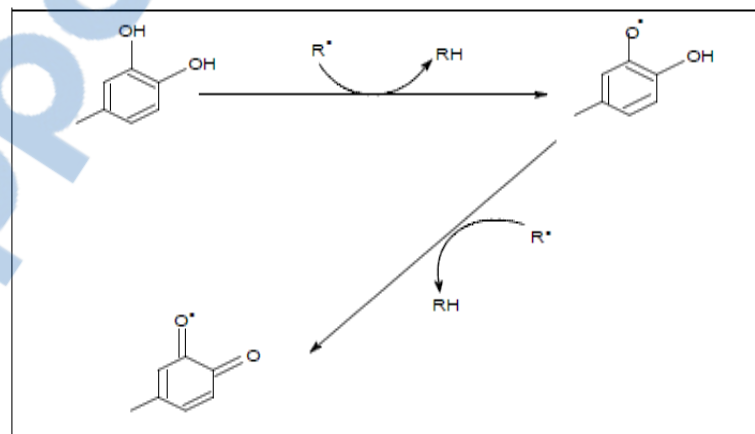
Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO•) ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R• ; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.



(Amié et al, 2003)



**Figure 7 :** Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable (Tiqwari, 2001)

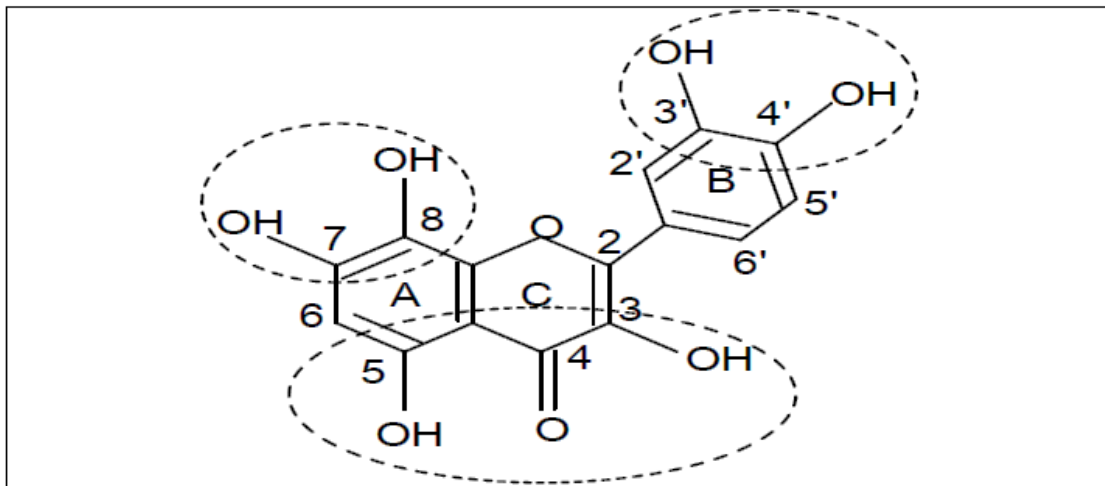
La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite :

→ Structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité antiradicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé.

→ La double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité antiradicalaire.

→ Les groupements hydroxyles libres en C3 et C5 (**Amić *et al*, 2003**).

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante (**Middleton *et al*, 2000**).



**Figure 8 :** Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes (**Amić *et al*, 2003**).

## 7-2/ Autres propriétés des flavonoïdes :

➤ Propriétés chélatrices des ions métalliques :

les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques, nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, en créant des composés complexes inactifs (**Tiqwari, 2001 ;Malešev et Kuntić, 2007**).

➤ Propriétés antibactériennes :

Les flavonoïdes sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres

interactions pour inactiver les adhésives microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**).

➤ Propriétés anticancéreuses :

Certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) représentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate, ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés (**Brusselmans *et al*, 2005**).

Les travaux réalisés par (**Depeint *et al*, 2002**) montraient que la curcumine permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement, ce même flavonoïde réduit l'apparition des tumeurs de la peau induites chimiquement. La quercétine et la rutine sont les deux flavonoïdes les plus conseillés pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal tandis que l'apigénine avec la quercétine ont la capacité à inhiber la phase de métastase.

Toute fois (**Depeint *et son équipe*, 2002**) signalaient que l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes comme la formation d'un complexe inactif avec le carcinogène (**Hertog, 1996**), Inhibition des processus d'angiogénèse (**Ren *et al*, 2003**).

➤ Propriétés anti-inflammatoires :

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (**González-Gallego *et al*, 2007**) d'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (**Kim *et al*, 2004**).

Les flavones et les flavanols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myrecétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) (**Tapas *et al*, 2008**).

➤ Propriétés anti-virales :

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de son réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase) par ailleurs d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus d'influenza, HIV-1, HIV-2 (**Bylka *et al*,**

**2004).** Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus.

Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 (**Tapas et al, 2008**).

➤ Propriétés antiallergiques :

Les effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. La quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (**Marfak, 2003**).

➤ Inhibition enzymatique :

En règle générale, les flavonoïdes sont *in vitro*, des inhibiteurs enzymatiques de l'histidine-décarboxylase par le quercétol ou la naringénine; l'élastase; l'hyaluronidase, par les flavones et surtout par les proantho-cyanidols; la phosphodiésterase de l'AMPc; l'aldoséréductase par le quercétiroside, ainsi que par des méthoxyflavones; la protéine-kinase, notamment par le lutéolol; plusieurs flavonoïdes (cirsiol, hypolaétine, etc.) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase. Quant à (lutéolol, apigénol, chrysin, etc.) inhibent la cyclooxygénase (**Bruneton, 1999**).

L'activité anti-tumorale de plusieurs flavonoïdes (pinostrobin, quercétine, morine myricétine,) est attribuée à leur efficacité d'inhiber la topoisomérase I et II (**Hodek et al., 2002**).

Beaucoup d'efforts ont été fait pour la recherche des inhibiteurs efficaces de la tyrosinase, l'enzyme clef dans la biosynthèse de la mélanine. Les résultats des travaux de **Gao, et ses collaborateurs (2007)** sur les flavonoïdes ont montré que les 5, 6,7-trihydroxy-flavones sont utiles en tant qu'agents de dépigmentation.

Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique : c'est le cas de la proline-hydroxylase (**Bruneton, 1999**).

➤ Effets cardiovasculaires :

Les rapports épidémiologiques ont démontré que les gens peuvent avoir une incidence plus limitée en maladies du cœur, s'ils ont une ingestion diététique élevée en flavonoïdes (**Xu et al., 2007**).

Parmi les 17 flavonoïdes examinés par **Xu et ses collaborateurs (2007)**, les agents de relaxation vasculaires les plus efficaces sont l'apigénine, lutéoline, kaempferol et la génistéine. Cette relaxation est attribuée à l'action directe des flavonoïdes sur le muscle lisse vasculaire.

## **8/ Les flavonoïdes sont des produits nutraceutiques :**

Le terme nutraceutique a été intervenu en 1979 par Steph De Felice (**Lin et Weng, 2006**), il s'agit d'une appellation commerciale élaborée par les industriels qui résulte de la contraction de "Nutrition" et de "Pharmaceutique" (**Bietrix, 2004**). Les nutraceutiques sont des composés qui n'ont pas une valeur calorique mais qui ont un rôle fondamental pour ce qui concerne la prévention de certaines pathologies (**Teissedre et al, 2007**).

Le rôle nutraceutique des flavonoïdes s'inscrit dans le cadre de ce que l'on appelle la nouvelle pharmacie qui consiste à faire un traitement préventif et non curatif, il vaut mieux que le médicament soit déjà présent dans l'organisme prêt à la défense apporté sous forme des aliments fonctionnels capables de procurer des bienfaits physiologiques démontrés ou de réduire les risques des maladies chroniques, en plus de remplir leurs fonctions nutritionnelles de base dont la consommation des fruits et des légumes riches en composés bioactifs peut être une stratégie de prévention réaliste contre de nombreuses maladies majeures. Les produits nutraceutiques fondamentaux des plantes sont les composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes en raison de leurs propriétés bénéfiques sur la santé humaine.

Une synthèse de quelques études concernant l'action des flavonoïdes pour la prévention de maladies est présentée dans le tableau II.

**Tableau 2 : prévention de certaines maladies par les flavonoïdes**

Références	Flavonoïdes	Activités
<b>Mercader et al. , 2008</b>	56 flavonoïdes	Inhibition de l'aldolase réductase : prévention de la formation de cataracte chez les diabétiques
<b>Cushnie et Lamb, 2005</b>	Diférents types de flavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols ...)	Activité antifongique,antivirale, antibactérienne.
<b>Ziee et al. , 2009</b>	Rutine	Inhibition de l'hypercholestérolémie chez des souris sous régime hypercholestéroléminant.
<b>Hooper et al. , 2008</b>	Diférentes sous classes de flavonoïdes et aliments riches en flavonoïdes (chocolat, thé noir, thé vert, soja,cacao)	Diminution du niveau de LDL, diminution de la pression sanguine
<b>Plochmann, 2007</b>	23 flavonoïdes	Relation structure-activité cytotoxique vis-à-vis des cellules leucémiques humaines.
<b>Kosmider et al. , 2004</b>	Diférentes classes de flavonoïdes	Activité antitumorale
<b>Arts et al. , 2001</b>	Catéchine	Prévention de la mort par cardiopathie ischémique

### **8-1/ Biodisponibilité des flavonoïdes :**

Les effets santé des polyphénols dépendent essentiellement de leur biodisponibilité ; cette dernière qui signifie la part d'un nutriment présent dans un aliment qui est effectivement assimilée par l'organisme (**Wikipédia, 2008**).

#### **➤ Absorption :**

Tous les flavonoïdes à l'exception de catéchine (flavanol) sont présents dans les plantes sous forme glycosylée (liés aux sucres par des liaisons  $\beta$  osidiques) seuls les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle, tandis que les glycosides sont hydrolysés tout d'abord en aglycones par l'intermédiaire de la microflore colique qui dispose des enzymes capables de cliver les liaisons  $\beta$  osidiques (**Wiseman, 1999 ; Urquiaga et Leighton, 2000 ; Ming, 2007**), cette même flore microbienne métabolise au même temps les aglycones libérés.

Tandis que les formes dimères et trimères de catéchine sont susceptibles d'être absorbés tandis que les polymères de degré de polymérisation élevé ne peuvent pas être absorbés par la paroi intestinale qu'après leur dégradation (Hollman, 2001).

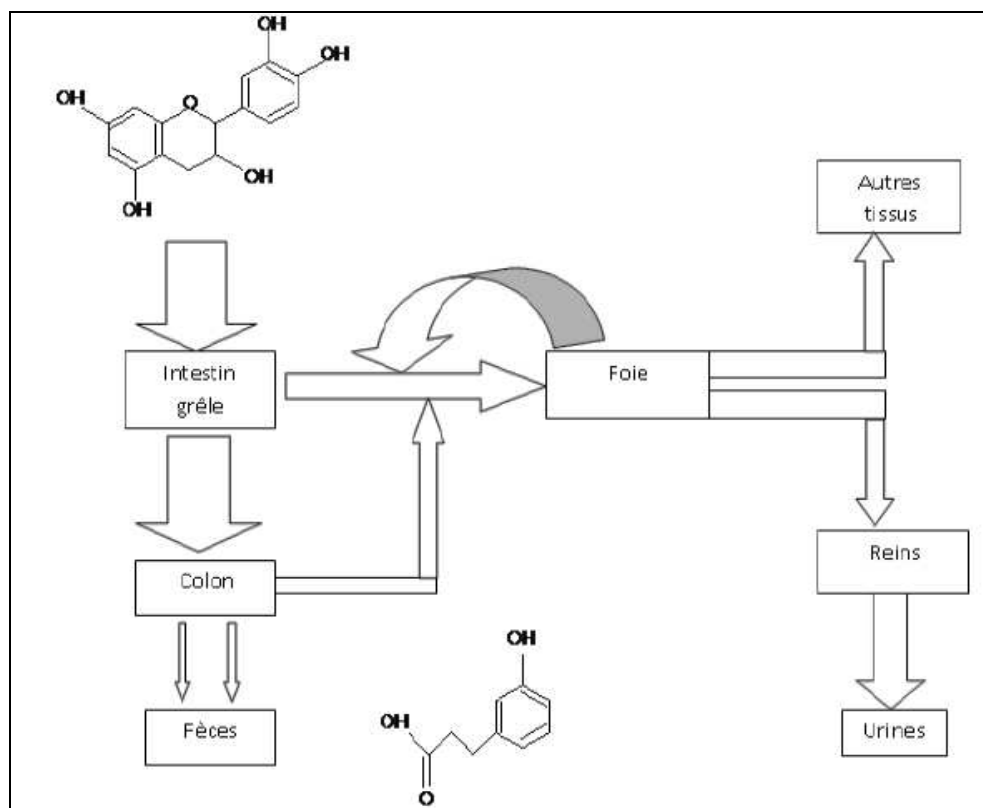
➤ **Métabolisme :**

Deux compartiments considérablement importants pour le métabolisme des composés phénoliques :

**Les tissus (foie et les reins) :** où des enzymes de biotransformation agissent directement sur les flavonoïdes aglycones ainsi que sur des métabolites coliques absorbés, ces enzymes sont principalement localisés au niveau du foie, des reins, ainsi qu'au niveau de l'intestin grêle.

**Colon :** où la microflore colique dégrade les flavonoïdes aglycones libérés (après hydrolyse des glycosides) par ouverture de leur hétérocycle aux différents endroits selon le type de flavonoïde (Hollman, 2001).

L'élimination des métabolites de polyphénols se fait par deux voies essentielles d'excrétion ; soit par voie biliaire (Manach, 1998) ou par voie urinaire.



**Figure 9 :** Principaux compartiments impliqués dans le métabolisme des flavonoïdes (Hollman, 2001)

## **8-2/ Consommation des flavonoïdes :**

La prise moyenne quotidienne des flavonoïdes est 14.4 mg dont (35.2%) viennent des fruits, (19.1%) des légumes, (16.9%) du vin et (16.0%) du thé (**Ramassamy, 2006**). La quercétine est régulièrement consommée par l'homme car c'est le flavonoïde principal trouvé dans le régime alimentaire (**Tieppo et al., 2007**).

Leur ingestion diététique est tout à fait haute, comparé à d'autres antioxydants diététiques comme les vitamines C et E (**Fiorentino et al., 2007**).

## **9/ Emplois thérapeutiques des flavonoïdes :**

L'utilité thérapeutique de ces composés a été démontrée dans les hémorragies gastrointestinales, avortement habituel, ménorragie, cystite saignante, tuberculose hémoptysie, épistaxis, rétinopathie et hémorroïdes.

Ils ont été fréquemment combinés avec la vitamine K et l'acide ascorbique.

Récemment, Les rutosides hydroxyéthylés s'ont avérés efficaces dans l'allègement des symptômes provoqués par l'insuffisance veineuse chronique des membres inférieurs, varicosis de grossesse et d'autres maladies veineuses. Le (+)-cyanidanol-3 a été de plus en plus employé dans le traitement de l'hépatite virale aiguë et diverses autres maladies du foie (**Parmar et Ghosh, 1980**).

Une étude clinique a permis de montrer une activité anticancéreuse de la quercétine, administrée par voie intraveineuse chez des patients atteints du cancer. Le resveratrol est actuellement en phase I, d'étude clinique pour son utilisation dans le traitement du sida. Il est également en phase d'études préclinique et clinique pour son utilisation dans le traitement de divers cancers (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).



## Chapitre II : Les agrumes

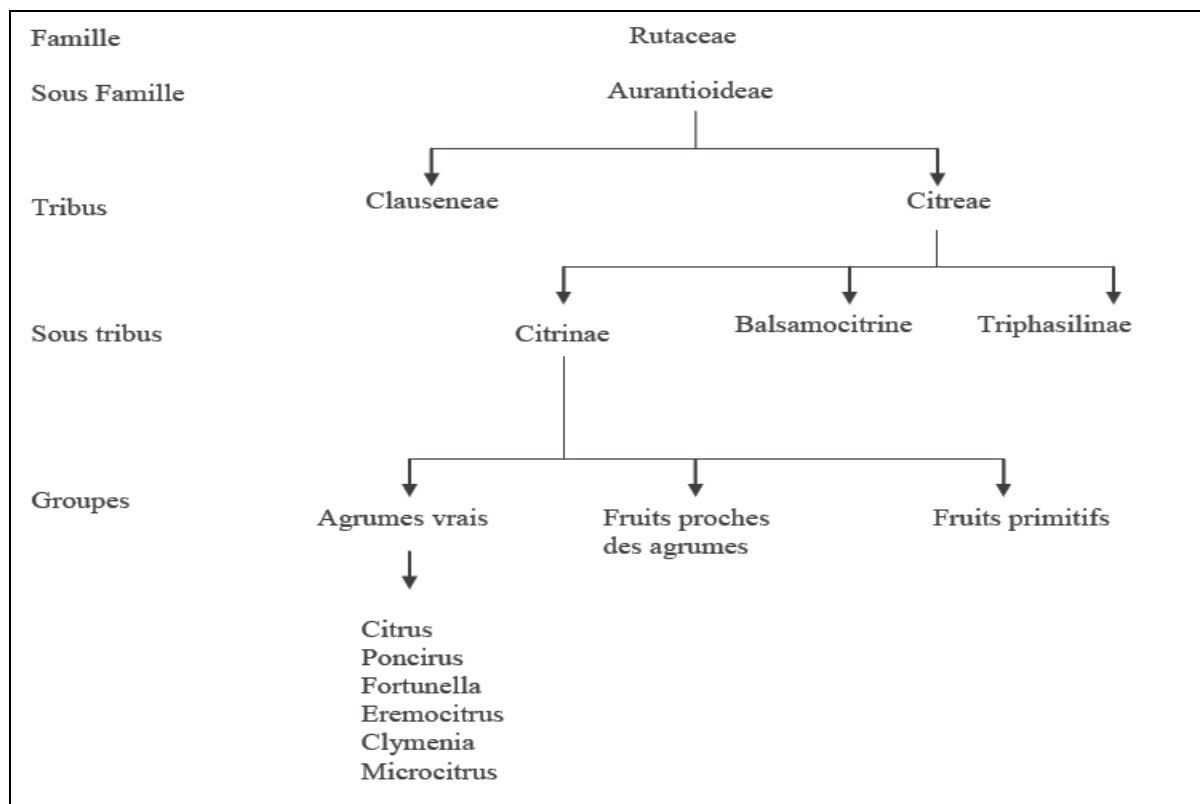
Les études épidémiologiques ont suggéré les effets bénéfiques des agrumes contre de nombreuses maladies dégénératives comme maladies cardiovasculaires et certains cancers (**Benavente-Garcia, Castillo, Marin, ortuño, & Rio, 1997; Tripoli, Guardia, Giammanco, MAJO, & Giammanco, 2007**).

Ces influences positives sur la santé humaine ont augmenté de manière significative la consommation des agrumes au cours des dernières années et on estime que la production mondiale d'agrumes va jusqu'à 72 millions de tonnes à la session 2007-08, dont l'orange était le fruit le plus important commercialement avec environ 45 millions de tonnes (**USDA, 2008**).

### I/ Les agrumes :

#### 1/ Classification des agrumes :

Le groupe des agrumes appartient à la famille des Rutaceae, sous famille des Aurantioideae, tribu des Citreae et sous tribu des Citrinae (**Praloran J.C, 1971**) Les agrumes se répartissent en plusieurs genres dont *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* sont les trois genres les plus cultivés à travers le Monde. La figure 12 reprend toute cette répartition en cascade.



**Figure 10** : Taxonomie chez les agrumes d'après (**Swingle, 1976**)

La classification des agrumes est un problème que les spécialistes s'accordent à qualifier de complexe. En effet, la complexité taxonomique des agrumes s'explique par de larges possibilités d'hybridations intra ou interspécifiques, par la polyembryonie qui peut fixer ces structures hybrides, par l'étendue de l'aire de culture où les structures génétiques ont pu évoluer indépendamment par le biais de différentes pressions environnementales (**De Rocca Serra, 1992**).

Des divergences en la matière se manifestent entre les opinions des taxonomistes, ainsi, deux grandes classifications existent, celle de Tanaka (**Tanaka T, 1961**) qui comprend 156 espèces tandis que celle de (**Swingle, 1976**) n'en distingue que seize. Tanaka élève au rang d'espèces de nombreux hybrides intra ou interspécifiques.

## **2/ Description morphologique et physiologique :**

Les agrumes possèdent un système racinaire et un système aérien, nous nous limiterons à la description de la partie aérienne, partie la plus importante pour l'étude des composés volatils et des flavonoïdes.

Les plants d'agrumes cultivés sont généralement composés de deux fractions :

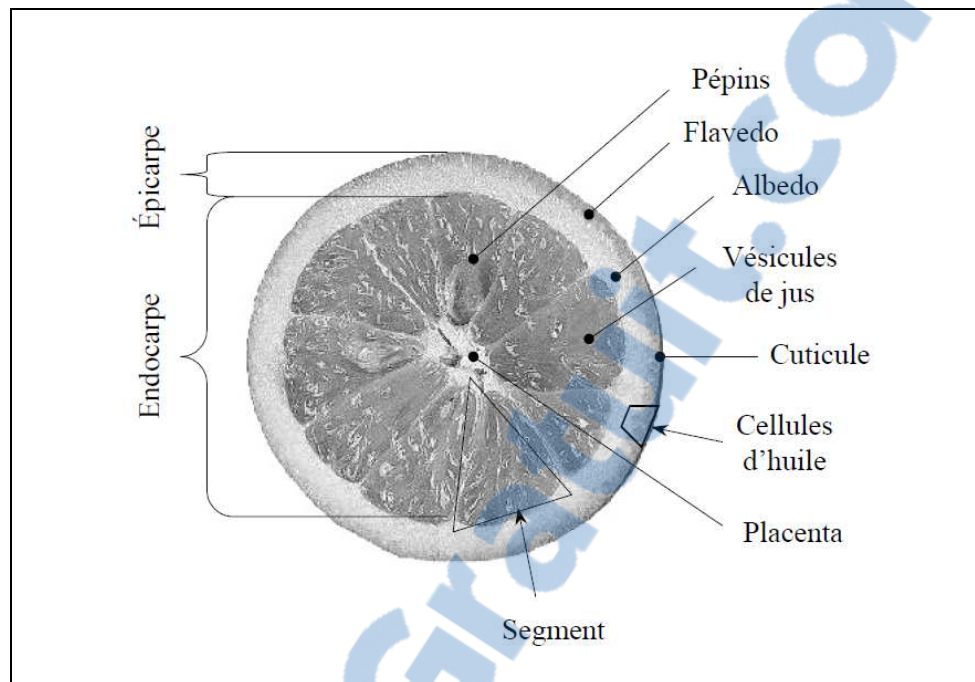
- Une partie aérienne, essentiellement constituée par la variété (ou cultivar) de l'espèce cultivée (oranger, mandarinier, etc...). C'est la partie productive de l'arbre, c'est-à-dire celle qui portera le fruit.
- Une partie souterraine, formée par le porte greffe (ou sujet). C'est la partie qui assure à la fois l'ancrage de l'arbre au sol, son alimentation en eau et en sels minéraux.

Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité.

Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique (figure 10). On distingue différentes parties :

- L'écorce, généralement peu développée, constitue la partie non comestible du fruit. Elle est formée de l'épicarpe et du mésocarpe externe et interne. À maturité du fruit, c'est l'épicarpe qui se colore en orangé.
- La pulpe formée par l'endocarpe est la partie comestible du fruit. Elle est constituée par un ensemble de poils ou vésicules renfermant le jus.

➤ Les pépins proviennent de la fécondation. Chez le clémentinier, l'absence de pépins est fonction des conditions de la pollinisation, l'autofécondation est impossible.



**Figure 11 : Caractéristiques morphologique d'un *citrus* (Swingle W.T, 1976)**

### **3/ Importance et aire de culture des agrumes au Maroc :**

La culture des agrumes couvre actuellement une superficie de 74 800 ha, soit environ 10% de la superficie totale occupée par l'arboriculture fruitière. Les orangers seuls occupent 44 500 ha dont 28 250 ha. La production totale en agrumes a atteint 1 324 000 T dont 343 000 T en Clémentine et 277.000 T en Navel. Les exportations ont atteint en 1993-94, 556 600 T. Les grandes zones de production par ordre d'importance sont le Souss Massa, le Gharb, le Moulouya, le Tadla, Béni-Mellal, le Haouz et le Loukkos (IAV Hassan II, 2008).

### **4/ Biodiversité des agrumes au Maroc :**

Le matériel végétal est très diversifié et au sein des grands groupes tels que les Navels, les Valencia Late et les Clémentines, des mutations spontanées ont été sélectionnées pour des caractères spécifiques qui apportent un progrès sensible au niveau de la qualité ou du rendement. Ainsi par exemple à côté de Washington Navel, on trouve Nevelina et Newhall, deux Navel précoces et Navelate, une Navel tardive. Cadoux, Carte Noire, G. Pourreron, Caffin, Nour

sont toutes des sélections marocaines de clémentinier. En matière de citronnier, on trouve Eureka, Lisbonne. Santa Teresa mutant de Feminello etc...

Le porte-greffe le plus utilisé au Maroc est le Bigaradier qui présente une bonne résistance à la gommose, une compatibilité satisfaisante avec les grandes variétés commerciales, une production abondante de fruit de qualité.

Malheureusement, c'est un porte-greffe très sensible à la Tristéza, une maladie à virus qui sévit dans plusieurs pays méditerranéens en particulier en Espagne et à Madère. L'Espagne a d'ailleurs complètement supprimé le Bigaradier de ses cultures d'agrumes. Les porte-greffes de remplacement sont les Citrange Troyer et Carrizo, les deux tolérants à la Tristéza (**IAV Hassan II, 2008**).

## **II/ Le genre citrus :**

### **1/ Caractères généraux des *citrus* :**

Ce sont des petits arbres, ou arbustes plus ou moins épineux de 5 à 10 m de haut, caractérisés par un feuillage persistant ordinairement de couleur vert foncé, brillant. Leurs fleurs, relativement petites et blanches, d'odeur suave, sont produites en très grande abondance. Les fruits sont vivement colorés en orange, rouge ou jaune.

### **2/ Les principaux espèces :**

Avec ses 145 espèces dénombrées, le genre *Citrus* est le plus important. C'est au sein de ce genre que se rencontrent les principales espèces cultivées :

- ✓ Les oranges (*Citrus sinensis*) ;
- ✓ Les mandarines (*Citrus reticulata*) ;
- ✓ Les clémentines (*Citrus clementina*) ;
- ✓ Les citronniers (*Citrus limon*) ;
- ✓ Les pamplemousses (*Citrus maxima*) ;
- ✓ Les Bigaradiers ou Orangers amers (*Citrus Aurantium L.*) ;

### **3/ Les flavonoïdes du genre *citrus* :**

En 1998, Mouly et al., ont travaillé sur les flavanones glycosides et flavones polyméthoxylées présentes dans les diverses variétés d'orange et de mandarine. L'analyse qualitative et quantitative a été faite par HPLC-DAD

(détecteur à barrettes de diodes) par comparaison des temps de rétention et des spectres UV réalisés à deux longueurs d'ondes (280 nm et 330 nm).

Celles-ci correspondent aux maxima d'absorption des flavanones glycosides d'une part et des flavones polyméthoxylées d'autre part. L'analyse met en évidence la présence de la narirutine, de l'hespéridine, et de la didymine pour les flavanones glycosides. La sinensétine, l'hexaméthoxyflavone, la nobilétine, la scutélarine, l'heptaméthoxyflavone et la tangéretine pour les flavones polyméthoxylées (figure 12). Les flavanones glycosides (400 mg.l<sup>-1</sup>) sont les molécules les plus abondantes avec un taux dix fois plus important que les flavones polyméthoxylées (40 mg.l<sup>-1</sup>).

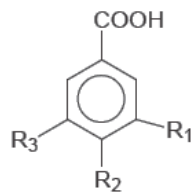
**(Pupin et al., 1998)** ont étudié la composition des flavanones glycosides dans diverses variétés d'oranges, ils ont conclu que la narirutine et l'hespéridine sont les composés les plus abondants.

**(Swatsitang et al., 2000)** analysent les composés phénoliques dans le jus d'orange et isolent les flavanones glycosides et les flavones polyméthoxylées. Les acides phénoliques les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide gallique (figure 12).

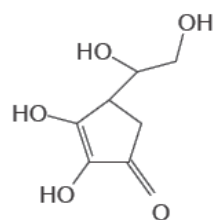
**En 2001, (Gorinstein et al.)** déterminent la composition en acides phénoliques de la peau d'orange par fluorescence. Les composés identifiés par ordre décroissant sont l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide sinapique, l'acide férulique et l'acide ascorbique (figure 12).

**Belajová et Suhaj, 2004,** analysent par HPLC-DAD, les polyphénols dans le jus d'orange fraîchement pressé. Ils en déduisent que l'hespéridine est le composé majoritaire. Les autres composés ont des teneurs plus faibles telles la quercétine, la néohespéridine et la naringine.

Acide benzoïque

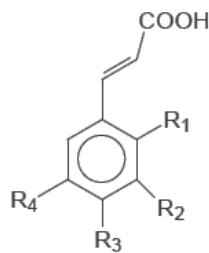


Acide gallique,  $R_1=R_2=R_3=OH$



Acide ascorbique

Acide cinnamique

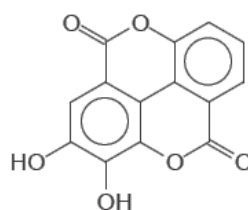


Acide férulique,  $R_1=R_2=H, R_3=OH, R_4=OCH_3$

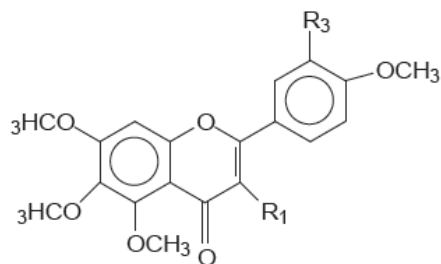
Acide-p-coumarique,  $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$

Acide caféique,  $R_1=R_2=H, R_3=R_4=OH$

Acide sinapique,  $R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$



Acide ellagique



Flavones polyméthoxylées :

sinensétine,  $R_1=R_2=H, R_3=OCH_3$

hexaméthoxyflavone,  $R_1=R_3=OCH_3, R_2=H$

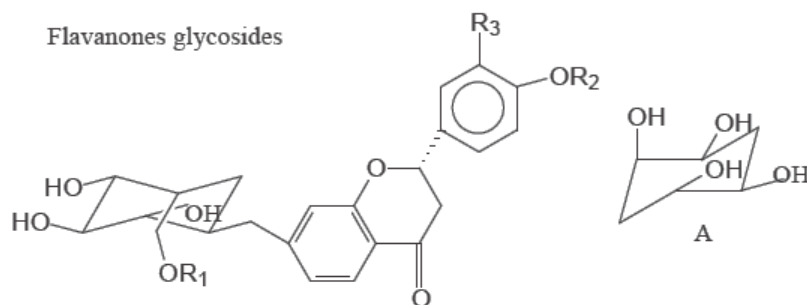
nobilétine,  $R_1=H, R_2=R_3=OCH_3$

scutélarine,  $R_1=R_2=R_3=H$

heptaméthoxyflavone,  $R_1=R_2=R_3=OCH_3$

tangéretine,  $R_1=R_3=OCH_3, R_2=H$

Flavanones glycosides



narirutine,  $R=A, R_1=R_2=R_3=H$

naringine,  $R=R_2=R_3=H, R_1=A$

hespéridine,  $R=A, R_1=H, R_2=CH_3, R_3=OH$

didymine,  $R=A, R_1=H, R_2=CH_3, R_3=H$

néohespéridine,  $R=H, R_1=A, R_2=CH_3, R_3=OH$

**Figure 12** : Structure des flavonoïdes présents dans le genre *Citrus*.

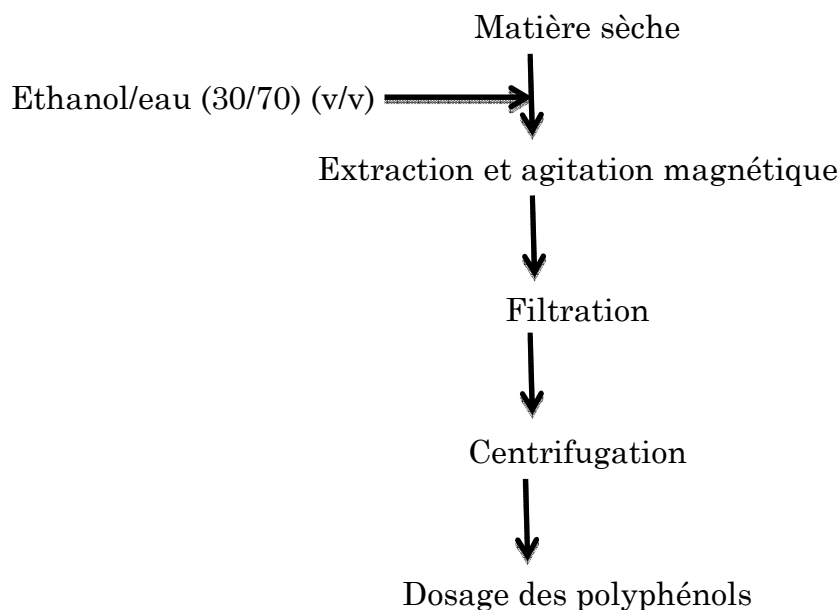
## I/ Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué des zestes du genre citrus : du mandarine, du citron, d'orange et d'orange amer.

Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, le matériel végétal est broyé grossièrement dans un moulin électrique.

## II/ Extraction des polyphénols :

Pour extraire les composés phénoliques des zestes de citrus reticulata, nous avons utilisé la méthode décrite par **A.Perva-Uzunalic et al., 2006**, que nous avons modifié au laboratoire. Le solvant de cette extraction est l'éthanol. Le protocole de l'extraction est présenté dans la figure 13.



**Figure 13 :** Protocole d'extraction des polyphénols  
des zestes de citrus reticulata

### **III/ Dosage des polyphénols :**

Le contenu des composés phénoliques de nos extraits est estimé par la méthode de Folin ciocalteu (**Smith *et al*, 2006**).

#### **1/ Principe de la méthode de Folin ciocalteu :**

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec le spectrophotomètre UV-Vis en utilisant l'essai de Folin-Denis ou généralement Folin- Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du réactif acide phosphotungstique phosphomolybdique (réactif de Folin) dans une solution alcaline (**Vuorela, 2005**).

Brièvement 250µl d'extrait de l'échantillon a été ajouté à 1,25ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 5-8 minutes à une température ambiante.

Après l'incubation 3,75ml de la solution de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75g /l) a été ajoutée. Le mélange final a été secoué et puis incubé pendant 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance de tous les extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm.

#### **2/ Expression des résultats :**

La concentration des polyphénols est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200 µg/ml) (figure1, annexe) et exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

### **IV/ Extraction des flavonoïdes :**

#### **1/ Préparation de l'extrait brut :**

Suivant le protocole d'extraction décrit par (**Merghem *et al*, 1995**), le matériel végétal sec broyé (10 g) est soumis à une extraction dans le mélange éthanol / eau (30/70 : v/v) pendant 72 heures avec renouvellement de solvant chaque 24 heures et agitation de temps en temps.

Les macéras sont réunis puis filtrés sur un papier filtre.

Le filtrat est évaporé presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif dans le but d'éliminer le solvant.



## **2/ Fractionnement de l'extrait brut :**

L'extrait brut est repris dans 100 ml d'eau distillée bouillante.

Après une décantation de toute une nuit on récupère la phase limpide qui va être lavé trois fois par l'éther de pétrole puis épuiser successivement par 2 solvants: l'acétate d'éthyle et le n-butanol avec un temps de repos pendant 30 minutes.

Les phases organiques chargées de molécules spécifiques sont évaporées dans un évaporateur rotatif et sont repris dans l'eau distillée.

La série d'extraction permet d'obtenir quatre fractions :

- ✓ l'extrait brut hydro-éthanolique (EBr) ;
- ✓ la fraction d'éther de pétrole (EEP) ;
- ✓ la fraction d'acétate d'éthyle (EAcOEt) ;
- ✓ la fraction du n-butanol (En-BuOH).

La Figure 15, résume les étapes de fractionnement de l'extrait brut. Les extraits sont conservés à température de 4°C.

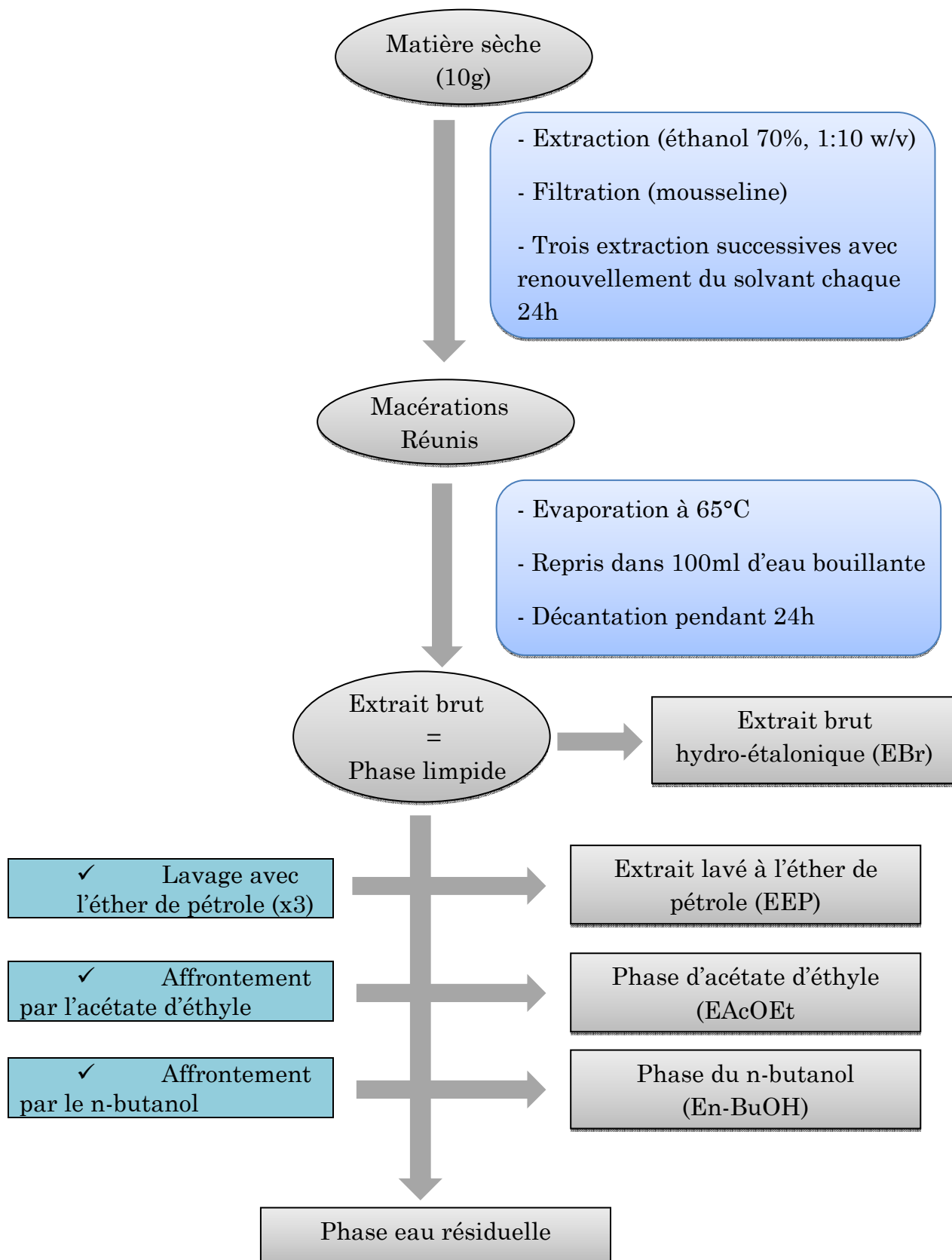


Figure 14 : Protocole d'extraction des flavonoïdes (Merghem *et al*, 1995)

## **V/ Dosage des flavonoïdes :**

### **1/ principe :**

Les flavonoïdes contenus dans les extraits éthanoliques sont quantifiés par la méthode d' $\text{AlCl}_3$  (Ayoola *et al.*, 2008).

- ✓ 1ml d'une solution éthanolique d' $\text{AlCl}_3$  (2%) est ajouté à 1ml de l'extrait.
- ✓ Après 30 minutes d'incubation à une température ambiante, l'absorbance du mélange est lue à 420 nm.

### **2/ Expression des résultats :**

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = a x + b$ ) réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1-25  $\mu\text{g/ml}$ ) dans les mêmes conditions que l'échantillon (figure 2, annexe).

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g).

### **3/ contrôle de la fiabilité de la méthode :**

Pour tester la fiabilité cette méthode, on a effectué une extraction suivit d'un dosage des flavonoïdes dans le quercétine de concentration connue (0,5mg/g).

## **VI/ Analyse qualitative par HPLC:**

L'analyse est réalisée par un HPLC au niveau du laboratoire d'UATRS-CNRST : l'unité d'appuis technique à la recherche scientifique.

Le besoin de savoir les profils et d'identifier les composés individuels dans les échantillons exige des méthodes sophistiquées. L'HPLC est sans doute la technique analytique la plus utile pour caractériser les composés polyphénoliques (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

### **1/ Principe :**

20  $\mu\text{l}$  de chaque extrait ont été injectés sur une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125 x 4.6 mm. La phase mobile est constituée de trois éluants : l'eau distillée, méthanol, acide acétique (50 : 47 : 2.5) (V /V /V). Le gradient d'élution appliqué est de type isocratique étalé sur 10 min. Le débit est de 1 ml / min (Amarowicz *et al.*, 2005).

La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à deux longueurs d'ondes (280 nm et 330 nm).

## **2/ Expression des résultats :**

Les flavonoïdes contenus dans chaque extrait analysé ont été identifiés par la comparaison des temps de rétention obtenus par ceux des témoins.

## **VII/ Evaluation de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes :**

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des éléments très importants pour la vie de l'organisme suite à l'implication de leurs effets bénéfiques, par exemple les radicaux oxygéniques exercent des actions critiques sur les signaux de traduction, et sur les gènes de transcription, les cellules phagocytaires (macrophages) utilisent également les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) pour combattre les agents infectieux (bactéries et virus). Cependant ces mêmes radicaux peuvent causer des dégâts oxydatifs cellulaires, endommagement des tissus et même la mort des cellules et le développement des processus pathologiques (**Fotsing Matene, 2005 ; Wang *et al*, 2008**).

Les antioxydants naturels sont présents dans l'alimentation ; pour la plupart se sont des composés phénoliques qui possèdent au moins un noyau aromatique, contenant un ou plusieurs substituants, en effet cette propriété antioxydante est en relation directe avec la structure de ces molécules (**Cosio *et al*, 2006**).

### **2-1/ Test de blanchissement du $\beta$ - Carotène :**

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydroperoxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (**Tepe *et al.*, 2006**), qui attaquent simultanément le  $\beta$ - carotène et ayant comme résultat le blanchissement du  $\beta$ -carotène et la disparition de sa couleur jaune (**Deba, 2008**).

#### **➤ Principe :**

Premièrement 2 mg de  $\beta$ - carotène ont été dissous dans 1 ml de chloroforme. La solution du  $\beta$ -carotène-chloroforme a été introduite dans un ballon contenant 2 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été éliminé en utilisant un bain marie.

Ensuite 100 ml de l'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutées lentement avec agitation vigoureuse. 2.5 ml de cette nouvelle solution sont transférées dans des tubes et 350 $\mu$ l de chaque extrait (2g/l dans le méthanol) et du témoin BHT (butyle hydroxytoluène) sont ajoutées.

Pour le témoin BHT (butyle hydroxytoluène), on pèse 1g/ 100ml d'éthanol et pour le contrôle négatif on utilise de l'eau distillé.

La lecture de l'absorbance à 470 nm est effectuée immédiatement après l'addition des échantillons, puis les tubes sont placés dans un bain marie à 50°C. L'absorbance est lue chaque 20 min pendant 120 min.

#### ➤ Expressions des résultats :

L'activité anti-oxydante des extraits est comparée avec celles du témoin et du control négatif.

L'activité anti-oxydante relative après 120 minutes est calculée selon la relation

$$\text{AAR} = (\text{Abs Echantillon} / \text{Abs BHT}) \times 100$$
 suivante :

Où :

AAR : Activité anti-oxydante relative ;

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon après 120 minutes;

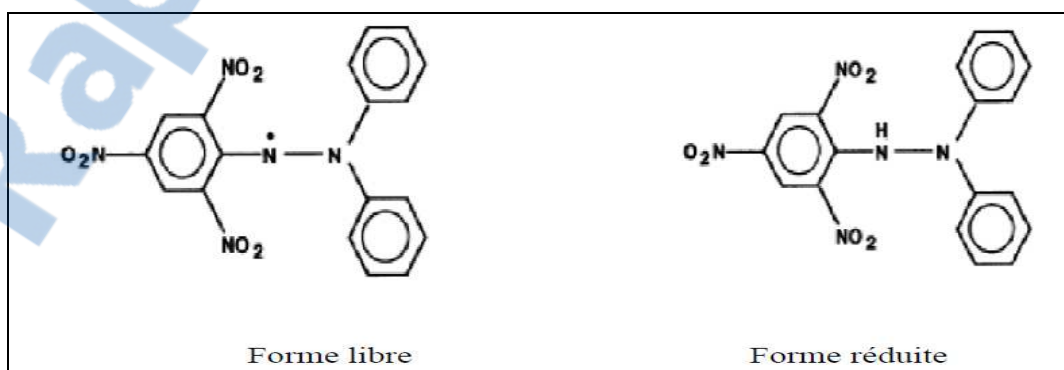
Abs BHT : Absorbance du BHT après 120 minutes;

#### 2-2/ Test au DPPH :

L'activité du balayage des radicaux libres a été mesurée en employant le radical libre stable DPPH (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>) qui est l'un des essais principaux employés pour explorer l'utilisation des extraits d'herbes comme antioxydants (Markowicz Bastos *et al.*, 2007).

#### ➤ Principe :

En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH. (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 Diphenyl 1 picryl hydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al.*, 2006).



**Figure 15 : Forme libre et réduite du DPPH (Mohammedi, 2006)**

L'activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par **(Lopes-Lutz *et al.*, 2008)**. Dans des tubes on introduit 2.5 ml de chaque extrait (0.1mg/ml) et 1ml de la solution méthanolique au DPPH (0.3 mM), après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

L'absorbance est lue chaque 20 min pendant 120 min.

Le contrôle négatif est l'eau distillée et le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard le BHT.

➤ **Expressions des résultats :**

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\% = [1 - (\text{Abs Echantillon} - \text{Abs Control négatif})] \times 100$$

Où

% : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif ;

## I/ Les polyphénols :

La méthode d'extraction doit permettre l'extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique. L'eau et les mélanges aqueux de l'éthanol sont généralement utilisés pour l'extraction (**Turkmen *et al.*, 2007**).

La solubilité des composés phénoliques est en fonction de leur degré de polymérisation, l'interaction avec les autres constituants et le type de solvant utilisé.

La teneur en polyphénols a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols, des plantes médicinales et les nourritures (**Abdel-Hameed, 2009**).

L'acide gallique est le standard (Figure.1,Annexe I) le plus souvent employé dans la méthode de Folin-Ciocalteu (**Maisuthisakul *et al.*, 2008**).

### 1/ Optimisation de l'extraction des polyphénols :

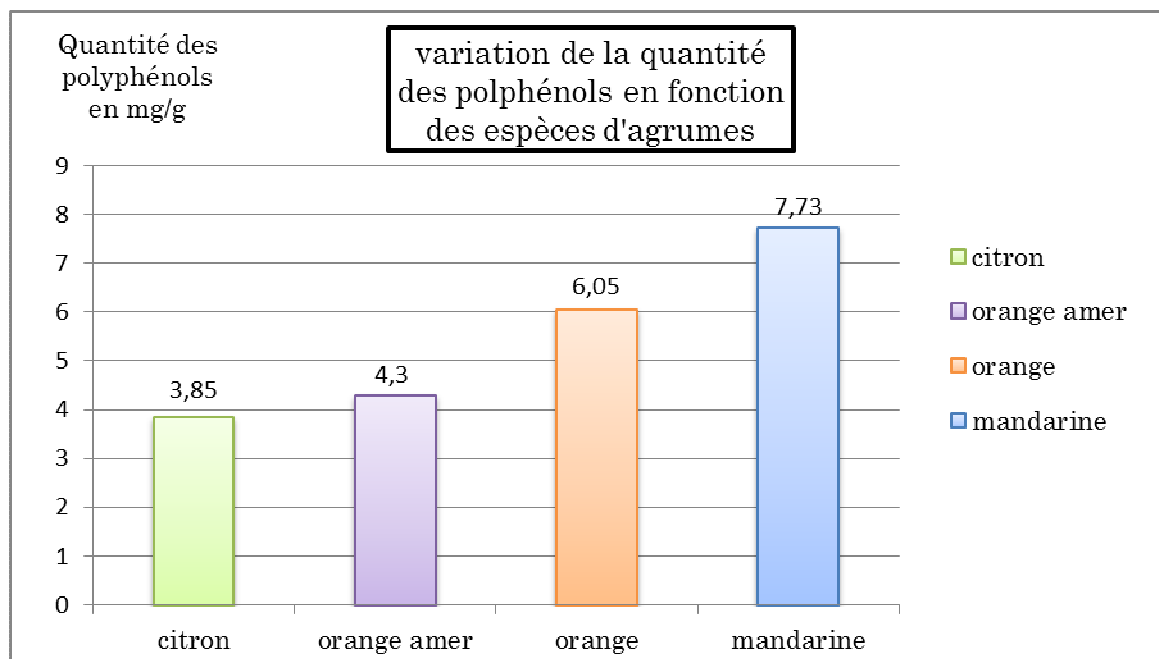
#### 1-1/ Optimisation du matériel végétal :

##### ➤ Par rapport aux différentes espèces d'agrumes :

Généralement, toutes les espèces du genre citrus sont connues pour leurs composés phénoliques (**Li, Smith, et Hossain, 2006 ; MA, Chen, Liu, et le YE, 2009 ; MA et autres, 2008 ; Moulehi, Bourgou, Ourghemmi, Saidani Tounsi 2012**).

On a procédé à cette optimisation pour chercher la meilleure source de polyphénols parmi les zestes des différentes espèces d'agrumes présents sur le marché, qui sont :

- *Citrus aurantium* = le bigaradier (Oranger amer)
- *Citrus reticulata* = le mandarinier
- *Citrus limon* = le citron
- *Citrus sinensis* = l'orange



**Histogramme 1:** variation de la quantité des polyphénols en fonction des différentes espèces d'agrumes.

Les résultats schématisés sur l'histogramme 1 montrent clairement que la quantité des polyphénols est élevée dans les zestes du mandarine avec une valeur de 7,73 mg/g, suivi par les zestes d'orange avec une valeur de 6,05 mg/g, puis les zestes d'orange amer avec 4,3mg/g et finalement les zestes du citron avec 3,85mg/g.

Cette étude nous a permis de conclure que la meilleure source des polyphénols, parmi ces quatre espèces d'agrumes, est la mandarine avec un ordre comme suit : mandarine > orange > orange amer > citron.

Cet ordre est si proche à celui de **Smith, 2006** : mandarine > orange > citron mais nos résultats sont significativement élevés des teneurs trouvés par son équipe. Il a trouvé 1,21mg/g dans les zestes de mandarine, 0,73 mg/g dans les zestes d'orange et 0,59mg/g dans les zestes du citron.

Nos résultats sont aussi significativement élevés des teneurs trouvés par **I. Moulehi et al, 2012**). Il a trouvé une teneur des polyphénols dans les zestes de mandarine de 0,68mg/g et une teneur dans les zestes de l'orange amer de 1,35, mais il a trouvé que orange amer >mandarine, ce qui différent de l'ordre trouvé dans notre expérience.

Donc les espèces cultivées au Maroc contiennent 7 fois plus des polyphénols trouvés dans New Zélande (**Smith, 2006**) et dans la tunisie (**I.Moulehi et al, 2012**).



Les résultats décalés résultent vraisemblablement de:

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca *et al.*, 2006).

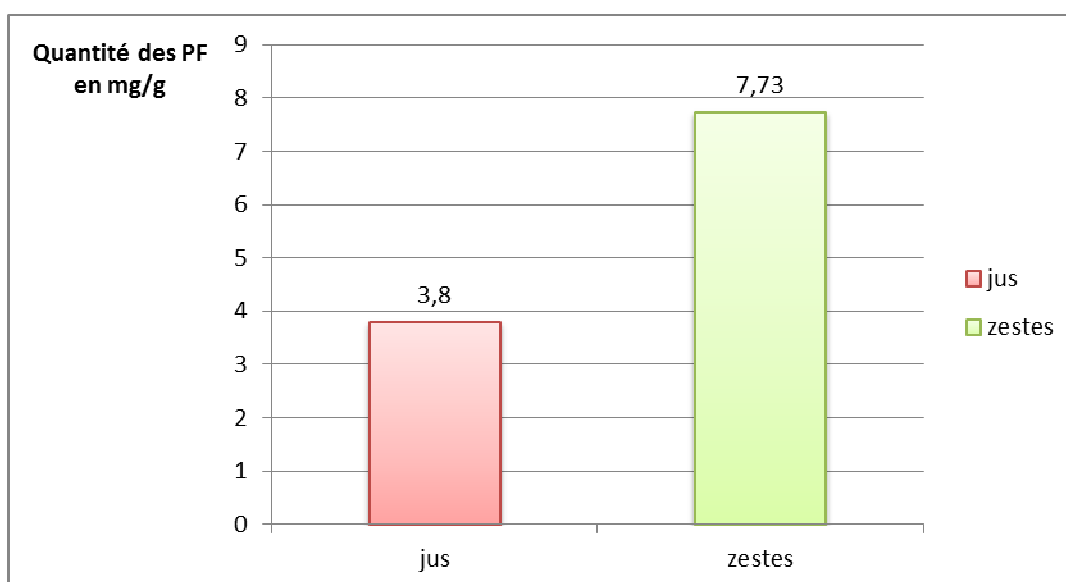
Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007).

Et la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (origine géographique, conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Falleh *et al.*, 2008 ; Podsedek, 2007 ; Amaral *et al.*, 2010).

Les résultats de (I. Moulehi *et al.*, 2012) confirment que la teneur en polyphénols montre des différences considérables, au cours des différentes périodes de maturité d'une espèce donnée (*citrus reticulata*).

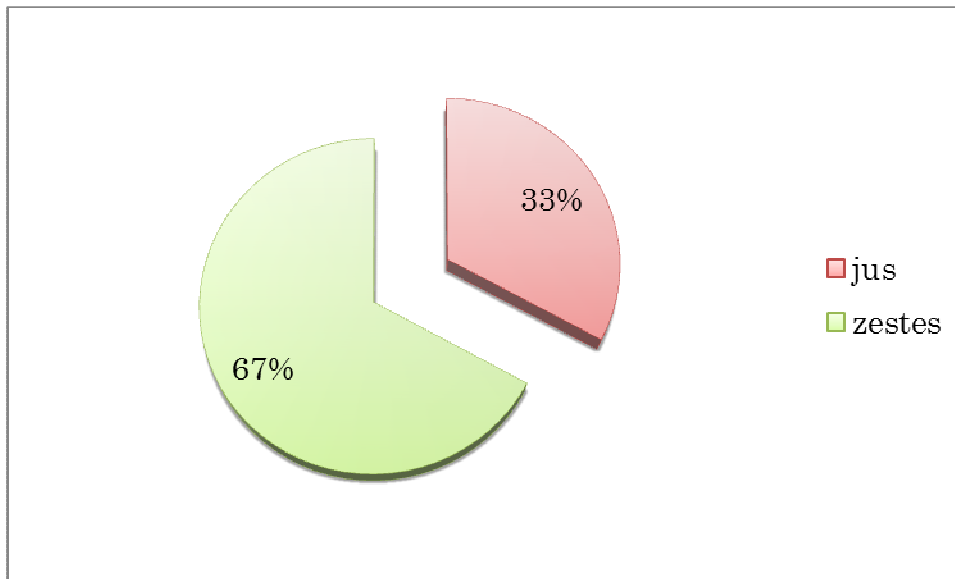
#### ➤ Par rapport aux différentes parties du fruit :

On a voulu comparer entre la quantité des polyphénols des zestes et du jus dans l'espèce qui contient plus de polyphénols : *citrus reticulata* (la mandarine).



**Histogramme 2:** quantité des polyphénols dans différentes parties de la mandarine.

L'histogramme 2 nous montre que les zestes contiennent presque deux fois plus la quantité trouvée dans le jus avec des valeurs de 7,73mg/g pour les zestes et 3,8mg/g pour le jus.



**Camembert secteur:** pourcentage des polyphénols dans les zestes et le jus de l'espèce *citrus reticulata* (la mandarine).

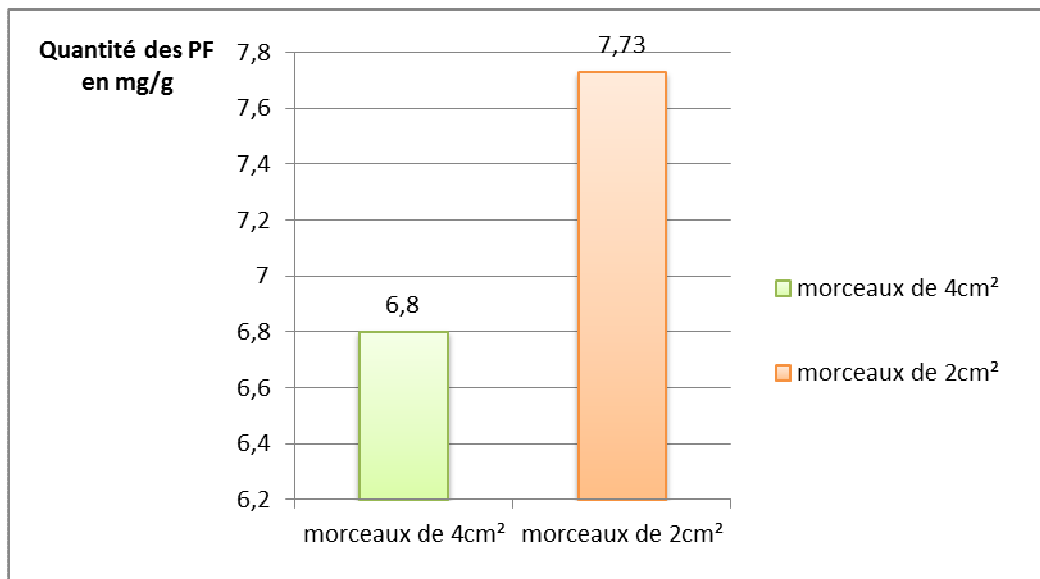
Cet histogramme figure affirme que dans le fruit, mandarine, les zestes contiennent 67% des polyphénols du fruit, tandis que le jus consommable contient seulement 33%.

Cette expérience montre que les zestes contiennent des quantités de polyphénols plus importantes que le jus et c'est semblable à la conclusion ressortie des travaux de **(yusof, Mohd ghazali et Swee king, 1990)**.

➤ **Par rapport à la forme sous laquelle les zestes sont présentés :**

dans des études antérieures **(Garcia-Ayuso & Luque de Castro, 1999; Cuoco, Mathe, Archier, Chemat, & Vieillescazes, 2008; Vilku, Mawson, Simons, & Bates, 2008; Wang & Weller 2006)**, la taille des particules a été considéré comme l'un des facteurs importants qui peuvent affecter l'extraction des polyphénols des écorces d'orange.

Ainsi on a travaillé sur deux types de présentation des zestes : des zestes coupés en morceaux de 4cm<sup>2</sup> et d'autres coupés en 2m<sup>2</sup> pour augmenter la zone du contact avec le solvant d'extraction.



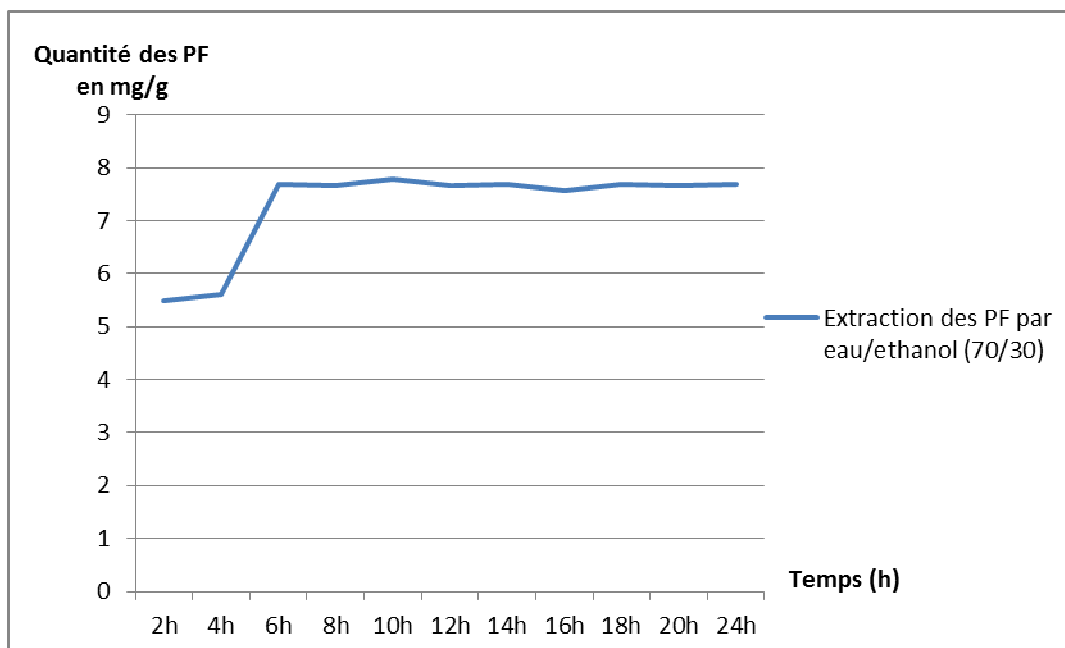
**Histogramme 3:** quantité des polyphénols dans les deux formes des zestes de la mandarine.

Cet histogramme montre que les zestes de *citrus reticulata* (la mandarine) sous leur forme dilacérés fournissent 7,73mg/g de polyphénols ce qui dépasse la quantité fournie par les zestes de la même espèce mais coupés en petits morceaux qui ne donne que 6,8mg/g.

Suite aux résultats obtenus par cette optimisation du matériel végétal, on a pu conclure que le meilleur rendement des polyphénols est donné par des zestes dilacérés de *citrus reticulata* (la mandarine).

### 1-2/ Optimisation du temps de l'extraction :

Cette optimisation nous permet de préciser le temps optimum pour un meilleur rendement d'extraction.



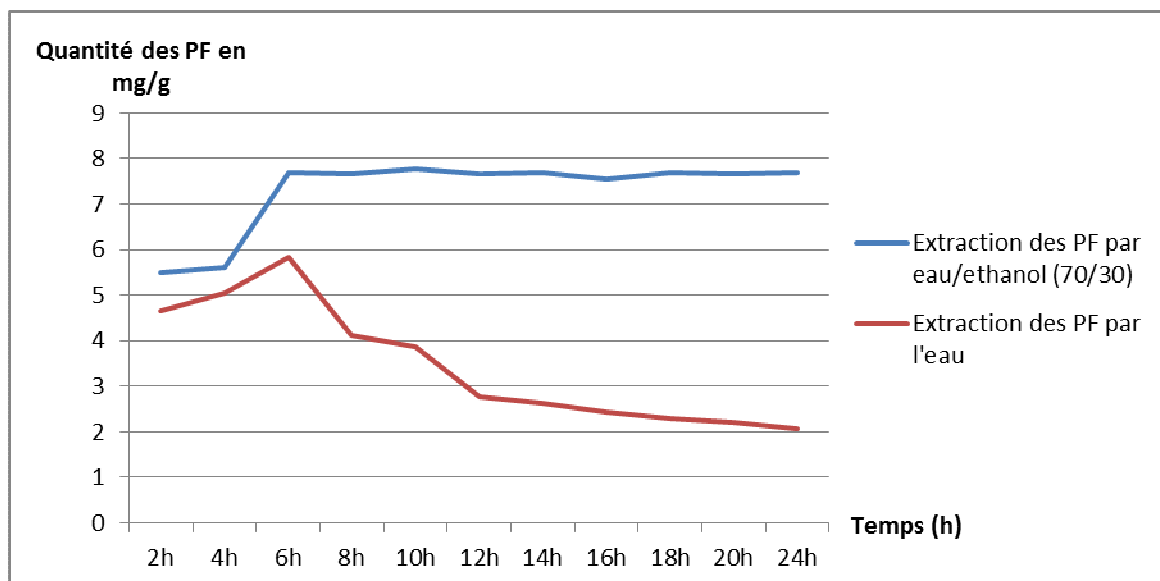
**Courbe 1:** Quantité des polyphénols extraite des zestes de la mandarine en fonction du temps.

Comme la montre la courbe en dessus, après 6h du lancement de l'extraction, la quantité des polyphénols extraite atteint son maximum avec une valeur de 7,7mg/g, cette valeur reste plutôt stable avec  $\pm 0,1$  mg/g, toute au long des 18h qui suivent.

Donc le temps optimum d'extraction est 6h, elle était aussi considérée comme temps optimum d'extraction dans les recherche de **(Li, Smith, et Hossain, 2006)**.

### **1-3/ Optimisation du solvant de l'extraction :**

Même en utilisant l'eau seulement comme solvant d'extraction, 6h reste le temps optimum d'extraction avec une valeur de 5,84mg/g, sauf qu'après on observe une chute remarquable dans les quantités des polyphénols en fonction du temps et cela s'explique par la présence des microorganismes qui participent en majorité dans la dégradation de la matière organique et en particulier les polyphénols.



**Courbe 2:** Quantité des polyphénols extraite des zestes de la mandarine par deux solvants en fonction du temps.

Cette dernière expérience nous a permis, de constater que le solvant d'extraction eau/éthanol (70/30) est le meilleur solvant d'extraction par rapport au solvant totalement aqueux, avec une différence de 1,86mg/g, et ceci est en concordance avec les résultats de **B.B. Li, B. Smith et Md. M. Hossain (2006)**.

## 2/ Optimisation de l'enrichissement du solvant en fonction du rapport Matériel végétal/solvant :

On a procédé à l'enrichissement par une extraction des polyphénols des zestes de citrus reticulata par renouvellement du matériel végétal tout en gardant le même solvant

Cette optimisation a pour but de savoir le maximum de concentration en polyphénols dans le solvant pour différents rapport matériel végétal/solvant.

Rapport matériel végétal /solvant	Nombre de renouvellement du matériel végétal						
	E0	E1	E2	E3	E4	E5	E6
10%	7,7	11,8	16,6	20,5	25,2	31,2	Aspect pâteux
20%	13,21	17,1	19,2	23,1	Aspect pâteux		
30%	10,5	13	Aspect pâteux				

**Tableau 3 :** Quantité des polyphénols dans l'extrait en fonction du rapport matériel végétal/solvant.

Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent que pour un rapport de 10% du matériel végétal/solvant, la concentration initiale est de 7,7mg/g. Elle atteint, une concentration de 31,2mg/g, après cinq renouvellements du matériel végétal,.

Pour le rapport de 20% du matériel végétal/solvant la concentration initiale est de 13,21mg/g. Elle atteint après trois renouvellements une concentration de 23,1mg/g, dans ce rapport on n'a pas pu rajouter car après un quatrième renouvellement le solvant regain un aspect pâteux.

Pour le rapport de 30% du matériel végétal/solvant, le solvant ne peut subir que deux extractions successives dont la première donne une quantité modeste des polyphénols qui est 10,5mg/g et la deuxième ne diffère pas beaucoup avec une valeur de 13mg/g, ces résultats modestes ont comme cause le problème d'agitation rencontré dans ce rapport.

Cette expérience nous permet de conclure que le rapport matériel végétal/solvant de 10% est celui qui donne le maximum de concentration en polyphénols dans le solvant. Elle atteint 0,31g/g.

## **II/ Les flavonoïdes :**

La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (**Gomez-Caravaca *et al.*, 2006**).

### **1/ Teneur en flavonoïdes :**

Selon (**Elâgoun, 2003**) l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou flavonoïdes mono O- glycosides et partiellement di-O-glycosides, tandis que le n-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-O-glycosides et tri-glycosides et Cglycosides.

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d'AlCl<sub>3</sub> en utilisant comme standard la quercétine (Figure.2, Annexel), les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg EQ/g d'extrait.

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes (Tableau 9) révèlent que :

Le taux des flavonoïdes dans les extraits L'Ebr et l'En-BuOH des zestes de citrus reticulata est presque la même quantité avec une teneur de 0.72 mg/g pour la fraction d'extrait brut et 0.75 mg /g pour la fraction EnBuOH, suivit la fraction AcOEt avec une teneur de 0,48mg/g puis la fraction EEP qui contient 0,28mg/g.

**Tableau 4:** teneur en flavonoïdes dans différentes phases de l'extrait des zestes de citrus reticulata.

Extrait	Teneur en flavonoïdes
Ebr	0,72mg/g
EEP	0,28mg/g
EAcOEt	0,48mg/g
En-BuOH	0,75mg/g

On remarque que même si les fractions l'EEP, l'E AcOEt et L'En-BuOH sont issue de l'épuisement de la fraction E Br, la somme du taux des flavonoïdes des trois fractions l'EEP, l'E AcOEt et L'En-BuOH est très supérieurs de celui de la fraction mère E Br.

Cela est dû au solvant utilisé pour le fractionnement : l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Ces solvants peuvent libérer d'avantages les flavonoïdes complexés avec d'autres molécules.

En tenant compte, de la sélectivité de chaque solvant utilisé pour le fractionnement on admet que les zestes de citrus reticulata est riche en di-O-glycosides et tri-glycosides et contient des flavonoïdes glycosylés et les aglycones. Ce qui est cohérent avec la découverte de **Mouly et al., (1998)**.

## 2/ Contrôle de fiabilité de la méthode :

Nous avons contrôlé la fiabilité de la méthode en appliquant celle-ci (extraction + dosage) sur un milieu contenant uniquement de la quercétine à une concentration connue (0,5mg/g).

**Tableau 5:** teneur en flavonoïdes dans différentes phases de l'extrait du quercétine à concentration connue (0,5mg/g).

Extrait	Teneur en flavonoïdes
Ebr	0,37mg/g
EEP	0,11mg/g
EAcOEt	0,12mg/g
En-BuOH	0,38mg/g

L'extrait brut du quercétine est de 0,38mg/g alors que la concentration du départ est de 0,5mg/g. La méthode (extraction/dosage) a un rendement de 76% des flavonoïdes.

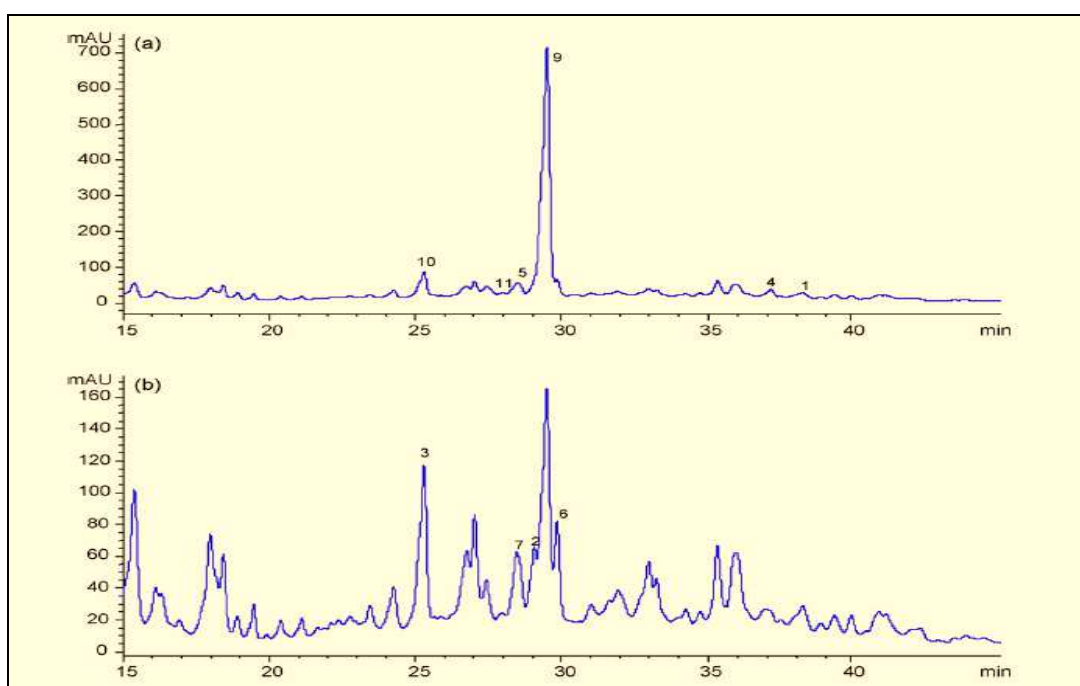
### 3/ Analyse qualitative par HPLC :

L'éthanol utilisé pour l'extraction a un rôle protecteur. Il peut empêcher les composés phénoliques d'être oxydés par des enzymes, telles que des phénoloxydases.

La colonne utilisée pour séparer les flavonoïdes est exclusivement à phase inverse. Ce système est une haute technique de résolution chromatographique largement répandue, pour la séparation des substances phénoliques (**Proestos *et al.*, 2006**).

Nous avons dosés qualitativement l'extrait brut issu de l'extraction des flavonoïdes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Les chromatogrammes (a) et (b) (figure 16) nous a permis de dégager 10 flavonoïdes différents (tableau 6) : Poncirine ; Dydimine ; Naringine ; Hesperidine ; Neeroioctrine ; Narirutine ; Rhoifoline ; Rutine ; Diosmine et Isorhoifoline.



**Figure 16:** chromatogramme d'HPLC de l'E Br des zestes de mandarine enregistré à : (a) 280 nm et (b) 330 nm.

La comparaison des temps de rétention des standards avec ceux enregistrés dans les différents chromatogrammes (figure 16), permet l'identification probable de certains flavonoïdes dans nos extraits (tableau 6).



**Tableau 6 : flavonoïdes d'E Br dégagés des chromatogrammes (a) et (b)**

chromatogramme	Numéro	Flavonoïde trouvé
<b>(a) à 280 nm</b>	1	Poncirine
	4	Dydimine
	5	Naringine
	9	Hesperidine
	10	Neoeriodine
	11	Narirutine
<b>(b) à 330 nm</b>	2	Rhoifoline
	3	Rutine
	6	Diosmine
	7	Isorhoifoline

Ces résultats cohérent partiellement avec beaucoup de travaux (**Mouly et al., 1998 ;Yaqin Ma et al.,2007 ; Khizar Hayata et al.,2010 ; Deena Ramfula et al.,2010 ; Wei Li et al.,2012 ; Ikram Moulehi et al.,2012**) mais elles différent par l'absence de certains composés comme : quercétine et catéchine et la présence d'autres composés nouveaux comme : Poncirine et isorhoifoline.

Nous n'avons pas quantifié par HPLC les différents flavonoïdes car le laboratoire manque des standards.

#### **4/ Activité antiradicalaire :**

Les extraits sont des mélanges de plusieurs composés, avec différents groupements fonctionnels, polarités et comportements chimiques. Cette complexité chimique des extraits pourrait mener à des résultats dispersés selon l'essai utilisé. Par conséquent, une approche avec des analyses multiples pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits serait plus instructif et même nécessaire (**Ozturk et al., 2007**).

Dans ce travail, deux méthodes sont utilisées : méthode de blanchissement de  $\beta$ - carotène et le balayage du radical libre DPPH.

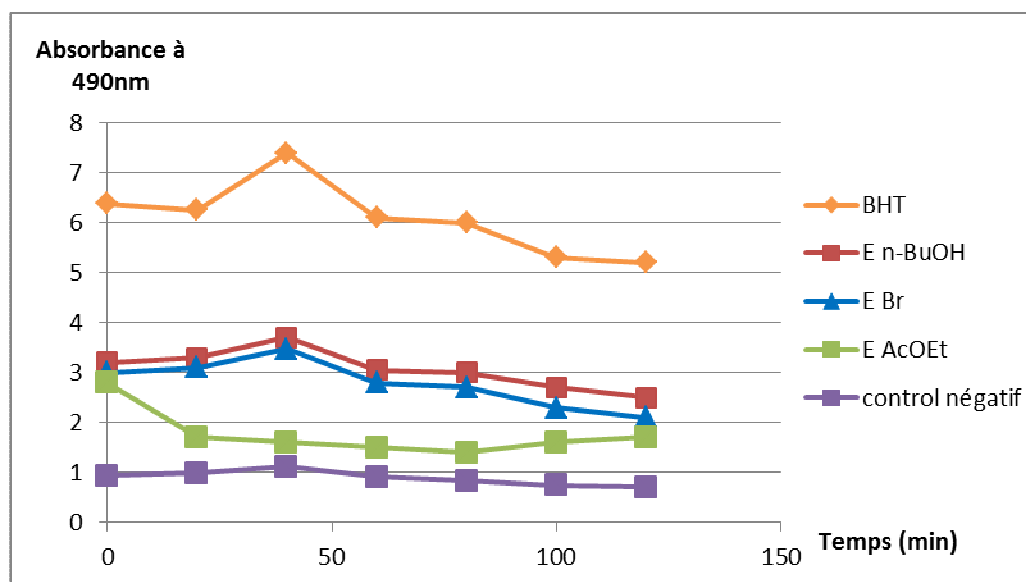
##### **4-1/ Test de blanchissement du $\beta$ - Carotène :**

La décomposition des acides gras est une des causes principales de la détérioration de la nourriture. L'inhibition de l'oxydation des acides gras par l'utilisation des conservateurs naturels, est une question importante dans l'industrie alimentaire (**Kartal et al., 2007**).

Le changement d'absorbance à différents intervalles de temps (courbe 1) du  $\beta$ - carotène a montré que l'Ebr et l'En-BuOH de l'extrait semble à être les

meilleurs inhibiteurs d'oxydation avec des absorbances proche en fonction de temps.

Plus l'inhibition d'oxydation est élevée, plus le pouvoir antioxydant est élevé.



**Courbe 3:** Changement d'absorbance du  $\beta$ - carotène à 470 nm en présence des extraits des zestes de citrus reticulata, BHT et le control négatif.

Les résultats (courbe 3) ont indiqué que les extraits des zestes de citrus reticulata ainsi que le BHT (butyle hydroxytoluène) inhibe d'une manière significative l'oxydation couplé de l'acide linoléique  $\beta$ -carotène par rapport au control négatif.

L'activité anti-oxydante relative après 120 minutes est calculée selon la relation

$$\text{AAR} = \left( \frac{\text{Abs Echantillon}}{\text{Abs BHT}} \right) \times 100 \quad \text{suivante :}$$

Où :

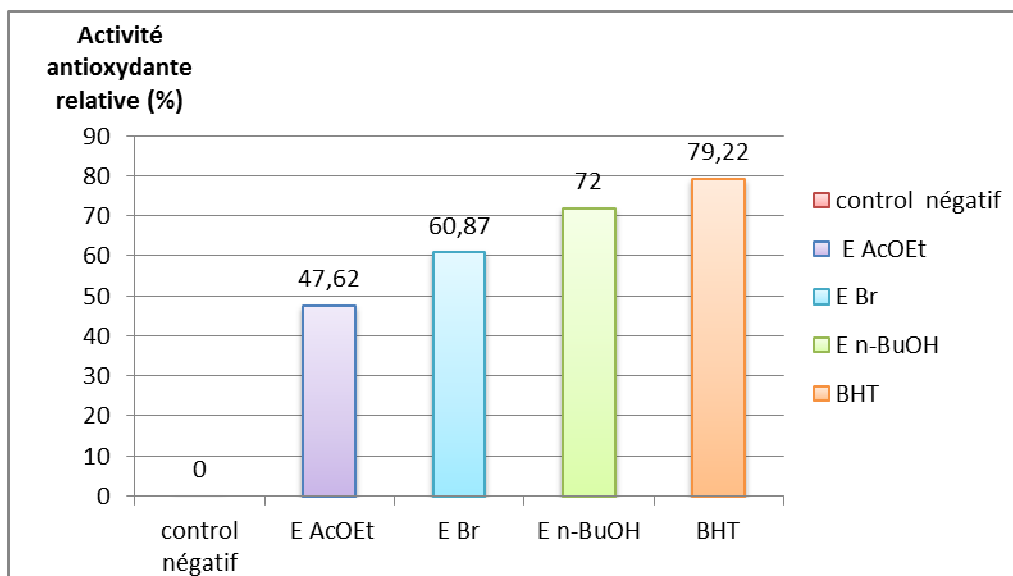
AAR : Activité anti-oxydante relative ;

Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon après 120 minutes;

Abs BHT : Absorbance du BHT après 120 minutes;

Pour les extraits des zestes de citrus reticulata l'inhibition la plus élevée a été fournie par l'En-BuOH (72%) suivie par l'EBr (60,87%) et en dernier l'EAcOEt (47,62%).

Malgré cette inhibition l'activité de ces trois fractions reste inférieure par rapport au control positif BHT.



**Histogramme 4:** Activité antioxydante relative des extraits des zestes de citrus reticulata, BHT et le control négatif.

Les deux fractions AcOEt et n-BuOH sont riches en flavonoïdes, ceci suggère un lien entre l'activité anti-oxydante des deux fractions et ces composants.

Ce lien reste conditionné par la structure des flavonoïdes, particulièrement la substitution hydroxy pour les anneaux aromatiques A et B et le modèle de substitution de l'anneau C, les flavonoïdes les plus actifs possèdent de 3 à 6 groupes d'hydroxyle (**Tsimogiannis *et al.*, 2007 ; Le *et al.*, 2007**), tandis que l'hydroxylation en position C3 semble être nuisible pour leur pouvoir antioxydant et pour l'activité de chélation du fer. En revanche la glycosylation des flavonoïdes réduit leurs capacités de piéger les radicaux libres (**Ramassamy, 2006**).

La relation entre le contenu phénolique et l'activité anti-oxydante est un aspect intéressant, mais il faut prendre en considération que les composés phénoliques répondent différemment dans l'analyse, selon le nombre de groupes phénoliques et que les composés phénoliques totaux n'incorporent pas nécessairement tous les antioxydants qui peuvent être présents dans un extrait (**Tawaha *et al.*, 2007**).

L'attribution exacte de la capacité anti-oxydante à un composé, ou un petit groupe de composants dans un extrait de plante est une tâche difficile, puisque l'activité efficace dépend de plusieurs facteurs, tels que la concentration, les formes isomériques et l'interaction synergique avec d'autres composants (**Almela *et al.*, 2006**).

#### 4-2/ Test au DPPH :

Le radical DPPH est un radical libre organique stable, avec une bande maximum d'absorption entre 515-528 nm.

Dans cet essai les antioxydants réduit et décolore le radical DPPH, à un composé jaune le diphenyl picryl hydrazine, l'ampleur de la réaction dépendra de la capacité des antioxydants de donner l'hydrogènes (**Ardestani et Yazdanparast, 2007**).

Les résultats peuvent être exprimés en tant que : pourcentage de l'activité antiradicalaire ou en pourcentage de DPPH restant (**Markowicz Bastos et al., 2007**).

Les résultats peuvent être exprimés en tant que l'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$\% = [1 - (\text{Abs Echantillon} - \text{Abs Control négatif}) \times 100]$$

Où

% : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ;

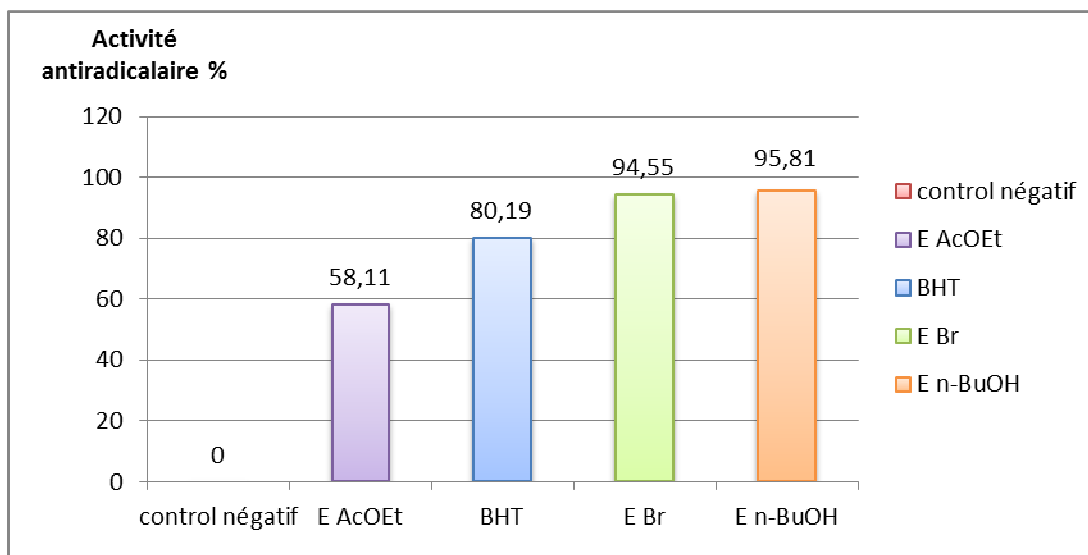
Abs Echantillon : Absorbance de l'échantillon ;

Abs Control négatif : Absorbance du control négatif ;

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (Histogramme 5), révèlent que tous les extraits testés ainsi que le BHT (butyle hydroxytoluène) pris comme référence sont des anti-radicalaires.

L'En-BuOH des zestes de citrus reticulata a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée (95,81%), suivie par l'EBr (94.55%), ces deux fractions ne présentent pas une différence significative dans leur activité, puis en dernier l'EAcOEt (58.11%).

Nous constatons aussi que L'En-BuOH et l'E Br ont présenté une activité plus élevée que celle du control positif (BHT). Cette activité pourrait être liée à leur richesse en polyphénols.



**Histogramme 5:** Activité antiradicalaire des extraits des zestes de citrus reticulata, BHT et le control négatif.

Les valeurs varient selon l'ordre suivant : l'E AcOEt < l'E Br < L'En-BuOH, cet ordre est le même trouvé par **(Maria A. Anagnostopoulou et ses collaborateurs, 2006)**.

Selon **(Turkmen et al., 2007)** les polyphénols semble être des donateurs efficaces d'hydrogène au radical DPPH, en raison de leur chimie structurale idéale.

Les autres composés phénoliques mineurs ne devraient pas être négligés, par ce que la synergie entre les différents produits chimiques l'un avec l'autre devrait être pris en considération dans l'activité biologique **(Bourgou et al., 2008)**.

D'un autre côté, la fraction phénolique n'incorpore pas tous les antioxydants et les interactions synergiques entre les antioxydants dans un mélange fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et la nature des antioxydants **(Falleh et al., 2008)**.

La hiérarchie observée dans l'activité anti-oxydante a été également constatée dans nos résultats, qui révèlent une meilleure activité anti-oxydante de tous les extraits dans le test au DPPH que le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène. Le test au DPPH est simple, très rapide et indépendant de la polarité des échantillons **(Kartal et al., 2007)** ce qui peut expliquer cette hiérarchie.

## Conclusion générale :

Dans ce travail, nous avons extrait les polyphénols et les flavonoïdes, des zestes d'agrumes, par un mélange de solvant eau/éthanol. Nous avons étudié l'activité anti-oxydante des fractions issues de l'extraction des flavonoïdes : l'extrait brut (l'E Br), la fraction du n-butanol (l'E AcOEt) et la fraction d'acétate d'éthyle (l'E n-BuOH). Nous avons pu tirer les conclusions suivantes :

✿ la quantité de polyphénols que nous avons trouvée dans les zestes des espèces (mandarine, orange, orange amer, citron) cultivés au Maroc sont 5 fois plus importante que celle trouvée dans les études effectuées sur les espèces d'autre pays (Tunisie et New Zélande).

✿ L'augmentation de la quantité des polyphénols était dépendante à la fois du solvant d'extraction, le temps d'extraction, l'espèce utilisée et la taille de particules utilisées. Le maximum d'extraction des polyphénols correspond à 7,7mg/g, obtenue dans un mélange eau /éthanol (70/30) (v/v), au bout de 6h d'agitation, à partir des zestes du mandarine (*Citrus reticulata*) avec des particules de taille de 2cm<sup>2</sup>.

✿ Les extraits L'Ebr et l'En-BuOH des zestes de *Citrus reticulata* sont plus riches en flavonoïdes que les fractions AcOEt et EEP. En tenant compte, de la sélectivité des solvants utilisés pour le fractionnement : l'acétate d'éthyle et le n-butanol, on conclue que les zestes de *Citrus reticulata* sont riches en di-O-glycosides et tri-glycosides et contiennent des flavonoïdes glycosylés et les aglycones.

✿ Le contrôle de la fiabilité de la méthode (extraction des flavonoïdes + dosage) par la quercétine, nous montre que celle-ci a un rendement de 76%.

✿ L'analyse qualitative des flavonoïdes, par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), a révélé que notre extrait contient 10 flavonoïdes différents.

✿ Les deux extraits l'Ebr et l'En-BuOH ont montré une activité antioxydante très importante avec le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et avec le test au DPPH, par rapport aux autres extraits pauvres en flavonoïdes.

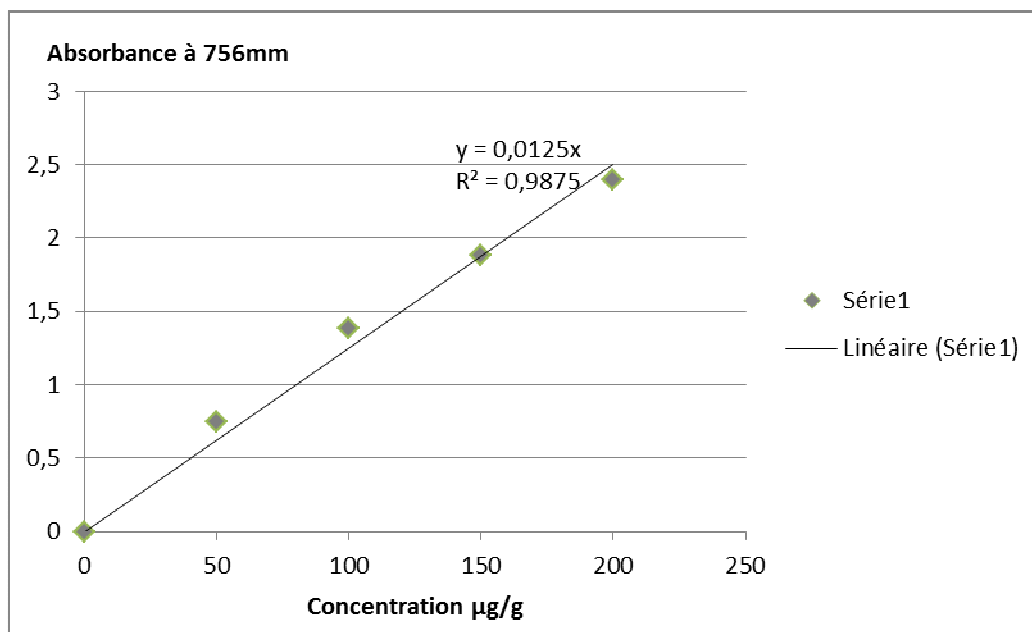
✿ Ces deux fractions, riches en flavonoïdes, montrent un haut pouvoir antioxydant, ceci suggère que l'activité anti-oxydante est due en majorité aux flavonoïdes.

✿ Avec le test au DPPH, les fractions En-BuOH et E Br ont aussi présenté une activité antioxydante plus élevée que celle du control positif

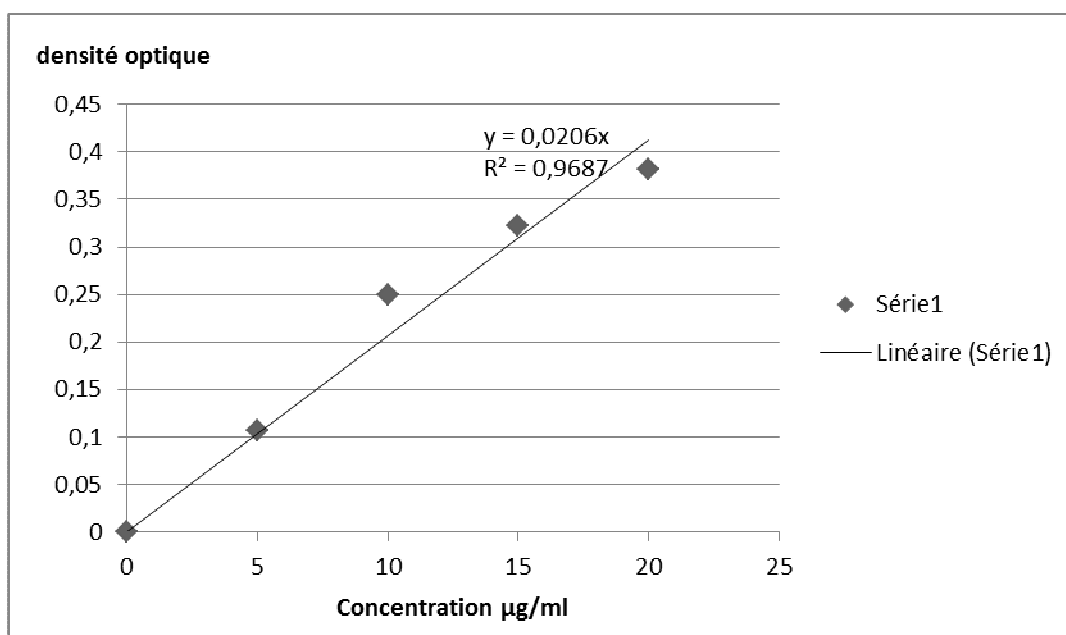
(BHT). Il parait clairement que les flavonoïdes des zestes de citrus reticulata sont des vrais concurrents pour le BHT. Ces flavonoïdes présentent un avantage important par rapport au BHT (antioxydant synthétique) car ils sont d'origine naturelle.

La technologie industrielle peut donc exploiter les zestes d'agrumes, riche en flavonoïdes, afin de remplacer les antioxydants synthétiques qui pourrait nuire à la santé. Ceci mènerait le Maroc à valoriser les déchets industriels en tant qu'une source économique importante.

## Annexe :



**Figure 1:** Courbe étalon du dosage des polyphénols (L'acide gallique Moyenne de 3 essais).



**Figure 2:** Courbe étalon du dosage des flavonoïdes (Quercétine avec le réactif de L'AlCl<sub>3</sub> Moyenne de 3 essais).



## Référence :

### A

**Abdel-Hameed, E.S.**, (2009) Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chem.* **114**:1271-1277.

**Ak T, Gülçin I.** Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interact.* 174 (2008) 27-37.

**Almela, L., Sanchez-Munoz, B., Fernandez-Lopez, J A., Roca, M.J, Rabe, V.** (2006) Liquid chromatographic- mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatography A.* **1120**: 221-229.

**Amaral, J.S., Valentao, P., Andrade, P.B., Martins, R.C., Seabra, R.M.**, 2010. Phenolic composition of hazelnut leaves: influence of cultivar, geographical origin and ripening stage. *Sci. Hortic.* 126, 306–313.

**Amarowicz, R., Troszynska, A., Shahidi, F.** (2005) Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J food lipids.* **12**: 344-358.

**Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. et Trinajstić N.** 2003. Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **76** (1) : 55-61.

**Amra Perva-Uzunalic, Mojca Skerget, Zeljko knez, Bernd weinreich, Frank Otto, Sabrien Gruner**, 2006, Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry* 96 597-605.

Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Boskou D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chem.* 94 (2006) 19-25.

**Ardestani, A., Yazdanparast, R.** (2007) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.* **104**: 21-29.

**Ayoola G. A., Ipav S. S., Solidiya M. O., Adepoju-Bello A. A., Coker H. A. B. et Odugbemi T. O.** 2008. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (*Guttiferae*). *International journal of health research.*, **1** (2) : 81-93.

### B

**Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y.** (2007) Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules.* **12**: 607-621.

**Bahorun, T. (1997)** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural research council, Réduit, Mauritius.* 83-94.

**Belajová E., Suhaj M.,** *Food Chemistry*, 86, 339-343, 2004.

**Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuno A, Rio JA.** Uses and properties of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4505–4515..

**Bietrix J.** 2004. *Utilisation des nutraceutiques dans la gestion de l'arthrose du cheval. Thèse de docteur vétérinaire de l'université Claude-Bernard de Lyon.* p51.

**Bocco A, Cuvelier ME, Richard H, Berset C.** Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2123-2129.

**Bouakaz, I., 2006.** Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.

**Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G. et Swinnen J. V.** 2005. *Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. Journal of biological chemistry., 280 (7) : 5636-5645.*

**Bylka W., Mathawska I. et Pilewski N. A.** 2004. *Natural flavonoid as antimicrobial agents. Journal of the American Nutraceutical Association., 7 (2) : 24-26.*

## C

**Cowan M. M.** 1999. *Plant products as antimicrobial agents. Clinical microbiology reviews., 12 (4) : 564-570.*

## D

**De Rocca Serra D.,** Ollitrault P., *Fruits*, 47, 115-134, 1992.

**Deba, F., Dang Xuan, T., Yasuda, M., Tawata, S.** (2008) Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control.* **19**: 346-352 .

**Decloitre F.** 1993. *Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. Cahiers de Nutrition et de diététique, 28 (2) : 85-95.*

**Deena Ramfula, Theeshan Bahorunb, Emmanuel Bourdonc, Evelyne Tarnusc, Okezie I. Aruomad.** *Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flaveddo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application Toxicology 278 (2010) 75–87*

**Depeint F., Gee J. M., Williamson G. et Johson I. T.** 2002. *Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. Proceeding of the Nutrition Society., 61 : 97-103.*

## E

**Emerenciano V. P., Barbosa K. O., Scotti M. T. et Ferrero M. J. P.** 2007. Self organising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using flavonoid data. *Journal of brazilian chemical society.*, **18** (5) : 891-899.

## F

**Falleh, H.,** Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies.* **331**: 372-379.

**Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Golino, A., Mastellone, C., Oriano, P., Monaco, P.** (2007) Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Flavone Glycosides from *Melilotus neapolitana*. *Molecules.* **12**: 263-270.

**Fosting Matene S.** 2005. *Etude phytochimique et activités biologiques de Maerua angolensis DC (Capparidaceae). Thèse de docteur en pharmacie de l'université de Bamako.* p77-79.

## G

**Gao, H., Nishida, J., Saito, S., Kawabata, J.** (2007) Inhibitory Effects of 5, 6, 7-Trihydroxyflavones on Tyrosinase. *Molecules.* **12**: 86-97.

**Ghedira k.** 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.*, **3** (4) : 162-169.

**Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A.** (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **41**: 1220-1234.

**González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M. J.** 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, **22** (3) : 287-293.

**Gorinstein S., Belloso O.H., Park V.S., Haruenkit R., Lojek A., Cíž M., Caspi A., Libman I., Trokhtenberg S.,** *Food Chemistry*, 74, 309-315, 2001.

## H

**Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M.** (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions.* **139**: 1- 21.

**Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B. et Legrand M.** 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.*, **16** (6) : 1446-1465.

**Hollman P. C. H.** 2001. Evidence for health benefits of plant phenols : local or systemic effects. *Journal of the science of food and agriculture.*, **81** : 825-842.

## J

Jeong SM, Kim SY, Kim DR, Jo SC, Nam KC, Ahn DU, Lee SC. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *J. Agri. Food Chem.* 52 (2004) 3389-3393.

## K

**Karaali A., Boyacioğlu D., Günez G. et Özçelik B.** 2004. *Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. Turkey.*

**Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A.** (2007) Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem.* **100**: 584-589.

**Kening Y., Vincenzo D. L. et Normand B.** 1995. *Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to Phytophthora infestans. The plant cell., 7 : 1787-1799.*

**Kim H. P., Son K. H., Chang H. W. et Kang S. S.** 2004. *Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. Journal of Pharmacological Sciences., 96 (3) : 229-245.*

## L

**Lhuillier, A.** (2007) Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.

**Li BB, Smith B, Hossain MM.** Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Sep. Purif. Technol.* 48 (2006) 182-188..

**I'IAV Hassan II,** Agronomie-département d'horticulture, unité de Rabat, Ahmed Skiredj ;Walali D.M.L. ;Hassan El Attir ,2008

**Lien Ej., Ren S., Bui H.H., Wang R.,**1999. Quantitative structure- activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*; 26:285 - 294.

**Lin J. K. et Weng M. S.** 2006. *The science of flavonoids : Flavonoids as nutraceuticals. Ed Springer. p 213.*

**Lopes-Lutz, D., S. Alviano, D., S. Alviano, C., P. Kolodziejczyk, P.** (2008) Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils *Phytochemistry.* **69** :1732-1738.

## M

**Maataoui, B.S., Hmyene, A., Hilali, S.** 2006. Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1): 3-8.

**Macheix J J., Fleuriet A. et Jay-Allemand C.** 2005. *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.* Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.

**Maisuthisakul, P., Pasuk, S., Ritthiruangdej, P.** (2008) Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J Food Composition and Analysis*. **21**: 229-240.

**Malešev D. et Kuntić V.** 2007. *Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions.* *Journal of the serbian chemical society.*, **72** (10) : 921-939.

**Manach C.** 1998. *Biodisponibilité des flavonoïdes.* Thèse de doctorat de l'université de Clermont Ferrand France.

**Marfek A.** 2003. *Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides.* Thèse de doctorat de l'université de Limoges.

**Maria A. Anagnostopoulou , Panagiotis Kefalas , Vassilios P. Papageorgiou , Andreana N. Assimopoulou , Dimitrios Boskou ,** *Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (Citrus sinensis).* *Food Chemistry* **94** (2006) 19–25

**Markowicz Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A.C.H. F., Cunha, I B. S., Carvalho, P. O. Eberlin, M. N.** (2007) Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules*. **12**: 423-432.

**Martin S., Andriantsitohaina R.** (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **51**: 304-315.

**Medić-Šarić M., Jasprica I., Smolčić-Bubalo A. et Monar A.** 2004. *Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids.* *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **77** (1-2) : 361-366.

**Merghem R., Jay M., Viricel M. R., Bayet C. et Voirin B.** 1995. *Five 8-C benzylated flavonoids from Thymus hirtus (Labiatae).* *Phytochemistry.*, **38** (3) : 637-640.

**Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C.** (2000) The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev.* **52**: 673-751.

**Milane, H., (2004)** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.

**Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S.** 2005. *Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.*

**Ming H.** 2007. *Commentary : bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. molecular pharmaceutics., 4 (6) : 803-806.*

**Mohammedi, Z.** (2006) Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister .Tlemcen.

**Moulehi Ikram, Soumaya Bourgou \*, Ines Ourghemmi, Moufida Saidani Tounsi ;** (2012) *Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (Citrus reticulata Blanco) and bitter orange (Citrus aurantium L.) seeds extracts ; Industrial Crops and Products 39 74– 80*

**Mouly P., Gaydou E.M., Auffray A.,** Journal of chromatography A, 800, 171-179, 1998.

Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, Nunez MJ, Parajo JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 72 (2001) 145-171.

## N

**Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R. et Krishna D. R.** 2001. *Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian journal of pharmacology., 33 : 2-16.*

**Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. et Van Leeuwen P. A. M.** 2001. *Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. American journal of clinical nutrition., 74 : 418-425.*

## O

**Ozturk, M., Aydogmus-Ozturk, F., Duru, M-E., Topcu, G.** (2007) Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chem.* **103**: 623-630.

## P

**Parmar, N.S., Ghosh, M. N.** (1980) Current trends in flavonoid research. *Ind. J. Pharmac.***12**: 213-228.

**Piquemal G.** 2008. *Les flavonoïdes (en ligne) : [http://www.detoursante.com/index.php?Option=com\\_content&view=article&id=166&Itemid=215](http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215)*

**Podsdek, A.** (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT.* **40**:1-11.

**Praloran J.C.,** Les agrumes, Maisonneuve G.P., Larose, Paris, 1971.

**Pupin A.M., Dennis M.J., Toledo M.C.F.,** Food Chemistry, 61, 275-280, 1998.

## R

**Ramassamy, C.**, (2006) Emerging role of polyphenolic compounds in treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *European J Pharmacology*.545: 51-64.

**Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. et Zhang L.** 2003. *Flavonoids : Promising anticancer agents. Medicinal research reviews.*, **23** (4) : 519-539.

## S

**Salmah Yusof, Hasanah Mohd Ghazali & Gan Swee King ;** *Naringin Content in Local Citrus Fruits. Food Chemistry* 37 (1990) 113-121

**Smith B, Li BB, Hossain MM.** Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Sep. Purif. Technol.* 48 (2006) 182-188.

**Subsamanian S., Stacey G. et Yu O.** 2007. *Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. Trends in plant science.*, **12** (7) : 282-283.

**Swatsitang P., Tucker G., Robards K., Jardine K.,** *Analytica Chimica Acta*, 417, 231- 240, 2000.

**Swingle W.T., Reece P.C.**, the botany of *Citrus* and Relatives in « The citrus Industry », Univ. of California, Berkeley W., Reuther L.D., Batchelor and Webber H.G., 1967.

## T

**Tanaka T.,** *Citologia : Semi Centennial Commemoration Papers on Citrus Studies*, Citologia supporting fondation, Osaka, Japan, 1961

**Tapas A. R., Sakarkar D. M. et Kakde R. B.** 2008. *Flavonoids as nutraceuticals. Topical journal of pharmaceutical research.*, **7** (3) : 1089-1099.

**Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T.** (2007) Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* (in press).

**Teissedre P. L., Vizzini M. I., Di Mago D., La Neve I., Giammanco S., La Guardia M. et Ginmanco M.** 2007. *Composition de vins rouges siliciens et leurs propriétés nutraceutiques. 8th international enology symposium. June 25, 26 and 27. Bordeaux.*

**Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A.** (2006) Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* **95**: 200-204.

**Tieppo, J., Vercelino, R., Dias, A.S., Silva Vaz, M.F., Silveira, T.R., Marroni, C.A., Marroni, N.P., Henriques, J.A.P., Picada, J.N.** (2007) Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology.* **45**: 1140-1146.

**Tiqwari, A. K.** 2001. *Imbalance in antioxidant defence and human diseases : Multiple approach of natural antioxidants therapy. Current science., 81 (9) : 1179-1181.*

**Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M.** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.* 104 (2007) 466-479.

**Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., Oreopoulou, V.** (2007) Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules.* **12:** 593-606.

**Turkmen, N., Velioglu, Y. S, Sari, F., Polat, G.** (2007) Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules.* 12:484-496.

## U

United States Department of Agriculture/Foreign Agricultural Service. (2010). Citrus: World markets and trade. Available from <http://www.fas.usda.gov>. Accessed 28.09.2010.

**Urquiaga I. et Leighton F.** 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research., 33 (2) : 55-64.*

## V

**Vuorela, S.** (2005) Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Helsinki.

## W

**W –Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., Harnly., Hollman J. P., L –Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G. et Burrowes J.** 2007. Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition., 137 (3 supp 1) : 718 s-737 s.*

**Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G., Fu, Y.J.** (2008) Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.* **108:** 1019-1022.

**Wikipédia.** 2008. *L'encyclopédie libre (en ligne) : <http://www.wikipédia.com>*

**Winkel-Shirley B.** 2001. *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiology., 126 : 485-493.*

**Wissemann H.** 1999. *The bioavailability of non-nutrient plant factors : dietary flavonoids and phyto-oestrogens. Proceeding and Nutrition Society., 58 : 139-146.*

## X

**Xu, Y.C., Leung, S.W.S., Yeung, D.K.Y., Hu, L.H., Chen, G.H., Che, C.M., Man, R.Y.K.,** (2007) Structure- activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry.* **68:** 1179-1188.



**Z**

Zia-ur-Rehman. Citrus peel extract – A natural source of antioxidant. *Food Chem.* 99 (2006) 450-454.

**Nom et prénom:** LAABOUDI Wafa

**Année Universitaire :** 2011/2012

**Titre:** L'extraction des composés phénoliques à partir des zestes d'agrumes et l'étude de leur activité antiradicalaire.

### Résumé

L'industrie des jus d'agrumes régénèrent beaucoup de déchets. La valorisation pour l'extraction des polyphénols à partir de ces déchets pourrait être une source prometteuse.

Dans ce travail, nous avons utilisés les zestes des agrumes pour l'extraction des polyphénols et les flavonoïdes.

Le dosage quantitatif des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu a révélé la richesse de *citrus reticulata* en polyphénols. Le dosage des flavonoïdes des extraits de cette espèce par la méthode d' $AlCl_3$  a montré que le taux des flavonoïdes (de l'extrait brut (l'Ebr) et la fraction du n-butanol l'En-BuOH des zestes de *citrus reticulata*) est presque le même. Ces deux fractions sont plus riches en flavonoïdes que la fraction d'acétate d'éthyle (l'E AcOEt) et la fraction d'éther de pétrole (l'EEP).

Vu l'influence des paramètres expérimentaux (le solvant d'extraction, le temps d'extraction, l'espèce utilisée et la taille de particules utilisées) sur la teneur des composés phénoliques, on a procédé à leur optimisation.

L'analyse qualitative par HPLC a révélé la présence de 10 flavonoïdes : Poncirine ; Dydimine ; Naringine ; Hesperidine ; Neoeriocitrine ; Narirutine ; Rhoifoline ; Rutine ; Diosmine et Isorhoifoline.

Les flavonoïdes, antioxydants naturels majeurs, jouent un rôle fondamental dans des centaines de réactions biologiques. Le présent travail a aussi pour objectif d'évaluer l'activité anti-oxydante par deux tests différents : le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et le test au DPPH des extrais (l'E Br, l'E AcOEt et l'E n-BuOH). Le BHT a été utilisé comme standard.

Avec les tests de blanchissement du  $\beta$ -carotène et au DPPH, l'inhibition la plus élevée a été fournie par l'En-BuOH, puis par l'EBr et en dernier l'EAcOEt.

Dans le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène, les trois fractions ont présenté une activité inférieure à celle du contrôle positif BHT, alors que dans le test au DPPH les deux fractions : l'En-BuOH et l'E Br ont présenté une activité plus élevée que celle du contrôle positif (BHT). Ces deux fractions ne présentent pas une différence significative dans leur activité.

**Mots clés:** *citrus reticulata*, mandarine, orange, citron, orange amer, agrumes, zestes, polyphénols, flavonoïdes, la méthode de Folin-Ciocalteu, , la méthode d' $AlCl_3$ , HPLC, activité anti-oxydante, test de blanchissement du  $\beta$ -carotène, test au DPPH, BHT.