

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université des frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : biochimie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologie

Spécialité : Biochimie Appliquée

**Etude des résidus d'orange (écorce) par la
combinaison de deux approches, chimique et
biologique**

Présenté par

M^{elle} KHALFA Raounek

M^{elle} HAMROUCHE Nour El Imen

Président

Mr. MOKRANI El Hassen

Maitre de conférence B, Université des Frères
Mentouri 1

Encadreur :

M^{me} AMOKRANE Serine

Maitre de Recherche B, Centre de Recherche en
biotechnologie, C.R.Bt

Examineur

Mr KASHI Imad

Maitre de Recherche B, Centre de Recherche en
biotechnologie, C.R.Bt

Année universitaire 2020\ 2021

Remerciements

On tient tout d'abord à remercier en premier lieu Allah le tout puissant pour toute la volonté et le courage qu'il nous a donné pour accomplir ce modeste travail.

Nous remercions particulièrement à notre Encadreur M^{me} Amokrane sérine (Maitre de recherche au niveau de center de recherche en Biotechnologie Constantine) d'avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils, nous lui adresse également mes remerciements distingués de nous avoir consacré son temps précieux, pour ses critiques constructives, son enthousiasme et ses qualités personnelles et professionnelles. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

Nous remercions très sincèrement, les membres de jury Mr Mokrani Mohcen et Mr KASHI Imad d'avoir accepté de faire partie de la commission.

Je n'oublie pas de présenter mes remerciements à tous les enseignants de la faculté des sciences département Biochimie et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

À mes très chers parents ; ma mère Aziza et mon père Mourad .Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien. J'espère que par ce modeste travail je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille, et qu'il sera le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse dieu le très haut vous accorde santé, bonne heure et longue vie.

À mes très chères sœurs Ibtihal, Manel et ma petite Lamisse pour leur soutien moral et leur amour.

À toute mes collègues de la promotion biochimie appliquée.

À toutes les personnes qui ont contribué à mon éducation mon enseignement et ma formation.

Nour El Imen

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

À mon regretté père, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, repose en paix papa.

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; ma très chère maman que j'aime.

À mon unique très chère frère ; Yasser et mes charmantes sœurs ; Asma, soudjoud.

À ma chère collègue Imene et mes meilleurs amies Chahinez, Yamina et Kanza

À tout la famille et surtout ma cousine Anfel

À tous ceux et toutes celles qui m'ont accompagné et soutenu durant mes études, ainsi qu'à tout ceux qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

Raounek

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Première partie : Revue Bibliographique

Chapitre I : les résidus agro-industriels

1. Les sous-produits.....	5
1.1. Définition.....	5
1.2. classification.....	6
2. Valorisation des résidus agro-industriels	6
3. Les sous-produits d'orange ...	8
3.1. Structure de l'écorce d'orange.....	8
3.2. composition chimique de l'écorce d'orange.....	9

Chapitre II : Les principaux composés secondaires isolés de l'écorce d'orange

1. Généralités	10
2. Les polyphénols.....	10
2.1. Définition.....	10
2.2. Les principales classes des composés phénoliques.....	10
3. les principaux composés phénoliques isolés de l'écorce d'orange.....	10
3.1. Les flavonoïdes.....	10
3.2. Les anthocyanes.....	12
3.3. les caroténoïdes.....	12
4. les activités biologiques des polyphénols.....	13

Chapitre III : Méthodes d'extraction des composés phénoliques

1. Généralités	15
2. Les différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques.....	15
2.1. Extraction conventionnelle par solvant (ECS)	15
2.2. Extraction assistée par ultrasons(EAU)	15
2.3. Extraction assistée par micro-ondes(EAM)	16
2.4. Extraction par CO ₂ supercritique (SC- CO ₂)	16
2.5. Extraction sous haute pression (EHP)	17

Deuxième partie : Matériel et Méthodes

1. Echantillonnage	19
2. Préparation de l'écorce d'orange.....	19
2.1. Séchage.....	19
2.2. Broyage et tamisage.....	19
3. Analyse physico-chimique de l'échantillon.....	20
3.1. Détermination de la matière sèche.....	20
3.2. Détermination de la matière minérale(MM)	21
3.3. Détermination de la teneur en sucres totaux	21

4. Analyse phytochimique de l'échantillon	22
4.1. Préparation de l'extrait	22
4.2. Analyses colorimétriques d'extraits brut par spectrophotométrie UV-visible.....	22
4.2.1. Détermination de la teneur en phénols totaux (PT).....	23
4.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FT).....	24
4.3. Analyse chromatographique d'extraits par HPLC.....	24
5. Evaluation du potentiel antioxydant d'échantillon	26
5.1. Activité du l'ABTS.....	26
5.2. Activité anti radicalaire au DPPH.....	26
5.3. L'activité de réduction du complexe cuivre – néocuproïne (CUPRAC).....	28
6. Evaluation du potentiel enzymatique d'échantillon	28
6.1. Evaluation de l'activité antidiabétique.....	29
6.2 Evaluation de l'activité anti Alzheimer.....	29
7. Evaluation du potentiel antibactérienne d'échantillon	30

Troisième partie : Résultats et Discussion

1. Analyses physico-chimiques d'échantillon	33
1.1. Teneur en eau (taux d'humidité).....	33
1.2. Teneur en matière minérale	33
1.3. Teneurs en sucres totaux	33
2. Analyses colorimétriques par spectrophotométrie (UV-Visible)	34
2.1. Détermination de la teneur en phénols totaux (PT).....	34
2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (FT).....	35
2.3. Analyse de l'extrait par HPLC.....	35
3. Evaluation des activités biologique	36
3.1. Evaluation du potentiel antioxydant d'échantillon.....	36
3.1.1. Activité du piégeage du radical-cation ABTS	36
3.1.2. Activité du piégeage du radical libre DPPH.....	37
3.1.3. Activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	38
3.2. Activité du potentiel enzymatique d'échantillon.....	39
3.2.1. L'activité antidiabétique d'échantillon.....	39
3.2.2. L'activité anti Alzheimer d'échantillon.....	40
3.3. Evaluation du potentiel antibactérienne d'échantillon.....	42

Conclusion générale	43
----------------------------------	----

Références bibliographiques	46
--	----

Annexe 01

Annexe 02

Résumé

Abstract

ملخص

LISTE DES FIGURES

Figure 01	Schéma illustrant la production de déchets et sous-produits	5
Figure 02	Processus de valorisation des déchets	6
Figure 03	Classification des déchets agroindustriels.....	7
Figure 04	Ecorce d'orange	9
Figure 05	Structure des citroflavonoïdes.....	11
Figure 06	Principales anthocyanes présentes dans l'écorce d'orange....	12
Figure 07	Structure de caroténoïde.....	13
Figure 08	Schéma du procédé d'extraction par micro-onde.....	16
Figure 09	Schéma d'extraction par le CO ₂ supercritique.....	17
Figure 10	Ecorces d'orange sèches et coupées.....	19
Figure 11	Etapes de préparation des écorces d'orange.....	20
Figure 12	Les étapes de préparation de l'extrait.....	22
Figure 13	Principe de la réaction de Folin-Ciocalteu.....	23
Figure 14	La chromatographie liquide à haute performance.....	25
Figure 15	Réaction du radical stable DPPH avec un composé anti radicalaire (AH).....	27
Figure 16	Réaction du complexe néocuproïne avec un antioxydant.....	28
Figure 17	Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman.....	30
Figure 18	Teneur en phénol totale (µg GAE/mg) et flavonoïde (µg QE/mg) du résidu d'orange.....	34
Figure 19	Plaque de dosage de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne d'extrait résidus d'orange.....	36
Figure 20	Valeurs des IC ₅₀ dans le test ABTS.....	37
Figure 21	La plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) d'extrait résidus d'orange.....	37
Figure 22	La plaque de dosage de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne d'extrait des résidus d'orange.	38
Figure 23	Plaque de l'évaluation du test CUPRAC de l'extrait des résidus d'oranges.....	39
Figure 24	A _{0.5} pour l'activité antioxydant CUPRAC d'échantillon et des standards exprimé en µg /ml.....	39
Figure 25	Plaque de dosage de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase d'extrait des résidus d'orange	40
Figure 26	A _{0.5} pour l'activité antidiabétique d'échantillon et standard	40

Figure 27	Plaque de dosage de l'activité inhibitrice du cholinestérase d'extrait des résidus d'orange	41
Figure 28	Effet d'extrait des résidus d'orange sur <i>Escherichia coli</i> et <i>Bacillus cereus</i>	42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01	Différent domaines d'utilisation des déchets agroindustriels.....	08
Tableau 02	principal classe des composés phénoliques	11
Tableau 03	Composition en caroténoïdes d'écorces d'orange ($\mu\text{g/g}$ bs).....	13
Tableau 04	Activités biologiques de quelques composés phénoliques....	14
Tableau 05	Programme (temps et gradient de solvants) de l'CLHP pour l'analyse qualitative de l'extrait.....	24
Tableau 06	Le pH, le taux d'humidité et les teneurs en minéraux, en sucres totaux (% MS)	33

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A_{0.5}	Concentration donnant une absorption égale à 0.5
ABTS	2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
AC	Acide
ACHE	Acétylcholine estérase
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DI	Déchets industriels
DPPH	2,2-Di-Phényl-1 -Picryl-Hydrazyl
EAM	Extraction assistée par micro-ondes
EAU	Extraction assistée par ultrasons
ECS	Extraction conventionnelle par solvant
EHP	Extraction sous haute pression
ERO	Ecorce résidus d'orange
FCR	Réaction de Folin-Ciocalteu
FT	Flavonoïdes totaux.
HCl	Acide hydrochlorique
HMF	Hydroxy-méthyl furfural
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IC₅₀	Concentration d'inhibition à 50%
IKI	Iodure de potassium iode
MeOH	Méthanol
MM	Matière minérale
MO	Matière organique
MS	Matière sèche
PT	Phénol totaux.
SC-CO₂	Extraction par CO ₂ supercritique
ST	Sucre totaux
TFC	Contenu en flavonoïdes totaux
TPC	Contenu en phénols totaux
UV	Ultraviolet



INTRODUCTION

Introduction

*L*es fruits sont intégrés dans l'alimentation humaine quotidienne depuis toujours. Ayant des couleurs, des goûts et des arômes très attirants, ils constituent un des éléments essentiels du régime alimentaire. Frais ou sous forme de produits transformés, les fruits constituent une source inépuisable de nutriments dont les métabolites secondaires sont parmi les plus importants (Grigoraş, 2012). En Algérie, les industries agroalimentaires, génèrent d'importantes quantités de déchets. Ces derniers constituent une nuisance certaine pour l'environnement et un gaspillage de matières organiques utiles. La valorisation de ces sous-produits est devenue une priorité pour les industriels. En effet, ces déchets pourraient être transformés en capitaux, si des bioproduits potentiellement commercialisables, peuvent être extraites à partir des écorces et des fruits à faible valeur marchande.

Les écorces et les pépins d'orange jetés sont riches en nutriments et contiennent de nombreux produits photochimiques, bioactifs tels que les polyphénols qui constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. En conséquence, beaucoup de travaux de recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de nouvelles molécules telles que les polyphénols, à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les sous-produits agroalimentaires, parmi ceux-ci l'écorce et les pépins d'orange. Ces déchets sont-ils réellement une source de substances bioactives telles que les polyphénols qui seraient capables d'exercer une activité antioxydante et antibactérienne efficace ?

De ce fait, l'objectif de notre travail s'inscrire dans cette préoccupation, il consiste à valoriser l'un des déchets de l'industrie agroalimentaire, étant l'écorce (épluchure) d'orange comme une source de substances bioactives à intérêt divers. Pour achever cet objectif, nous avons suivi l'échéancier suivant :

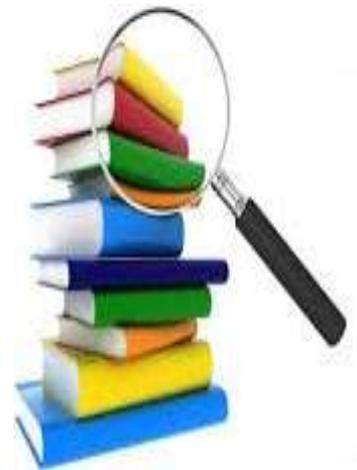
- Récupération de l'écorce à partir des oranges commercialisées pendant la saison d'hiver ;
- Caractérisation chimique de l'écorce obtenue via la détermination de leurs contenus en eau, en minéraux et en sucres
- Caractérisation physico-chimique de l'extrait des résidus via la détermination de leurs contenus en phénols et en flavonoïdes. Une analyse par chromatographie à haute

performance (CLHP) est ainsi investiguée en utilisant l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide benzoïque et la quercétine comme des standards ;

- Caractérisation biologique de l'extrait en déterminant son pouvoir antioxydant, antidiabétique, anti-Alzheimer et antibactérien.

Notre manuscrite est subdivisé en trois parties fondamentales, une partie bibliographique dont nous avons mis en lumière les résidus agroindustriels d'une manière générale et les résidus d'orange d'une manière spécifique. Les composés phénoliques, les méthodes d'extraction et les activités biologiques qui en découlent. Deuxièmement, une partie expérimentale est déroulée comme mentionnée en ci-dessus. La troisième et dernière partie apporte les différents résultats obtenus et discutés séparément.

PREMIÈRE PARTIE
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE



Chapitre I : Les résidus agroindustriels

1. Les sous-produits (Déchets)

1.1 Définition

Selon la loi n°75-633 du 15 juillet 1975 on appelle déchets tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit ou plus généralement tout bien meuble abandonné que son destinataire destine à l'abandon.

Selon Chandrasekaran (2013) sont des produits formés pendant le traitement de la génération du principal produit, ils sont non intentionnels et non prévisibles, et accidentels. Ils peuvent être considérés comme le gaspillage à la source originale.

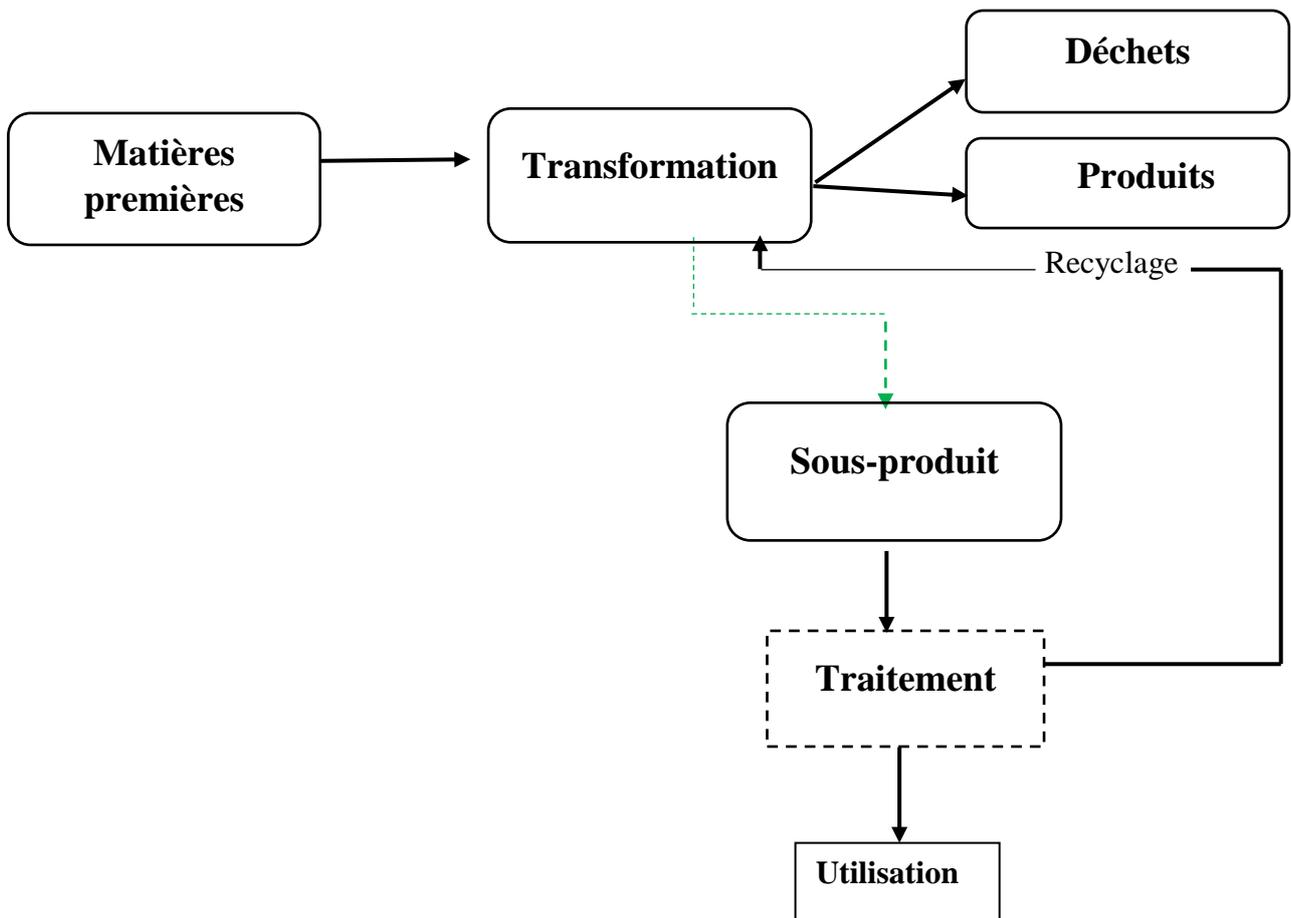


Figure 01. Schéma illustrant la production de déchets et sous-produits (Grigoras, 2012)

1.2. Classification

La classification des déchets (Figure 03) peut être faite de différentes façons selon que l'on se base sur certaines caractéristiques : physique ou type de matériaux concernés ou sur le différent secteur d'activité ou production (Murat ; 1981).

2. Valorisation des résidus agro-industriels :

La valorisation présente toute transformation de résidus ou de sous-produits industriels ou alimentaires en vue de les réintroduire sur le marché à titre de nouveaux ingrédients ou comme nouveaux produits (Boucherba, 2015). Le processus de valorisation des déchets de quelques résidus est illustré dans le tableau 01.

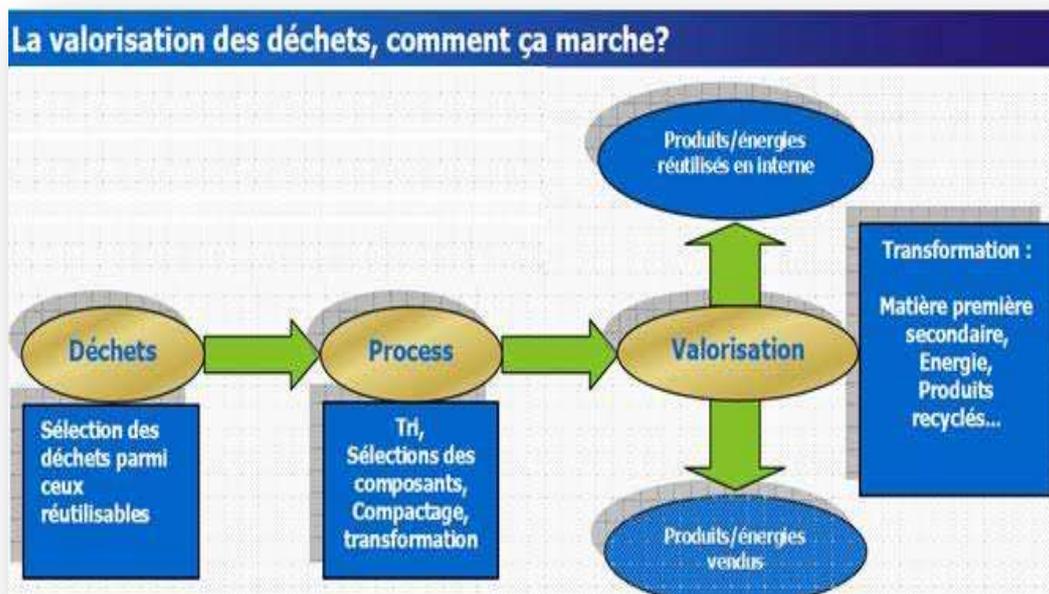


Figure 02. Processus de valorisation des déchets (Nawel, M. B .2015)

Les principaux sous-produits générés en Algérie sont majoritairement les déchets des dates, grignons d'olives, déchets des tomates et les sous-produits d'agrumes. Les agrumes comprennent plusieurs fruits : mandarine, citron, pamplemousse, orange... (Mirzaei-Aghsaghali et Maheri-Sis, 2008)

Revue bibliographique

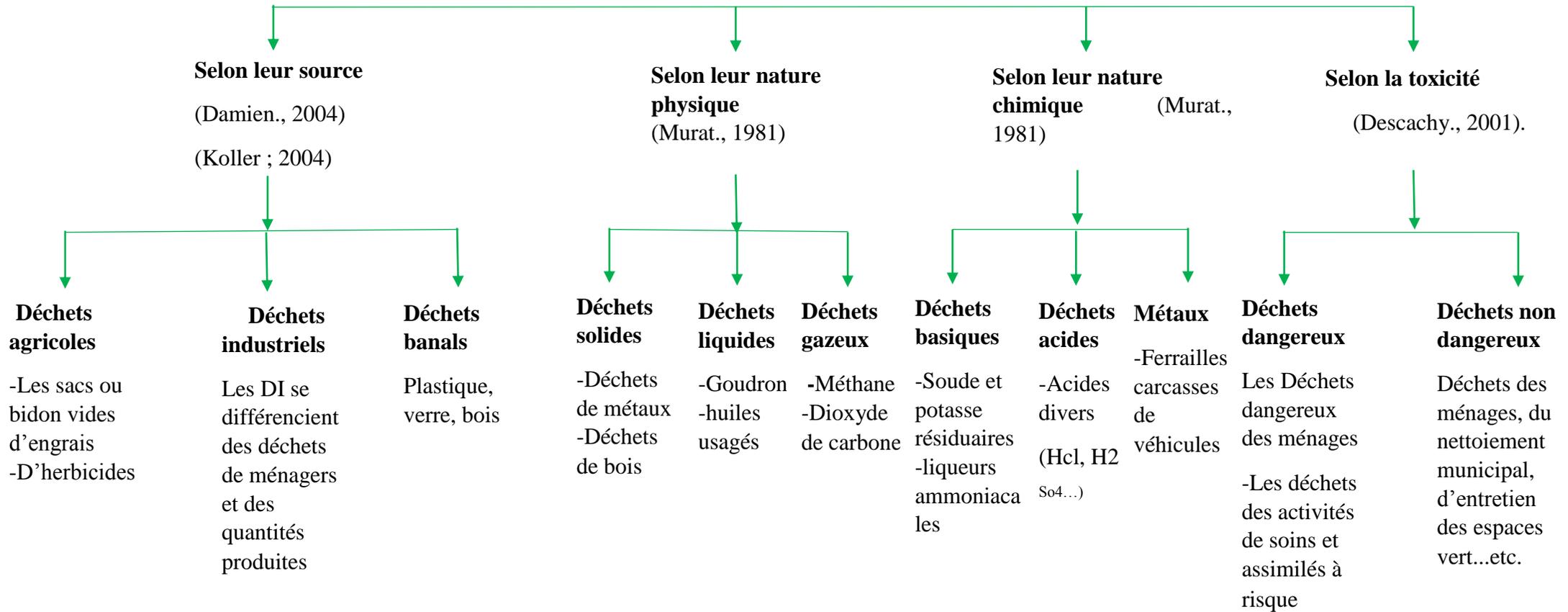


Figure 03 : Classification des déchets agroindustriels

Fonction	Champs d'application
Solubilisant et micro- émulsions	Pharmaceutique
Emulsifiant et dispersant	Cosmétique
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique
Détergent	Nettoyants ménagers

3. Sous-produits.

Les oranges sont les plus consommés on raison de leurs bonne saveur, leur valeur nutritive élevée el leurs composition riche en molécule bioactive (Wang *et al.*, 2007). Dans le monde, les oranges comptent pour 75% de l'ensemble des agrumes, et l'Algérie peut être considérée comme un producteur important, d'où les grandes quantités de peaux d'orange qui en résultent. La consommation et l'industrie de transformation de ces dernières représentent des gigantesques masses de sous-produits tels que les écorces.

3.1. Structure de l'écorce d'orange

Elle constitue la partie non comestible du fruit. Les différentes parties qui forment l'écorce d'orange sont : l'albédo (mésocarpe) et le flavédo (épicarpe) (Ladaniya, 2008 ; Bejar *et al.*, 2012).

Flavédo ou épicarpe

La couche colorée la plus extérieure est appelée flavédo car elle contient des glandes à huiles essentielles. Cette couche représente 8 à 10 % du fruit, elle contient des pigments caroténoïdes, des vitamines, etc.

Albédo ou mésocarpe

L'albédo est la couche intérieure, elle est blanche et spongieuse. Cette partie est riche en pectines, elle peut constituer 12 à 30% du fruit



Figure 04. Ecorce d'orange

3.2. Composition chimique de l'écorce d'orange

Les composants primaire de l'écorce d'Orange sont le glucose, le fructose et le saccharose (Grohmann *et al.*, 1995 ; Bieu et Mustata, 2011). Le saccharose et le glucose sont les sucres prédominants dans les stades précoces et maturation d'écorce. L'amidon est particulièrement abondant dans l'albédo, mais se trouve également dans le flavédo quand il est vert (Ladaniya, 2008). L'écorce d'agrumes a été également signalée comme étant une très bonne source de pectines et de fibres alimentaires en général, avec une proportion équilibrée de fractions solubles et insolubles (Larrauri *et al.*, 1996 ; Kuljarachanan *et al.*, 2009).

Les composants secondaires d'écorce d'Orange sont les flavonoïdes, les anthocyanines, les caroténoïdes et les huiles essentielle. Elle contient également d'autre composés tels que, les glucides, les minéraux et, peu de lipides et de protéines (Lu *et al.*, 2009).

Chapitre II : Les principaux composés phénoliques isolés de l'écorce d'orange

1. Généralités

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (Lutge *et al.*, 2002 ; Abderrazak et Joël, 2007).

2. Polyphénols

2.1. Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires (Lebham, 2005). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

2.2. Principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans les squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (Bruneton, 1999). Les différentes classes de ces composés phénoliques, sont représentées dans le tableau 2.

3. Principaux composés phénoliques isolés de l'écorce d'orange

3.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments qui donnent leur couleur aux plantes et que l'on retrouve en quantité importante dans les fruits et légumes. (Bruneton, 1964). Parmi les flavonoïdes, on trouve les citroflavonoïdes, qui sont situés spécifiquement dans l'écorce d'orange. Ce sont des pigments neutralisant les radicaux libres. Ils sont antioxydants et améliorent l'absorption de la vitamine C. Les bioflavonoïdes des oranges sont riches en rutine, hespéridine, éryodyctol et naringénine (Jagetia *et al.*, 2003) (figure 05).

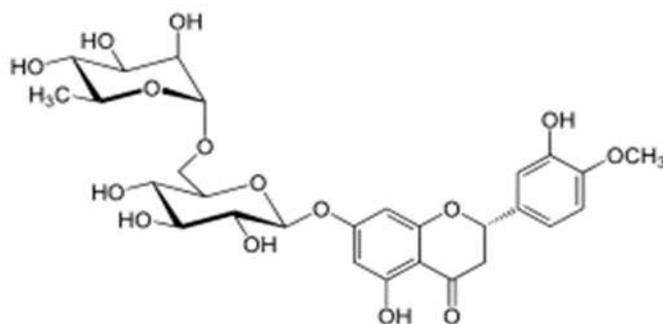


Figure 05. Structure des citroflavonoïdes (Reddy, 2003)

Tableau 02 : principale classe des composés phénoliques (Bruneton, 1999 ; Hennebelle, 2006)

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples
C ₆	C ₆	Phénols simple	Cathécol, hydroquinone
C ₇	C ₆ -C ₁	Acide phénols Benzoïques	Ac. Gallique, Ac. Salysalique, vaniline
C ₈	C ₆ -C ₂	Acétophénones	3-acétyl6-méthoxybenzaldehyde
C ₉	C ₆ -C ₃	Acides phénols Cinnamiques	Ac. Coumarique Ac. Caféique
C ₁₀	C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Shikonine
C ₁₃	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Bellidifoline, Mangotine
C ₁₄	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stiblénes	Hyrangénol, Pinosylvine
C ₁₅	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes Iso flavonoïdes	Quercétine, Roténoïde
C ₁₈	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Matairésinol

C₃₀	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Bi flavonoïdes	Amentoflavone, Hinokiflavone
N	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins Condensés (proanthocyanid ols)	Aesculitanins

3.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec anthos, fleur et kuanos, bleu violet) terme générale qui regroupe les anthocyanoidols et leurs dérivés glycolyses (Guinard, 1996). Les anthocyanines sont des flavonoïdes porteurs d'une charge sur l'oxygène d'hétérocycles C (Ribereau, 1968). La couleur des écorces de la plupart des oranges matures est due aux pigments caroténoïdes. La couleur de certaines variétés appelées orange sanguines telles que l'orange Maltaise est due aux caroténoïdes et aux anthocyanes. (Aust Et *al.*, 2001 ; Wang Et *al.*, 2008).

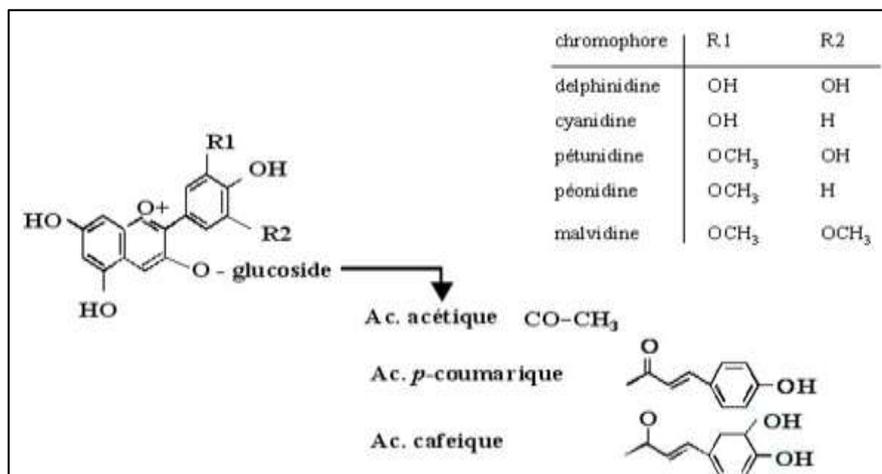


Figure 06. Principales anthocyanes présentes dans l'écorce d'orange

3.3. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes représentent un ensemble de pigments liposolubles jaune orangé, présents naturellement dans les fruits, les légumes, les graines, les algues, les bactéries et les champignons. Se rencontrent dans la partie externe du péricarpe des fruits (STEWART I. and WHEATON T.A.). STEWART a montré que la bêta-citraurine C₃₀H₄₀O₂ apporte une

contribution majeure à la coloration orangé brillante de l'écorce. Les Ecorces d'Orange contiennent des pigments, essentiellement des caroténoïdes.

Tableau03. Composition en caroténoïdes d'écorces d'orange ($\mu\text{g/g}$ bs) (Wang et al ; 2008)	
Lutéine	29,30
Zeaxanthine	27,70
Bcryptoxanthine	0,76
β -carotène	50,30

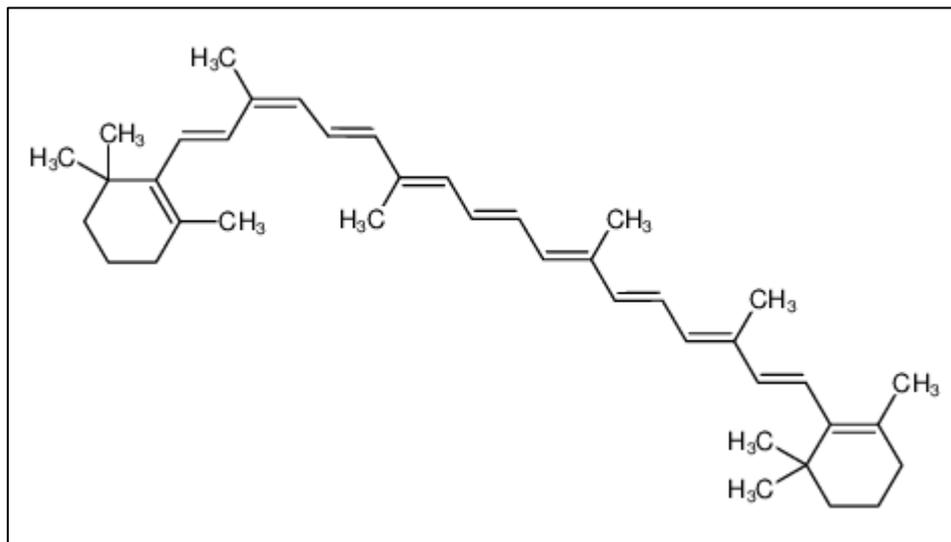


Figure 07. Structure de caroténoïde

4. Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique. Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules. Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT). Les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine. 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 polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (Makoi et Ndakidemi, 2007). Quelques activités biologiques attribuées à la présence de quelques composés phénoliques sont résumées dans le tableau 04.

Tableau 04. Activités biologiques de quelques composés phénoliques (Bruneton, 1999)

Composé phénolique	exemple	Activité biologique
Acides Phénoliques	Ac. Caféique Ac. salicylique	Antibactérienne, Antifongique et antioxydante
Tanins	Tanin gallique Proanthocyanidine	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, anti-diarrhéique, effet antiseptique, effet Vasoconstricteur
Flavonoïdes	Lutéoléine Catéchine Hespéridine Quercétine Naringénine	Antitumorale, anticarcinogène, antiinflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur diurétique.
Coumarines	Dicoumarol	Anticoagulant, antioxydant, protectrice vasculaire et antioedémateuse

Chapitre III : Méthodes d'extraction des composés phénoliques

1. Généralités

L'extraction des composés bioactifs peut être décrite comme étant un phénomène de transfert de masse où les solides solubles, contenus dans les structures végétales, migrent dans le solvant jusqu'à l'équilibre. Il existe plusieurs méthodes d'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes comme l'extraction conventionnelle par solvant (Manthey Li *et al.*, 2006 ; Xu *et al.*, 2007), l'extraction par eau chaude (Xu *et al.*, 2008), l'extraction assistée par enzymes (Li *et al.*, 2006b) et l'extraction par fluide supercritique (Giannuzzo *et al.*, 2003).

2. Différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques

2.1. Extraction conventionnelle par solvant (ECS)

L'extraction conventionnelle par solvant est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des composés phénoliques. De nombreux paramètres d'extraction doivent être pris en compte pour l'optimisation de cette méthode : le type et la concentration du solvant organique, la température, le temps d'extraction et le nombre de cycles d'extraction.

Les conditions de l'extraction conventionnelle par solvant (ECS) ont été choisies selon les données de la littérature (Li *et al.*, 2006 ; Tumbas *et al.*, 2010; M'hiri *et al.*, 2014). Le solvant utilisé est un mélange d'éthanol/eau à 80%. En effet, les solvants donnant la teneur la plus élevée en phénols totaux sont le méthanol et l'éthanol (Li *et al.*, 2006a). Cependant, dans les applications industrielles, l'éthanol plus respectueux pour l'environnement est le plus souvent utilisé (Bartnick *et al.*, 2006). Une concentration d'éthanol variant de 70 à 80% est la plus utilisée dans la littérature pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange. La température d'extraction a été fixée à 35°C pour éviter la dégradation des composés phénoliques au cours du processus de l'extraction. Les cinétiques d'extraction ont été tracées en utilisant les conditions précédentes (éthanol 80%, m/v : 5g : 50ml, 35°C). D'après les cinétiques obtenues, 30minutes d'extraction sont suffisantes pour atteindre l'équilibre et 3 extractions sont suffisantes pour obtenir plus de 95% de la teneur en composés phénoliques.

2.2. Extraction assistée par ultrasons (EAU)

L'extraction assistée par ultrasons est réalisée dans des conditions identiques à l'ECS. L'extraction est accélérée par l'utilisation des ultrasons (Vibra Cell 75115, Bioblock-Fisher, Illkirch, France). Ainsi 5 g de poudre des écorces d'orange sont introduits dans le sonicateur avec 50 ml de solvant (éthanol 80%). La température de la solution est réglée à 35°C. L'extraction dure 30 minutes et répétée 3 fois. Les ultrasons peuvent varier selon la puissance du sonicateur. Les puissances suivantes ont été utilisées lors de nos essais : 100, 125, 150 et 200 W.

2.3. Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'extraction assistée par micro-ondes est réalisée dans des conditions identiques à l'ECS. Elle est accélérée par l'utilisation de micro-ondes (Multiwave 3000, Microwave Reaction System, Graz, Austria). Ainsi 5 g de poudre des écorces d'orange sont introduites dans la chambre d'extraction avec 50 ml de solvant (éthanol 80%). L'extraction dure 180s et est répétée 3 fois. Les puissances micro-ondes appliquées varient de 100 à 400 W. L'extraction n'est pas réglée en température, ainsi pour extraire à 35°C, il faut appliquer une puissance de 170 W pendant 10 s. La température de l'extrait a été mesurée en utilisant un thermomètre-K.

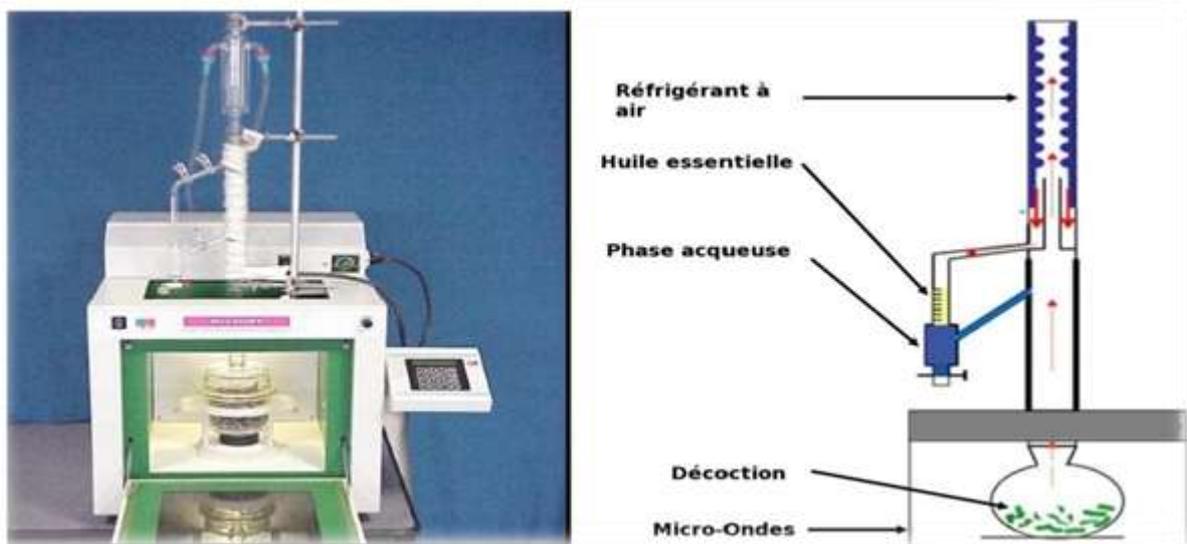


Figure 08. Schéma du procédé d'extraction par micro-ondes.

2.4. Extraction par CO₂ supercritique (SC-CO₂)

Dans cette méthode d'extraction, le CO₂ à l'état supercritique est utilisé comme solvant. Cette extraction a été effectuée en utilisant un extracteur à l'échelle pilote (ENSIC, LRGP, Nancy, France). L'installation utilisée est un système d'extraction dynamique où l'extracteur est un cylindre métallique, placé en série avec trois séparateurs. Cette installation comprend une bouteille de CO₂, un échangeur froid, un échangeur chaud, une pompe haute pression et plusieurs bains thermostatés. Le CO₂ supercritique est utilisé comme solvant à une pression maximale de 250 bar. 5 g de poudre des écorces d'orange ont été placés dans 50 ml du liquide d'extraction. L'éthanol (80%) a été utilisé comme co-solvant. L'extraction a été conduite pendant 30 min à 35-80°C et une pression de 10-22 MPa. Le flux de CO₂ a été maintenu à approximativement 15 g/min en ajustant le débit avec une valve manuelle. Le surnageant a été filtré par un filtre à solvant de 0,2 µm.

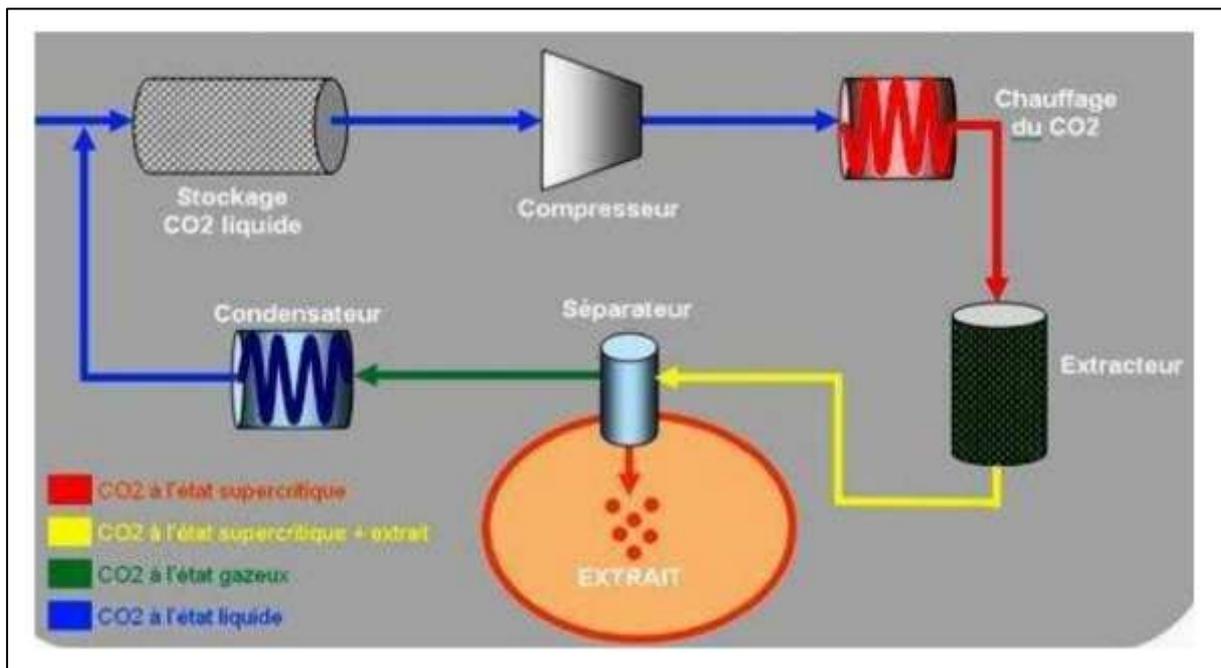


Figure 09. Schéma d'extraction par le CO₂ supercritique

2.5. Extraction sous haute pression (EHP)

L'extraction sous haute pression a été réalisée dans les mêmes conditions que l'ECS (éthanol 80%, m/v : 5g : 50ml, 35°C, 30 min) mais intensifiée par un traitement à haute pression variant de 0,1 à 100 MPa.

DEUXIÈME PARTIE
MATÉRIEL ET MÉTHODES



1-Echantillonnage

4 kg d'oranges sont obtenus d'un centre commercial sis à Ali-Mendjli, nouvelle ville. Plusieurs types d'orange sont exposés : Thomson, Sanguine, Moro, Bigaradier, et Orange apraisé (petites oranges). Les oranges de la saison sont choisis du faite qu'ils sont majoritairement produits et les plus consommées.

2- Préparation des écorces d'orange

2.1. Séchage

Les oranges sont lavés avec de l'eau de robinet en assurant qu'elles sont parfaitement propres. Il ne faut retirer que la partie extérieure en évitant de peler la couche blanche intérieure. L'écorce récupérée a été découpée en petits morceaux d'environ 1 cm de largeur, puis déposées dans un grand récipient pour séchage à l'air libre et à une température ambiante (Figure 10).



Figure 10. Ecorces d'orange sèches et coupées

2.2. Broyage et tamisage

Une fois le matériel végétal est séché, les échantillons sont broyés l'aide d'un broyeur électrique de marque SAVOMIX. Les poudres ainsi obtenues sont tamisées à l'aide d'un tamis de 250 μm et conservées dans des boites à l'abri de la lumière.



Figure 11. Etapes de préparation des écorces d'oranges

A : Ecorces d'orange sèches ; **B :** Broyage ; **C :** Poudre des écorces d'oranges

3. Analyse physico-chimique de l'échantillon

3.1. Détermination de la matière sèche (MS)

➤ Principe

La détermination de la matière sèche ou la teneur d'un échantillon en eau est faite en portant une quantité bien définie d'un échantillon à la dessiccation dans une Etuve à 105°C pendant 24 heures jusqu'à poids stable. La différence de poids avant et après dessiccation correspond à la perte d'eau, le reste correspond à la matière sèche de notre échantillon.

➤ Mode opératoire

2 g de l'échantillon sont pesés séparément dans des creusets en porcelaine tarés ; ils sont mis dans une étuve à 105°C pendant 24 heures jusqu'à poids constant. Ils sont par la suite placés dans un dessiccateur pendant 2 heures pour éviter toute sorte d'absorption d'humidité à l'air libre. L'analyse est effectuée en triplet. La matière sèche (MS) est calculée selon cette expression :

$$\%MS = \frac{p2-tc}{p1-tc} * 100$$

- **P2** : poids d'échantillon après dessiccation(g)
- **Tc** : poids de creuset vide (g)
- **P1** : poids d'échantillon avant dessiccation (g)

Le taux d'humidité est calculé à partir de la formule suivante :

$$\%Humidité= 100 - \%MS$$

3.2. Détermination de la matière minérale (MM)

➤ Principe

Les échantillons sont soumis à une incinération dans un four à moufle à 550°C pendant 12 heures. La matière organique se consume et le reste correspond à la matière minérale, qui se trouve sous forme des cendres blanches.

➤ Mode opératoire

2 g d'échantillons d'écorce d'orange secs sont placés dans un four à moufle porté à 550°C pendant 12 heures, ils sont par la suite mis dans un dessiccateur pendant 2 heures. Les cendres blanches représentent la matière minérale. La matière minérale (MM) est calculée selon cette expression :

$$\%MM = \frac{P3-tc}{P2-tc} * 100$$

- **P2** : poids de creuset après dessiccation
- **P3** : poids de creuset après incinération
- **Tc** : poids de creuset vide

La teneur en matière organique est calculée comme suit :

$$\%MO = -\% \text{des cendres blanches}$$

3.3. Détermination de la teneur en sucres totaux (ST)

➤ Principe

Les sucres totaux sont déterminés selon la méthode de Dubois *et al.* (1956) dont le principe repose sur fait que l'acide sulfurique concentré provoque à chaud, le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxy-méthyl furfural (HMF) dans le cas d'hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-oronge). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des oses. La densité optique est mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

➤ Mode opératoire :

Dans des tubes Eppendorf on ajoute 200 µl d'échantillon (1 mg dans un 1 ml eau distillée) et 200 µl de phénol 5%. 1ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) à 96% est par la suite ajoutés ; après

une phase d'agitation dans le vortex, les tubes sont maintenus dans l'étuve à 100°C pendant 5 min, puis laissés dans l'obscurité pendant 30 min. La lecture de l'absorbance est faite à 490 nm via un spectrophotomètre UV /Vis (Agilent technologies). La teneur en sucres totaux est exprimée en se référant à la courbe d'étalonnage établie à différentes concentrations du glucose

4. Analyse phytochimique de l'échantillon

4.1. Préparation d'extrait

➤ Principe

La macération est une opération qui consiste à laisser l'échantillon en contact avec un solvant à température ambiante pendant un temps bien défini pour en extraire les substances chimiques solubles.

➤ Mode opératoire

L'extrait est préparé par macération de 50 g de poudre végétale dans un système solvant éthanol-eau (70 :30 v/v ; 1 :10 p/v) pendant 72 h sous agitation et à l'obscurité, avec renouvellement du solvant chaque 24h. Une évaporation de 48h est réalisée après grâce à un évaporateur de marque BUCHI Rotavapor R-200.

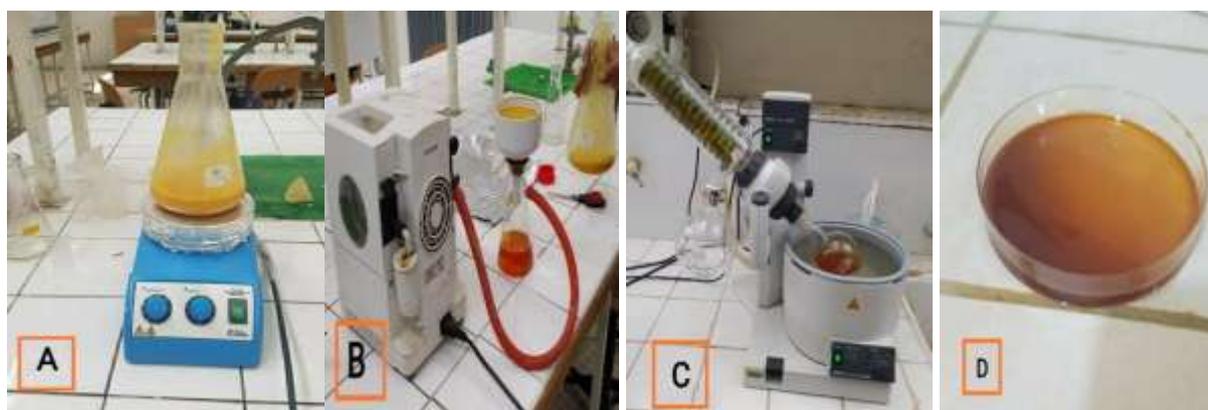


Figure 12 : Les étapes de préparation de l'extrait (A : Macération ; B : Filtration ; C : Evaporation à pression réduite ; D : Extrait brut

4.2. Analyse colorimétrique d'extrait brut par spectrophotométrie UV-visible

L'analyse phytochimique de l'extrait d'échantillon est effectuée via le dosage de leur contenu en composés secondaires à l'instar des phénols totaux et flavonoïdes par la méthode colorimétrique.

4.2.1. Détermination du contenu en phénols totaux (TPC)

➤ Principe

Le contenu en polyphénols totaux est réalisé selon la méthode de dosage de Singleton et Rossi (1965). C'est une méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu : un réactif acide jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des polyphénols en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'augmentation de la couleur bleu et de l'absorbance est proportionnelle aux teneurs en polyphénols totaux (Figure 13).

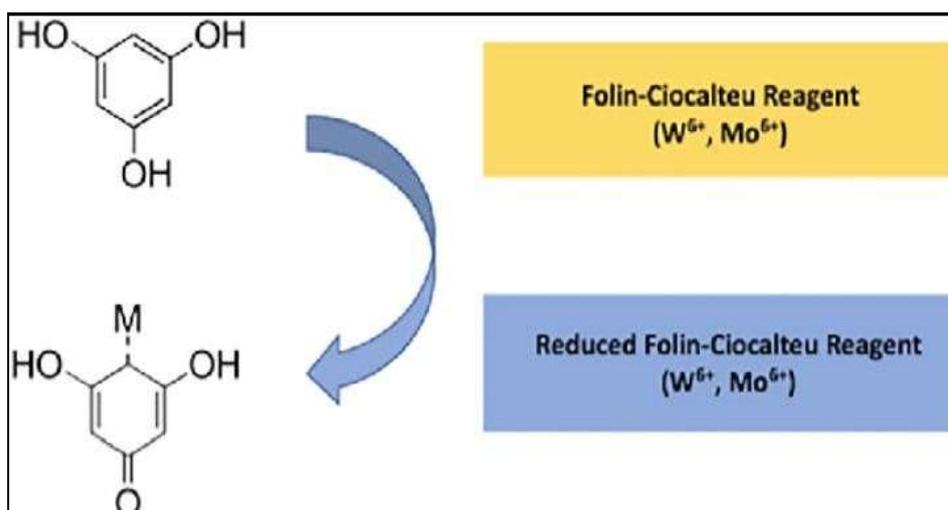


Figure 13. Principe de la réaction de Folin-ciocalteu (FCR).

➤ Mode opératoire

Sur une microplaque à 96 puits, un volume de 20 μ l d'extrait (une masse de 1 mg est dissoute dans 1 ml de méthanol) est ajouté à 100 μ l de Folin-ciocalteu dilué (1 ml de FCR est dilué dans 9 ml d'eau distillée) ; supplémenté par un volume de 75 μ l de carbonate de sodium (7.5 g de Na_2CO_3 est dissouts dans 100 ml d'eau distillée). Le mélange est ensuite incubé

pendant 2h à l'abri de la lumière ; et l'absorbance est mesurée à 765 nm. L'acide gallique est utilisé comme un contrôle positif.

4.2.2. Détermination du contenu en flavonoïdes totaux (TFC)

➤ principe

Le contenu en flavonoïdes totaux est réalisé selon la méthode décrite par Topçu *et al.* (2007). Le principe est basé sur la formation d'un complexe jaunâtre ; entre le chlorure d'aluminium et le groupement OH libre en position 5 dans les flavonoïdes. La coloration est proportionnelle aux teneurs en flavonoïdes totaux.

➤ Mode opératoire

Dans une microplaque de 96 puits, un volume de 50 µl d'extrait (une masse de 1 mg dissoute dans 1ml de méthanol) est mélangé avec : 130 µl de méthanol ; 10 µl d'acétate de potassium (CH₃COOK) (9.8g dans 100 ml de méthanol) et 10 µl de nitrate d'aluminium (AL(NO₃)₂, 9H₂O). Le blanc est préparé avec 150 µl de méthanol et 50 µl d'extrait. Le mélange est ensuite incubé pendant 40 min à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 415 nm. La quercétine est utilisée comme un contrôle positif.

4.3. Analyse chromatographique de l'extrait par CLHP

➤ Principe

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une méthode de séparation des constituants d'un mélange liquide basée sur les différences d'interactions entre les molécules à séparer et les phases mobile et stationnaire. Préalablement, les solutés sont mis en solution dans la **phase mobile** (solvant). Après son injection, ce mélange passe sous haute pression à travers une colonne (tube en acier inoxydable) qui renferme la phase **stationnaire**. Celle-ci est constituée de microparticules de silice, elle est très sensible aux impuretés, il est donc essentiel de purifier et de filtrer l'échantillon avant son injection.

➤ Mode opératoire

Dans notre étude, Une CLHP analytique de type **Agilent** est utilisée, elle est constituée d'une colonne Hypersil ODS C₁₈ de granulométrie 5µm, un détecteur à barrettes diodes (DAD, 1100), un système d'injection automatique et un détecteur spectrophotométrique UV2000. La phase mobile est constituée par un mélange de solvants (gradient d'élution) :

Acétonitrile – Eau (acidifiée avec 0.05% d'acide phosphorique). Les deux phases doivent être filtrées dans un système sous vide et dégazées dans un bain à ultrason. L'échantillon est dissout dans le méthanol puis filtré à travers un filtre millipore 0.22 μm . La séparation a été faite à température ambiante sous un débit constant de 0.5 ml/min avec un gradient de solvant programmé selon le tableau 04. Le volume d'injection est de 20 μl .

Tableau 05. Programme (temps et gradient de solvants) de l'CLHP pour l'analyse qualitative de l'extrait.		
T (min)	Acétonitrile	Eau
0	0	100
5	10	90
15	10	90
25	20	80
33	25	75
38	35	65
43	50	50
45	65	35
50	75	25
55	80	20
60	90	10
65	100	0
70	100	0



Figure 14. Chromatographie liquide à haute performance

5. Evaluation du potentiel antioxydant d'échantillon

La détermination du potentiel antioxydant d'extrait d'écorce d'orange a été réalisé par l'utilisation de trois méthodes : piégeage du radical libre **DPPH** ; piégeage de l'**ABTS** et réduction du complexe cuivre-néocuproïne **CUPRAC**.

5.1. L'activité de l'ABTS

➤ Principe

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de Re *et al.* (1999). L'**ABTS** (acide 2,2'-azino-bis (3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) forme le radical **ABTS+**, de couleur bleu-vert. L'ajout d'antioxydant réduit ce radical et provoque une décoloration de L'ABTS. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants.

➤ Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de chaque extrait dilué dans le méthanol à différentes concentration sont introduits. Ils sont par la suite supplémentés par 160 µl de la solution d'**ABTS** ; le mélange réactionnel est maintenu à une température ambiante et à l'obscurité pendant 10 min. l'absorbance est mesurée à 734 nm. La préparation du blanc est faite en remplaçant l'extrait par le méthanol

L'activité ABTS a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}}}{A_{\text{Blanc}}} \times 100$$

5.2. L'activité anti radicalaire au DPPH

➤ Principe

L'activité anti radicalaire au DPPH est déterminée spectrophotométriquement par la méthode décrite par Blois (1958). Le principe est de mesuré la capacité d'un antioxydant à réduire le DPPH (un radical libre stable) initialement de couleur violette en Hydrazine de couleur jaune, en recevant un atome d'hydrogène des antioxydants ; l'absorbance diminue lorsque le DPPH est réduit par l'antioxydant (Figure 15).

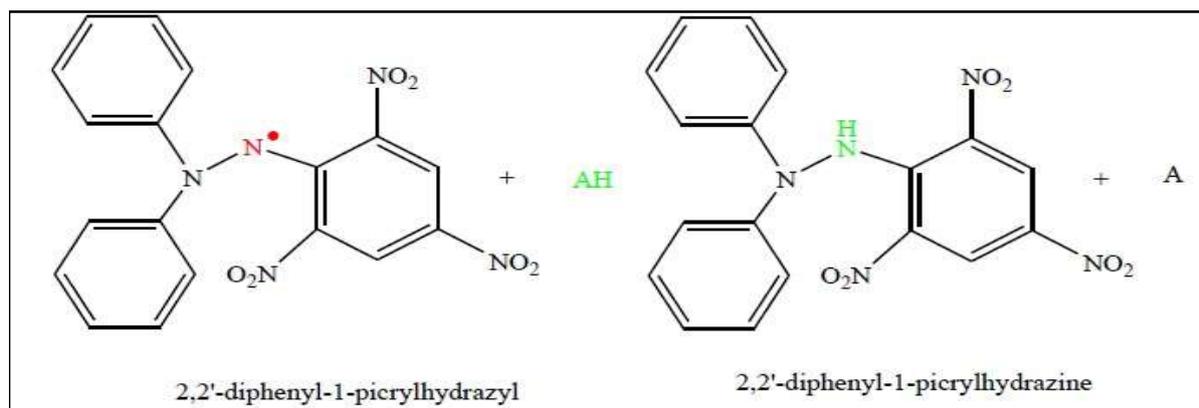


Figure 15. Réaction du radical stable DPPH avec un composé anti radicalaire (AH)
(Oliveira *et al.*, 2014).

➤ Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de chaque extrait dilué dans le méthanol à différentes concentrations sont introduits. Ils sont par la suite supplémentés par 160 µl de la solution de **DPPH** fraîchement préparée à concentration de 0,1 mM. Le mélange réactionnel est maintenu à une température ambiante et à l'obscurité pendant 20 min. l'absorbance est mesurée à 517 nm. La préparation du blanc est faite en remplaçant l'extrait par le méthanol

L'acide ascorbique et le Trolox sont utilisés comme des standards. Les résultats sont exprimés en % **d'inhibition** et d'**IC50**. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon cette équation :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{Blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{Blanc}}} * 100$$

A contrôle : l'absorbance du contrôle négatif.

A extrait : l'absorbance d'extrait ou le standard.

5.3. L'activité de réduction du complexe cuivre –néocuproïne (CUPRAC)

➤ Principe

La capacité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) est déterminée selon la méthode d'Apak *et al.* (2004). Cette dernière est basée sur la diminution de l'absorbance du complexe cuivre_néocuproïne $[Cu^{2+} - Nc_2]$. En effet en présence d'un agent antioxydant, le complexe $[Cu^{2+} - Nc_2]$ est réduit produisant un complexe chromogène de $Cu^{+} - Nc$ (Figure 16).

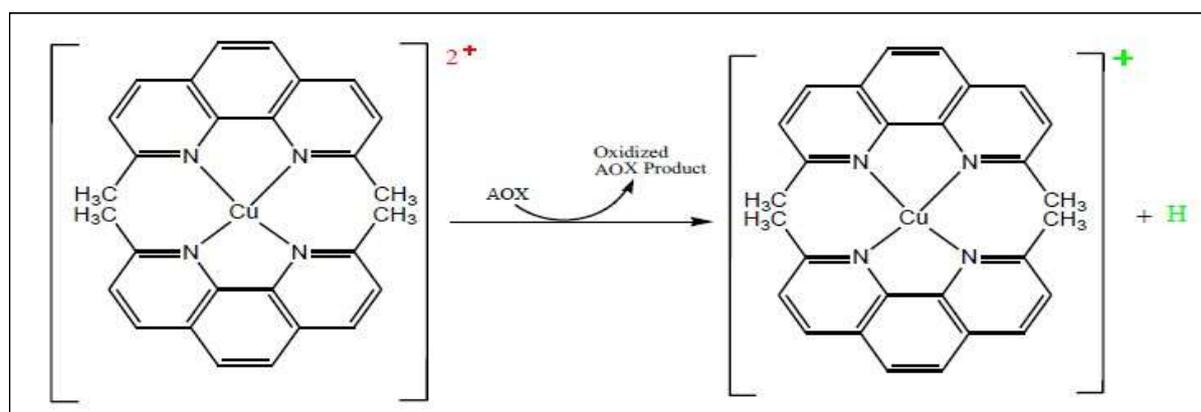


Figure 16. Réaction du complexe néocuproïne avec un antioxydant (Apak *et al.*, 2004).

➤ Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits un volume de 40 μ l d'extrait dilué dans le méthanol à différentes concentrations sont introduits ; et 40 μ l de méthanol dans le blanc au lieu d'extrait. Ils sont par la suite supplémentés par un mélange réactionnel contenant 60 μ l d'acétate d'ammonium (tampon) ; 50 μ l de néocuproïne ; 50 μ l de chlorure de cuivre ($CuCl_2$). Après une incubation de 1h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. L'acide ascorbique et le prolox sont utilisés comme des standards ; et les résultats sont calculés à titre d'A0.5 (μ g/ml).

6. Evaluation du potentiel enzymatique de l'échantillon

Deux activités enzymatiques sont évaluées, l'activité antidiabétique et anti Alzheimer, par l'utilisation des enzymes spécifiques pour les deux pathologies. L' α -amylase pour le diabète ; l'inhibiteur de cet enzyme ralentit l'absorption des glucides, donc le glucose passe lentement dans le sang, réduisant ainsi l'hyperglycémie. L'Acétylcholinestérase pour l'Alzheimer ; l'inhibition de cet enzyme va augmenter la concentration de l'Acétylcholine, ce qui est considéré comme un traitement de ladite maladie.

6.1. Evaluation de l'activité anti diabétique

➤ principe

L'activité inhibitrice de l' α -amylase est déterminée selon la méthode de Zengin *et al.*, (2014). Le principe consiste de mettre en contact l'extrait avec l'enzyme α -amylase et son substrat étant l'amidon afin d'évaluer la capacité de l'extrait d'inhiber l'activité de l'enzyme à dégrader

➤ Mode opératoire

La microplaque à 96 puits est remplie par un volume de 37 μ l d'extrait de différentes concentrations puis on ajoute 50 μ l de solution de l' α -amylase, on incube pendant 20 min à 37° C. Ensuite 50 μ l d'amidon sont additionnés. Après une deuxième incubation de 10 min à 37°C, 25 μ l d'acide hypochlorique (HCl) (1M) et 100 μ l d'iodure de potassium iode (IKI) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 620 nm. L'acarbose est utilisé comme un standard, et les résultats sont exprimés en % d'inhibition et d'IC50. Le pourcentage d'inhibition l' α -amylase est calculé selon cette équation :

$$\text{INH (\%)} = [1 - \{(A_c - A_e) - (A_s - A_b) / (A_c - A_e)\}] \times 100$$

A_c : Absorbance [Amidon + IKI+ HCl+ V solvant d'extrait + V tampon d'enzyme].

A_e : Absorbance [Enzyme + Amidon + IKI + HCl + V solvant d'extrait].

A_s : Absorbance [Enzyme + Extrait + amidon + IKI + HCl].

A_b : Absorbance [Extrait + IKI+ Tampon].

6.2. Evaluation de l'activité anti Alzheimer

➤ principe

L'activité inhibitrice de l'**Acétylcholinestérase (AChE)** de l'échantillon des écorces d'oranges est déterminée par la méthode spectrophotométrique d'Ellman *et al.* (1961). Le principe consiste de mettre en contact l'extrait avec l'enzyme Acétylcholinestérase et son

substrat étant l'Acétylcholine afin d'évaluer la capacité de l'extrait d'inhiber l'activité de l'enzyme l'AChE à dégrader son substrat l'Acétyl choline (Figure17).

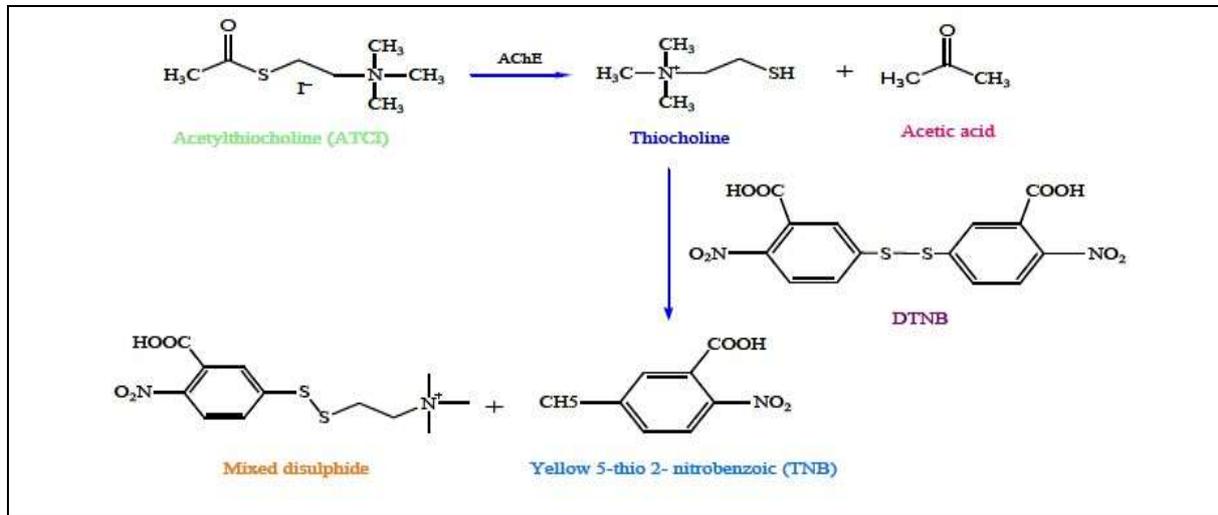


Figure 17. Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman (Shtayeh *et al.*, 2014).

➤ Mode opératoire

Dans une microplaque à 96 puits ; 150 µl de tampon phosphate de sodium (PH=8) sont ajoutés à 10 µl d'extrait à différentes concentrations et à 20 µl d'enzyme AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ; le mélange est incubé à 37°C pendant 15 min. Après 10 µl de DNTB (0.5 mM) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 10 µl de substrat, la première lecture T0 est réalisée. Après une incubation de 15min la deuxième lecture T15. L'absorbance est mesurée à 412 nm. La galanthamine est utilisé comme un composé de référence ; et les résultats sont exprimés en % d'inhibition et d'IC50. Le pourcentage d'inhibitions est calculé selon cette équation

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{E - S}{E} * 100$$

E : Activité de l'enzyme sans extrait.

S : Activité de l'enzyme avec l'extrait.

7- Evaluation du potentiel antibactérien de l'échantillon

➤ Principe :

L'activité antibactérienne des échantillons était testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose (Liao *et al*, 2010). Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme avec l'application des disques imprégnés des échantillons (extraits, huiles...etc) sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. L'activité antimicrobienne, quand elle était présente, se manifestait alors par des zones d'inhibition autour des disques.

➤ Mode opératoire :

Les souches testées pour déceler l'activité antibactérienne de l'échantillon (extraits d'écorce d'orange) sont *Bacillus Creus* (**Gram+**) et *Escherichia coli* (**Gram-**). Des colonies bien séparées de ces espèces bactériennes ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 ml de **bouillon nutritif** puis portées à l'incubation pendant (18-24) heures à 37 °C.

Des disques (patches) de 6 mm de diamètre ont été découpés sur du papier Wattman n°1 puis autoclavés dans 10 ml d'eau distillée à 120°C pendant 20 min. Des séries de dilutions allant de 0,150 à 0,005 mg / ml ont été préparées pour chaque échantillon. Les disques de papier Wattman déjà préparés sont chargés de l'extrait à tester, des disques imprégnés du DMSO sont également utilisées comme un témoin négatif.

Les microorganismes ont étéensemencés par étalement sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Muller-Hinton. Les disques ont été ensuite imprégnés chacun par 20 µl de principe actif (extrait dilué) et déposés sur la surface des géloses. L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37 °C.

TROISIÈME PARTIE
RÉSULTATS ET DISCUSSION



1. Analyse physico-chimique d'échantillon

1.1 Teneur en eau(Humidité)

Dans notre étude, une teneur en matière séché de 93% est enregistrée. Ce résultat est similaire à celui obtenu par Bouhadi et al. (2016) ayant trouvé une teneur de 90.54%. De même, il se situe dans l'intervalle rapporté par Martin et al. (2010) variant de 93.05 à 95 pour les peaux de quelque agrumes et tomate séchés.

Erbay et Iciar. (2009) rapportent une teneur en humidité de l'écorce d'orange après séchage de l'ordre de 8% ce qui est en accord avec notre résultat (7.7%). Une faible teneur en eau explique une teneur élevée de matière sèche (Benahmed, 2007). Cette corrélation négative se manifeste dans notre échantillon, comme le démontre dans le tableau 06.

Tableau 06. Taux de la matière sèche (MS), de la matière minérale (MM) et de sucres totaux		
MS (matière sèche)	MM (matière minérale)	Sucres totaux
93.3 ±1.29	5.66± 0.02	29.94±4.41

1.2. Teneur en Matière Minérale

Les résultats représentés sur le tableau 04, montre que la teneur en cendre d'échantillon des résidus d'orange a une valeur de 5.6% MS. Ce résultat est supérieur à celui obtenu par Osfor et al., (2013), ayant trouvé une teneur en cendre d'albédo d'orange en poids sec de l'ordre de 2.3% MS. De même, notre résultat est proche de celui obtenu par Bouhadi et al.,(2016), rapportant un taux en matière minérale estimé à 3.22%±0.03.

1.3. Teneur en sucres totaux

Les écorces d'orange renferment une teneur modérée en sucres totaux estimée dans notre étude à 30%. Ce résultat est inférieur à celui obtenu par Bouhadi et al.(2016) rapportant un taux en sucre estimé à 51.1%±4.21.

2. Analyses colorimétriques par spectrométrie (UV-Visibles)

2.1 Détermination de la teneur en phénol totale

Le dosage des phénols totaux est effectué par la méthode spectrométrie UV- visible pour déterminer leur contenu en phénol totale. Les résultats exprimés en terme d'équivalent d'acide gallique/ mg d'extrait sont représentés dans la figure 18

La teneur en polyphénols enregistrée dans notre étude est de l'ordre de $106.45 \pm 1.18 \mu\text{g GAE/mg}$ (Figure 18). Elle est plus élevée que celle rapportée par Bejar et *al.* (2011) estimée à 5.22 mg GAE/g . Par ailleurs, une teneur légèrement supérieure à la nôtre est enregistrée par Selmi et *al.* (2017), soit $169,94 \pm 2,13 \text{ mg EAG/g MS}$.

Cette différence de teneurs en polyphénols totaux serait due à la complication de l'extraction des polyphénols, qui sont susceptibles de subir une dégradation, une oxydation, ou une hydrolyse. De plus d'autres paramètres peuvent influencer la quantification des composés phénoliques tel que la variété, le mode de conservation des extraits, les conditions environnementales, le degré de maturité du fruit et les facteurs génétiques (Lagha-Benamrouche et Madani, 2013). Selon Al-anbari et Hasan, (2015), la teneur en polyphénols est également influencée par le tissu analysé et l'origine géographique de la plante.

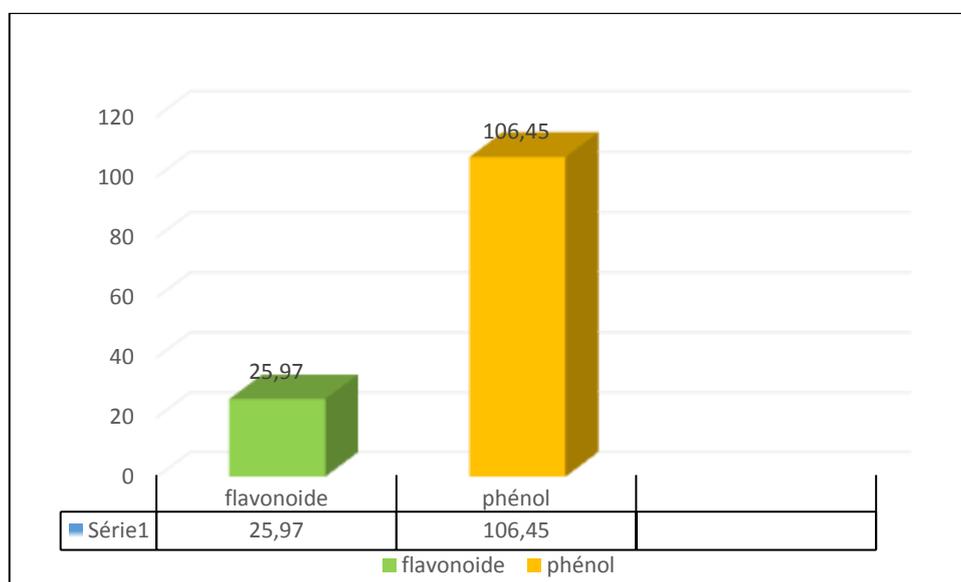


Figure 18 .Teneur en phénol totale ($\mu\text{g GAE/mg}$) et flavonoïde ($\mu\text{g QE/mg}$) du résidu d'orange

2.2. Détermination de la teneur en flavonoïde totale (FT)

L'extrait brut du résidu d'orange a été analysé quantitativement par spectrométrie UV-visible pour déterminer leur contenu en flavonoïde totale. Les résultats obtenus exprimés en équivalent par mg d'extrait) (figure 18). Les résultats ci-dessus indiquent que les flavonoïdes représentent 25% des composés phénoliques avec un taux de 25,79 $\mu\text{g Qe/mg}$. La présence des flavonoïdes totaux dans l'extrait et déjà signalée par Garg et *al.* (2001) et Benavente-Garcia, (2008).

Notre valeur est supérieure à celle rapportée par Omoba et *al.* (2015) étant de l'ordre de 3.30 ± 0.30 mg QE/g, et elle est inférieure à celle trouvée par Salmi et *al.*(2017) estimé à 87.48 ± 1.59 mg QE/g. Al-anbari et Hasan. (2015) démontrent que la différence des teneurs trouvées en polyphénols et en flavonoïdes est due à la complexité des mélanges naturels des composés phénoliques et à la méthode de dosage de ces composés.

2.3. Analyse de l'extrait par HPLC

Les résultats de l'analyse par HPLC révèlent la richesse et la diversité de notre extrait en polyphénols. En fait, la vaste gamme de polarité des phénols nécessite souvent de travailler en gradients d'élution constitué dans notre étude d'eau acidifiée et de méthanol. Il a été suivi à 280 et 350 nm réputée comme étant les longueurs d'onde caractéristiques des composés phénoliques d'une manière générale.

A 280 nm et à 350 nm les profils obtenus pour l'extrait des résidus d'orange sont très intenses avec un nombre de pics pratiquement égale, estimé à 64 et 65, respectivement (annexe 2). À titre d'exemple, les composants majoritaires apparus dans le profil chromatographique obtenu à 280nm détiennent un temps de rétention égale à 16.640 (pic n° 12) et 40.906 (pic n°34), respectivement. En contrepartie, les deux autres profils obtenus à 325 et 360 nm ne montrent aucune dominance des composés comparativement aux autres. Tous les pics sont apparus superposés.

Il nous est toutefois impossible d'identifier ces composants majoritaires présents dans nos extraits car leurs temps de rétention ne correspondent pas à ceux enregistrés dans notre bibliothèque. Étant donné que le temps de rétention d'un composant dans un mélange de molécules dépend de la nature de la phase stationnaire, de la composition de la phase mobile, des conditions analytiques.

3. Evaluation des activités biologiques

3.1. Evaluation du potentiel antioxydant d'échantillon

L'extrait des résidus d'orange est une source potentielle des composants chimiques naturels responsables de différentes activités antioxydantes. A cet effet, plusieurs essais ont été menés pour évaluer son potentiel antioxydant. Pour rappeler, les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante de notre extrait sont : ABTS, DPPH et CUPRAC

3.1.1. Activité du piégeage du cation radical ABTS

Les résultats du test ABTS (figure 19 et 20) ont révélé l'extrait du résidu d'orange présente une moyenne activité antiradicalaire modérée avec un IC₅₀ égale à 598.56 ± 41.51 $\mu\text{g/ml}$ comparativement aux standards Trolox et AC Ascorbique dont leurs IC₅₀ sont estimés à 3.21 ± 0.06 et 3.04 ± 0.05 $\mu\text{g/ml}$, respectivement.

L'extrait d'écorce d'orange étudié ici présente une activité du piégeage du radical ABTS supérieure à celle trouvée par Omoba et *al.* (2015) qui est de l'ordre de 14.68 $\mu\text{g/ml}$



Figure 19. Plaque de dosage de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne d'extrait résidus d'orange

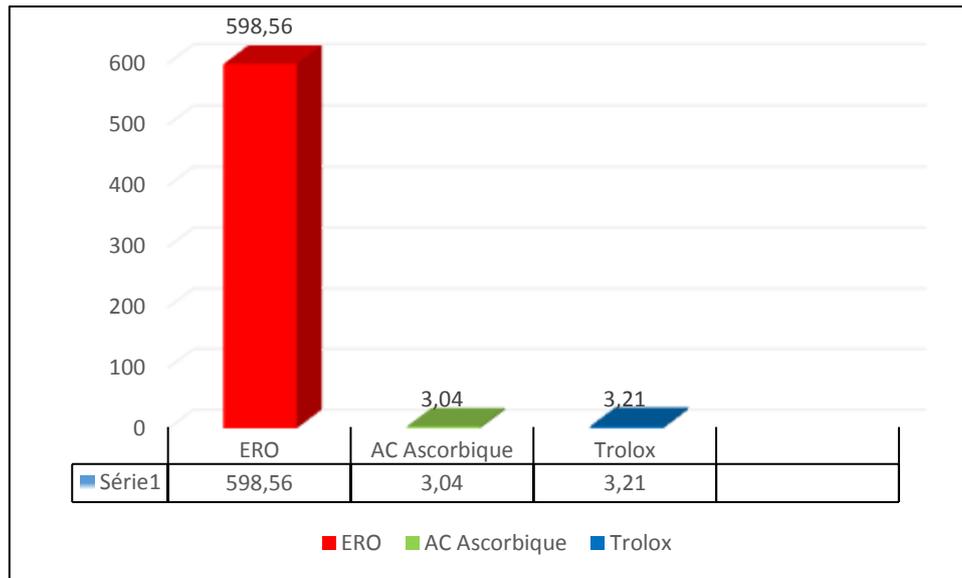


Figure 20. Valeurs des IC50 dans le test ABTS.

3.1.2. Activité du piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante DPPH est exprimée par la valeur IC50 (la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber 50% du radical libre DPPH). D'après l'histogramme présenté dans la figure 21, L'extrait d'écorce d'orange ne présente aucune activité anti radicalaire DPPH ($IC_{50} = >800 \mu\text{g/ml}$) comparativement aux standards (l'acide ascorbique : $IC_{50} = 4.39 \mu\text{g/ml}$ et Trolox : $5.12 \mu\text{g/ml}$). Notre résultat est supérieur à celui trouvé par Syakirah-Zulkifli et al. (2012) étant $564 \mu\text{g/ml}$.

L'activité antiradicalaire des différents extraits augmente avec l'augmentation de la concentration des composés phénoliques d'une manière générale (Ghasmi et al., 2009).

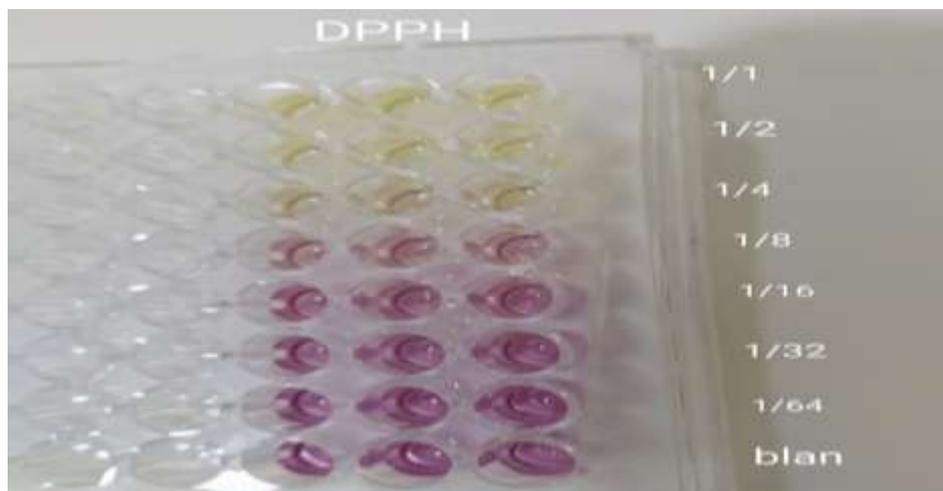


Figure 21. Plaque de dosage de l'activité anti radicalaire (DPPH) d'extrait résidus d'orange

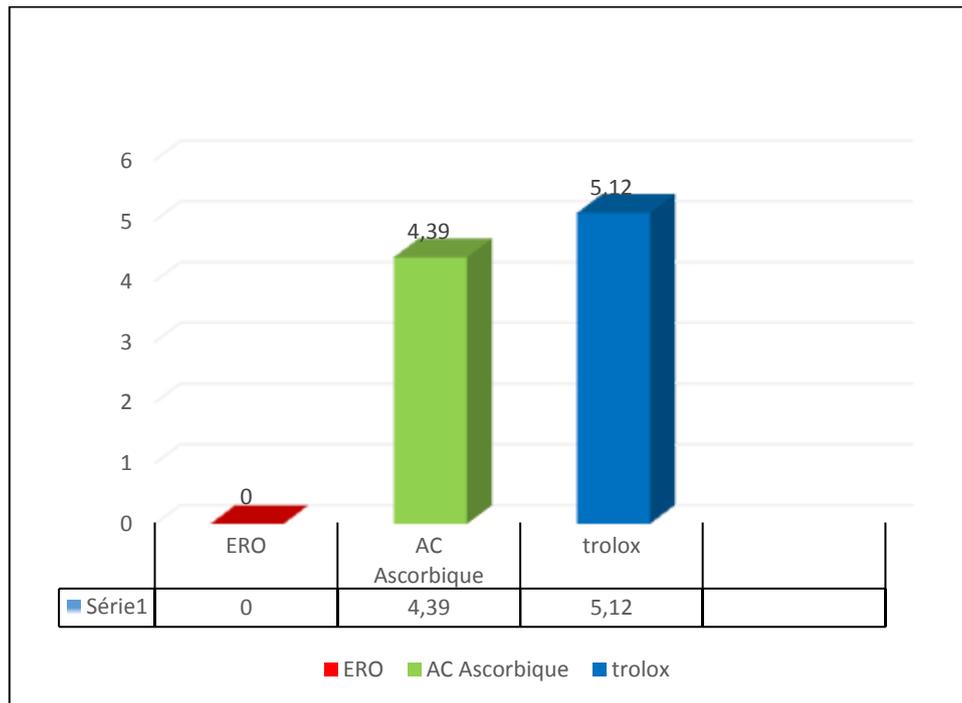


Figure 22. Valeurs des IC₅₀ dans le test DPPH.

3.1.3 Activité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

L'extrait des résidus d'orange exerce une activité antiradicalaire CUPRAC très faible avec une valeur de l'A0,5 égale à $676.44 \pm 2.69 \mu\text{g/ml}$ comparativement aux standards Trolox et AC Ascorbique ayant des valeurs d'A0.5 de l'ordre de $8.69 \pm 0.14 \mu\text{g/ml}$ et $8.31 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ pour le Trolox et l'acide ascorbique, respectivement.

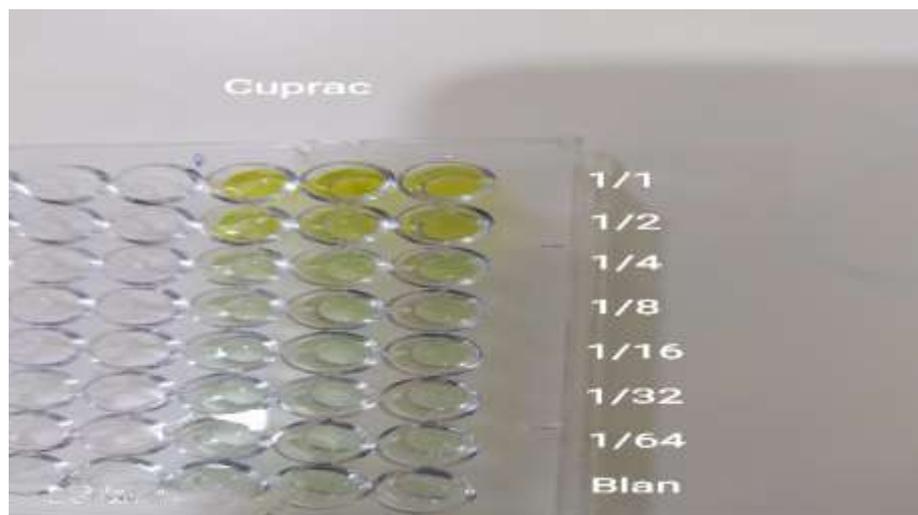


Figure 23. Plaque de l'évaluation du test CUPRAC de l'extrait des résidus d'oranges

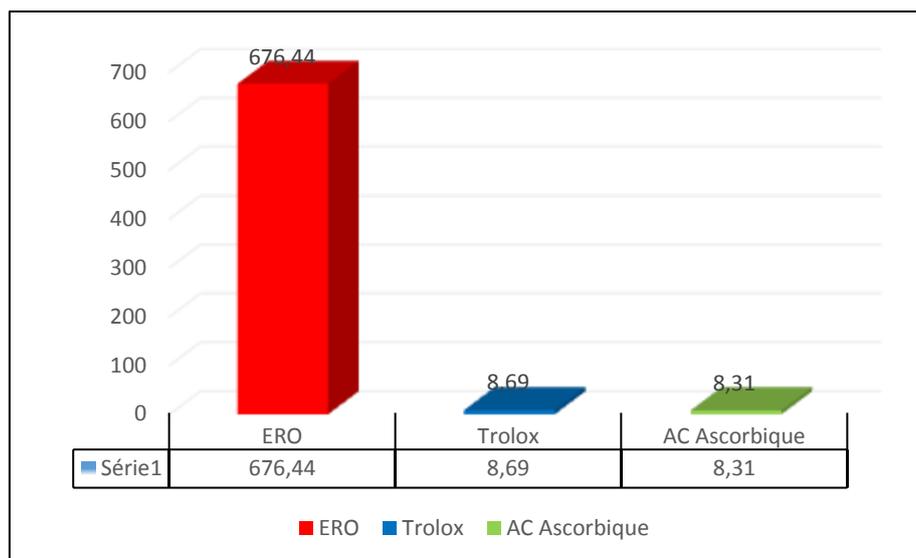


Figure 24. A_{0.5} pour l’activité antioxydant CUPRAC d’échantillon et des standards exprimé en µg /ml

3.2. L’activité du potentiel enzymatique des échantillons

Pour déterminer la capacité antidiabétique et anti Alzheimer d’échantillon étudié, deux enzymes potentielles thérapeutiques ont été ciblés : l’alpha amylase pour le diabète le cholinestérase pour Alzheimer.

3.2.1. L’activité antidiabétique d’échantillon

Aucune activité inhibitrice d’alpha amylase n’a pas été enregistrée pour l’extrait des résidus d’orange (ERO) avec une IC₅₀>400 µg/ml comparativement à l’acarbose dont l’IC₅₀ est estimée à 3650,93±10,70 µg/ml). Plusieurs mécanismes sont attribués aux flavonoïdes pour l’activité antidiabétique. Les flavonoïdes empêchent le diabète par leur effet antioxydant (Teh et al., 2014 ; Kasali et al., 2016).

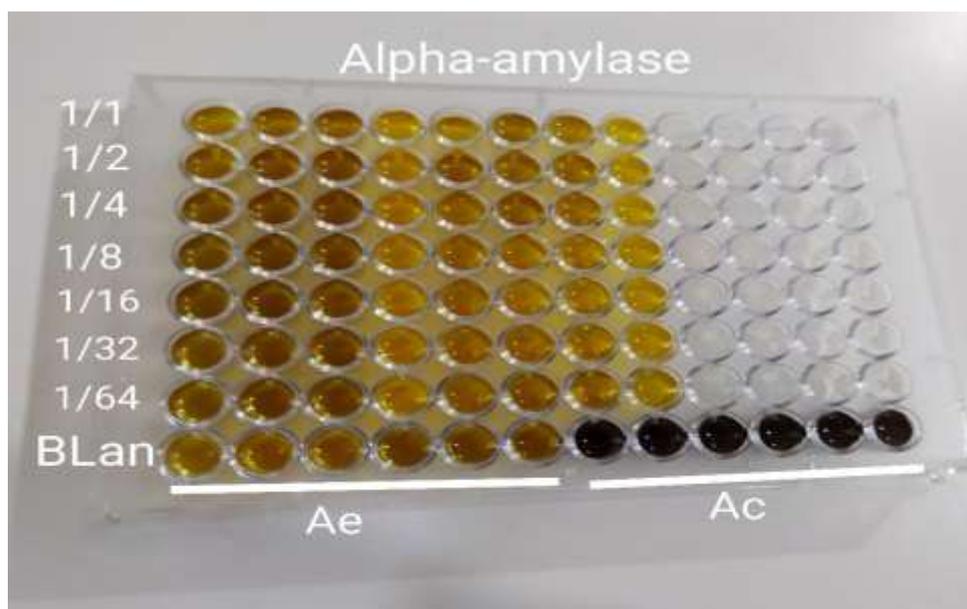


Figure25. Plaque de l'évaluation de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase d'extrait des résidus d'orange

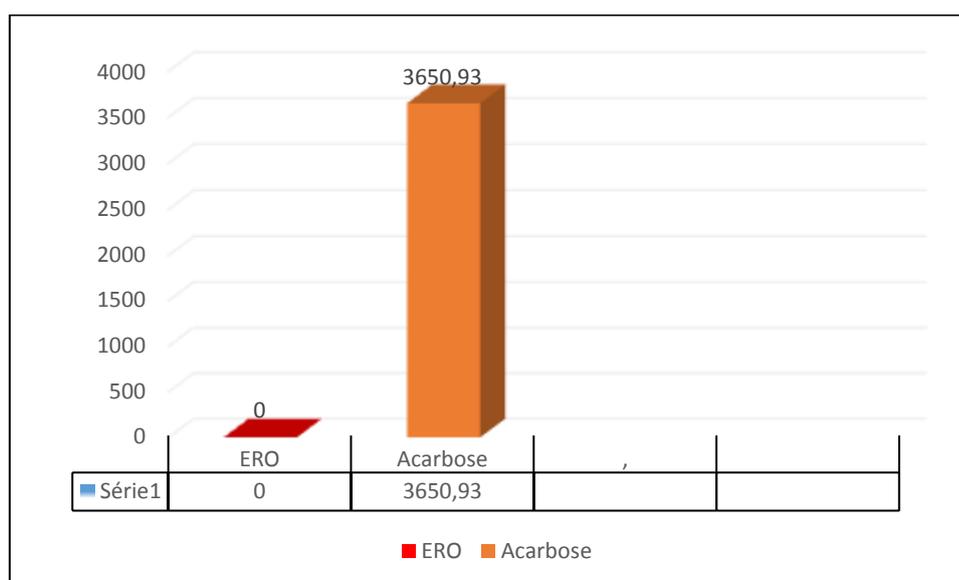


Figure26. $A_{0.5}$ pour l'activité antidiabétique d'échantillon et du standard

3.2.2. Activité anti Alzheimer d'échantillon

Aucune activité anti Alzheimer n'a été détectée pour notre extrait. Ce résultat est inattendu du fait que notre extrait est riche en composés phénoliques. L'absence des résultats pourrait avoir deux aspects : aspect qualitatif représenté par l'absence des composants chimique ayant le potentiel désiré, ou un aspect quantitatif du fait que ces composants sont présents mais en quantité au-dessous du seuil critique.



Figure 27. Plaquette de dosage de l'activité inhibitrice du cholinestérase d'extrait des résidus d'orange

3.3. Evaluation du potentiel antibactérienne d'échantillon

Notre extrait n'a pas présenté une activité anti bactérienne décelable. Cela pourrait être attribué aux espèces testées. Il se peut que notre extrait a des activités antibactériennes mais sur d'autre germes pathogènes.

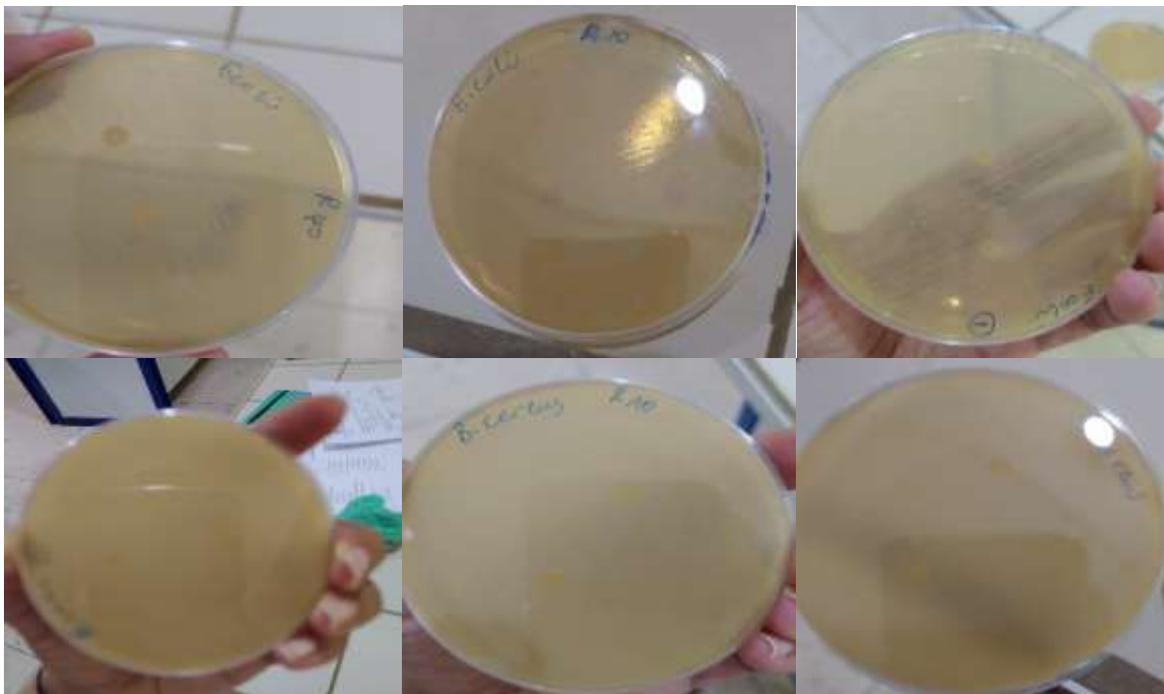




Figure 28. Effet d'extrait des résidus d'orange sur *Escherichia coli* et *Bacillus cereus*.

CONCLUSION



Le travail entrepris a été mené sur les écorces d'orange, l'extrait de notre étude est préparé selon la méthode de macération avec l'utilisation des mêmes conditions d'extraction étant un système solvant (éthanol/eau : 70 :30). Plusieurs analyses ont été effectuées afin d'identifier les caractéristiques chimiques (matière sèche, matière minérale et sucres totaux) de ces écorces et le pouvoir antioxydant ou réducteur suivie par une évaluation enzymatique (antidiabétique et anti Alzheimer) et antibactérienne.

Au vu des résultats obtenus, l'écorce d'orange révèle une variation du taux d'humidité, des minéraux et des sucres totaux. La teneur en matière sèche et la teneur en matière minérale ont des résultats compatibles par contre la teneur en sucres totaux à une valeur faible que les études précédentes.

Les résultats de cette étude montrent que les écorces contiennent des polyphénols y compris les flavonoïdes. L'analyse phytochimique est ainsi une étape importante pour justifier le taux des phénols totaux et flavonoïdes des écorces d'orange.

L'évaluation du potentiel biologique de notre échantillon est faite à travers l'évaluation de son activité antioxydante, enzymatique et antibactérienne. La première est réalisée par trois méthodes différentes : Le piégeage du radical libre DPPH ; le test de réduction du cuivre CUPRAC, ABTS. Les résultats de ces tests montrent que l'extrait présente des activités antiradicalaires et antioxydantes faibles par rapport aux standards. Ce constat pourrait être justifié par leurs teneurs similaires en composants chimiques et phytochimiques. De plus, l'activité antioxydante n'est généralement pas due à l'action d'un seul composé mais aux interactions entre plusieurs composés. C'est pour cette raison que plusieurs méthodes pour l'évaluation de cette activité sont recommandées car chaque méthode est spécifique par son mode d'action.

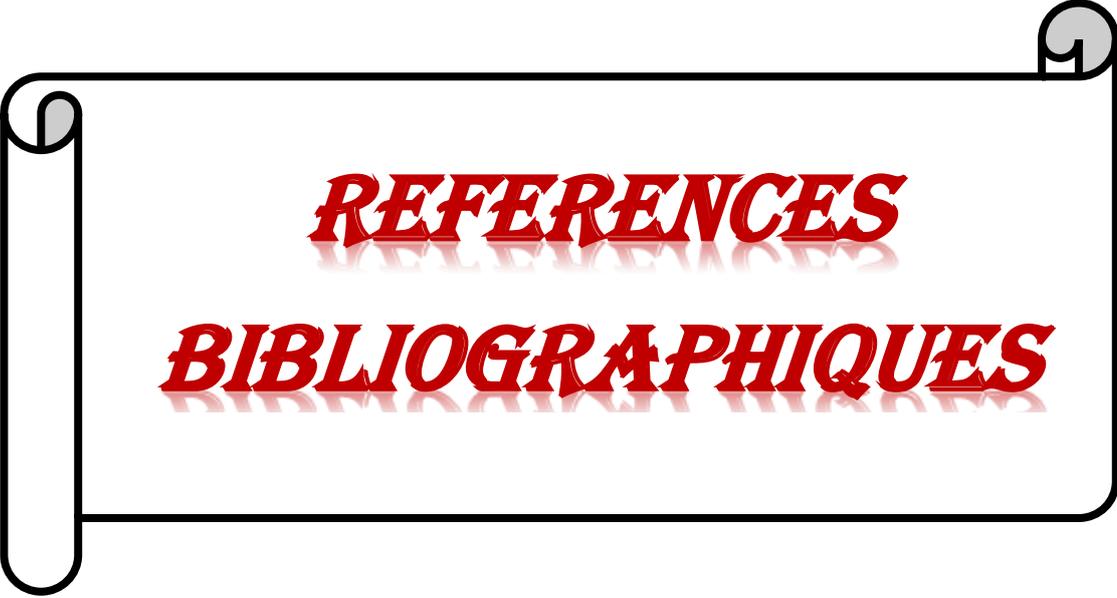
Le deuxième aspect de l'évaluation du potentiel biologique de notre échantillon est fait par la détermination de l'activité antidiabétique et anti-Alzheimer. Aucune activité antidiabétique et anticholinestérase n'ont été détectées comparativement aux standards.

Le troisième aspect de l'évaluation du potentiel biologique de notre échantillon est fait par la détermination de l'activité antibactérienne. Les résultats ont montré que l'extrait ne présente aucune activité antibactérienne.

Les résultats de cette étude révèlent que les sous-produits d'orange, généralement rejetés dans l'environnement renferment des quantités importantes de composés phénoliques

susceptibles d'être exploités à plusieurs échelles (pharmaceutique, alimentaire, cosmétique....etc.).

L'extraction des polyphénols à partir des sous-produits d'orange permettrait la valorisation de ces déchets, et donc l'obtention de substances bioactives d'intérêt thérapeutique et d'application industrielle. Cette extraction de polyphénols au moyen d'eau constitue un avantage économique, suite à l'isolement substances antioxydantes et antimicrobiennes à moindre cout d'une part, et la résolution du problème de pollution d'autre part.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abderrazak M.** et Joël R. La botanic à Z. Ed. **Dunod. Paris. 2007. pp 177.**
- **Ali, M. B., 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(3), 607-621.
- **Al-Anbari, A. K. H., & Hasan, M.A.**(2015). Antioxidant activity in some citrus leaves and seeds ethanolic extracts. In International Conference on Advances in Agricultural, Biological and Environmental Sciences (AABES) London (UK), July (pp. 22-23).
- **Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., & Boskou, D.** (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food chemistry*, 94(1), 19-25.
- **Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., & Özyurt, D.** (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.
- **Bartnick, D.D., Mohler, C.M., Houlihan, M.,** 2006. Methods for the production of food grade extracts. United States Patent Application. 20060088627.
- **Blois, M. S.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- **Boizot, N ; Charpentier, J.P.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, 79-8.
- **Bouhadi, N., Nouani, A., Benmalek, N., Benchabane, A.**(2016). Valorisation des sous produits d'argemes :production d'enzymes pectinolytiques par bioconversion. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology* ,2(1).
- **Chandrasekaran, M.** (Ed.). (2012). Valorization of food processing by-products. CRC press.
- **Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M.** (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.

- **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. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- **Ghasemi, K., Ghasmi, Y.,** & Ebrahimzadeh, M. A. (2009). Antioxydant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci*, 22(3), 277-281.
- **Ghedira K.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 2005, Vol 3(4) ; pp 162-169.
- **Giannuzzo, A. N.,** Boggetti, H. J., Nazareno, M. A., & Mishima, H. T. (2003). Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of *Citrus paradisi*. *Phytochemical Analysis*, 14(4), 221-223.
- **Girotti –Chanu C.** Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *mirotea de bilis* .thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon. 2006, pp 136
- **Gomez-Caravaca, A.M.,** Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A.
- **Grigoraş, C. G.** (2012). Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- **Grohmann, K.,** Cameron, R. G., & Buslig, B. S. (1995). Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology*, 54(2), 129-141
- **Jagetia, G. C.,** Venkatesha, V. A., & Reddy, T. K. (2003). Naringin, a citrus flavonone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis*, 18(4), 337-343.
- **Jeong, S. M.,** Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S. C. (2004). Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(11), 3389-3393.
- **Kammoun Bejar, A.,** Kechaou, N., & Boudhrioua Mihoubi, N. (2011). Effect of microwave treatment on physical and functional properties of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. *Journal of Food Processing & Technology*, 2(2), 109.

- **Kuljarachanan**, T., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2009). Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chemistry*, 113(4), 944-949.
- **Ladaniya**, 00.; 2008 . Boudraa, I., & Benali, S. E. (2017). Etude comparative entre deux méthodes d'extraction de la pectine de l'écorce de deux variétés d'orange (Thomson et Sanguine) (Doctoral dissertation, Université de Jijel).
- **Lagha-Benamrouche, S.**, & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria : peels and leaves. *Industrial Crops and product*, 50, 723-730.
- **Larrauri, J.**, Rupérez, P., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1996). High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity. *Food research international*, 29(8), 757-762.
- **Li B. B.**, Smith B., Hossain Md. M., 2006a. Extraction of phenolics from citrus peels. I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*. 48, 182-188.
- **Li B.B.**, Smith B, Hossain M.M., 2006b. Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*. 48, 189 196
- **Liao et al, 2010 anti bacterienne**
- **Lu, D.**, Cao, Q., Li, X., Cao, X., Luo, F., & Shao, W. (2009). Kinetics and equilibrium of Cu (II) adsorption onto chemically modified orange peel cellulose biosorbents. *Hydrometallurgy*, 95(1-2), 145-152.
- **Manthey, J. A.**, & Grohmann, K. (1996). Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 811-814.
- **M'hiri, N.**, Ioannou, I., Ghoul, M., & Boudhrioua, N. M. (2014). Extraction methods of citrus peel phenolic compounds. *Food Reviews International*, 30(4), 265-290.
- **Mirzaei-Aghsaghali and Maheri-Sis, 2008**
- **Murat ; 1981.** Rahmani, A., & Tayebi, H. (2016). Gestion et valorisation énergétique des déchets organiques (Doctoral dissertation, Université Ahmed Draïa-Adrar).
- **Nawel, M. B.** Valorisation des résidus agro-industriels.

- **Oliveira**, S. D., Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., & Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497-503
- **Omoba**, O. S., Obafaye, R. O., Salawu, S. O., Boligon, A. A., & Athayde, M. L. (2015). HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. *Antioxidant*, 4(3),498-512.
- **Re**, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- **Ribéreau-Gayon**, P. (1968). *Les Composés phénoliques des végétaux : par Pascal Ribéreau-Gayon...* Dunod.
- **Selmi**, S., Rtibi, K., Grami, D., Sebai, H., & Marzouki, L. (2017). Protective effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat. *Lipids in health and disease*, 16(1), 1-12.
- **Singleton**, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- **STEWART (I.)**. Citrus color. A review. *Proc. /nt. Soc. Ci tri culture*, 1977, vol. 1.
- **STEWART (I.)** and **WHEATON (T.A.)**. Carotenoid in Citrus. *Florida Agricu/tural Exp. Sta., Journal series no 4887*
- **Topçu**, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103(3), 816-822
- **Tumbas**, V. T., Četković, G. S., Đilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., Vulić, J. J., Knez, Ž. & Škerget, M. (2010). Antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel. *Acta periodica technologica*, (41), **195-203**.
- **Wang**, Y. C., Chuang, Y. C., & Ku, Y. H. (2007). Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food chemistry*, 102(4), 1163-1171.
- **Xu**, G. H., Chen, J. C., Liu, D. H., Zhang, Y. H., Jiang, P., & Ye, X. Q. (2008). Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of food science*, 73(1), C11-C18.
- **Xu**, G., Ye, X., Chen, J., Liu, D., 2007. Effect of heat treatment on the phenolic

compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 330-335.

- **Zengin, G.**, Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., & Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53, 244-251
- **Zia-ur-Rehman.** (2006). Citrus peel extract-A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*, 99(3), 450-454.
- **Zulkifi, K. S.**, Abdullah, N., Abdullah, A., Aziman, N., & Kamarudin, W.S.S.W.(2012).Bioactive phenolic compounds and antioxydant activity of selected fruit peels. In international Conference on Environment, chemistry and biology (vol.49, No. 14, pp. 66-70)



ANNEXES

Annexe 1: Tableaux des résultats

Résultats de l'A0.5 du test CUPRAC

Extraits	12.5	25	50	100	200	400	800	A _{0,5} (µg/ml)
	0.12±0.01	0.13±0.01	0.14±0.01	0.18±0.01	0,22±0.01	0,36±0,04	0,55±0,05	676.44±2.69
	0.390 µg	0.781 µg	1.562 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5	25	A _{0,5} (µg/ml)
Trolox	0.12±0.01	0.14±0.00	0.18±0.01	0.25±0.00	0.40±0.01	0.67±0.02	1.34±0.13	8.69±0.14
Ascorbic acid	0.11±0.01	0.12±0.01	0.18±0.03	0.24±0.01	0.41±0.01	0.71±0.02	1.38±0.11	8.31±0.15

Résultats de l'IC50 du test DPPH

	12.5	25	50	100	200	400	800	IC ₅₀ (µg/ml)
	NA	NA	NA	NA	NA	19,68±5,71	27,69±5,56	>800
	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	IC ₅₀ (µg/ml)
Trolox	6.42±0.91	13.33±2.14	30.19±0.67	61.48±2.98	87.16±0.28	88.46±0.11	87.72±0.47	5.12±0.21
Ascorbic acid	0.31±1.02	12.90±0.28	29.69±0.39	76.67±0.37	84.94±0.84	87.78±0.49	86.36±0.21	4.39±0.01

Résultats de l'IC₅₀ du test ABTS

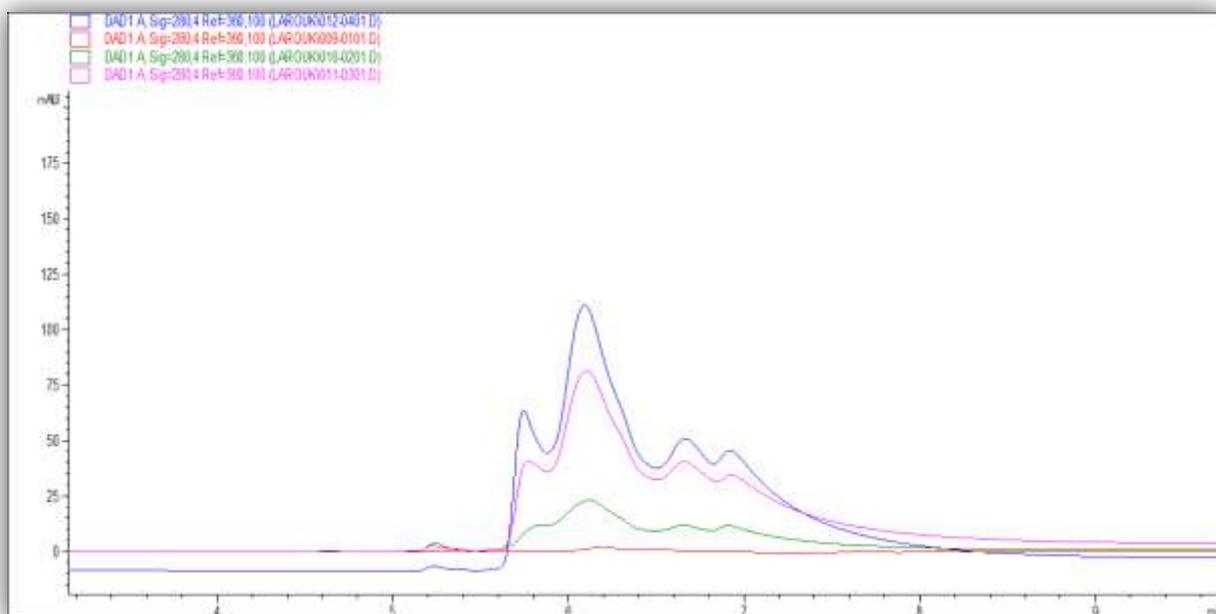
	12.5	25	50	100	200	400	800	IC ₅₀ (µg/ml)
	NA	NA	NA	2,95±3,51	17,59±3,42	43,21±0,00	57,35±3,38	598,56±41,51
	0.78125	1.5625	3.125	6.25	12.5	25	50	IC ₅₀ (µg/ml)
Trolox	14.74±0.37	26.15±0.65	51.70±1.51	89.72±0.67	92.89±0.19	92.89±0.19	91.84±1.19	3.12±0.06
Ascorbic acid	13.43±0.82	28.76±0.67	52.94±0.94	93.21±0.11	93.08±0.19	92.40±0.88	92.96±0.11	3.04±0.05

Résultats de l'essai inhibiteur de l'α-amylase

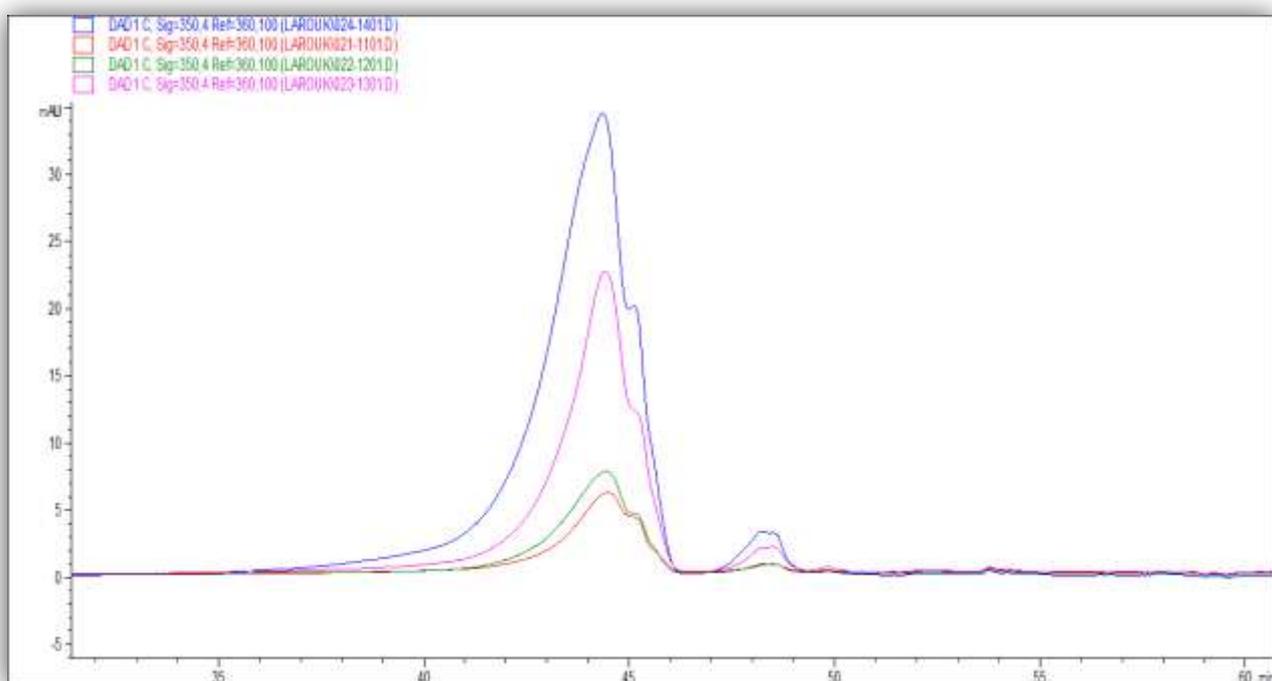
% d'inhibition								
Extraits	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	IC ₅₀ (µg/ml)
	NA	NA	4,36±1,62	6,09±0,67	10,45±1,94	12,35±0,19	14,81±0,19	>400
	62,5 µg	125 µg	250 µg	500 µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	IC ₅₀ (µg/ml)
Acarbose	7,76±0,17	8,08±0,30	9,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	3650,93±10,70

Annexe 2 : Chromatogrammes des Standards utilisés dans l'analyse HPLC

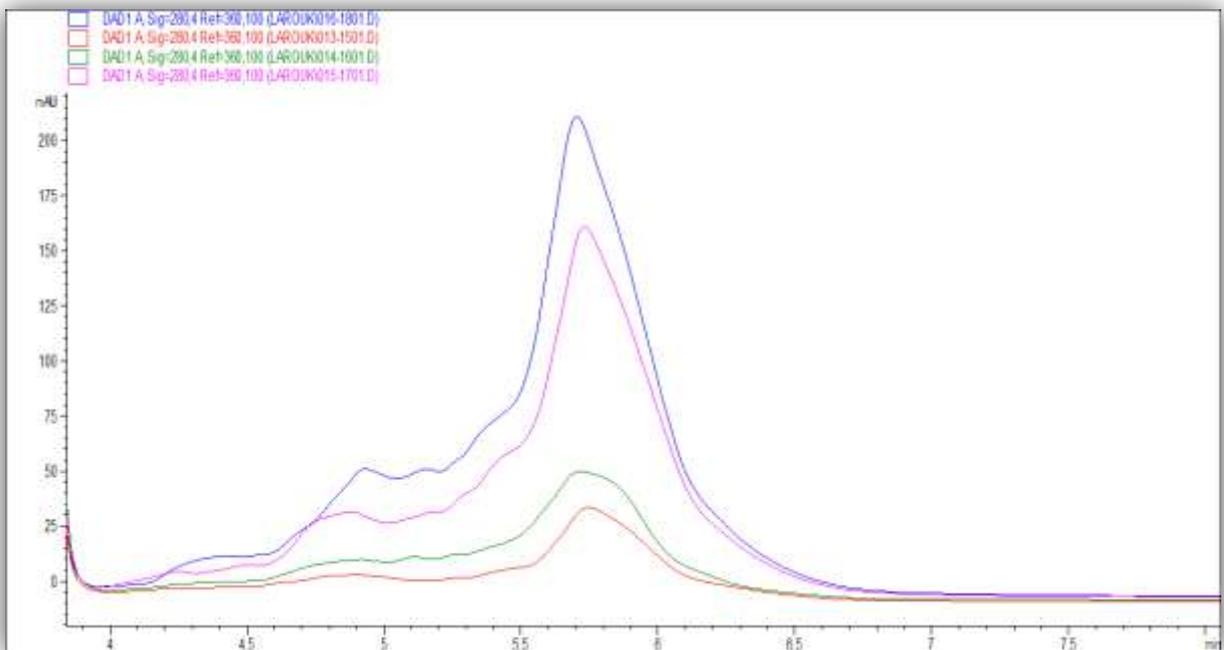
1-Acide Gallique



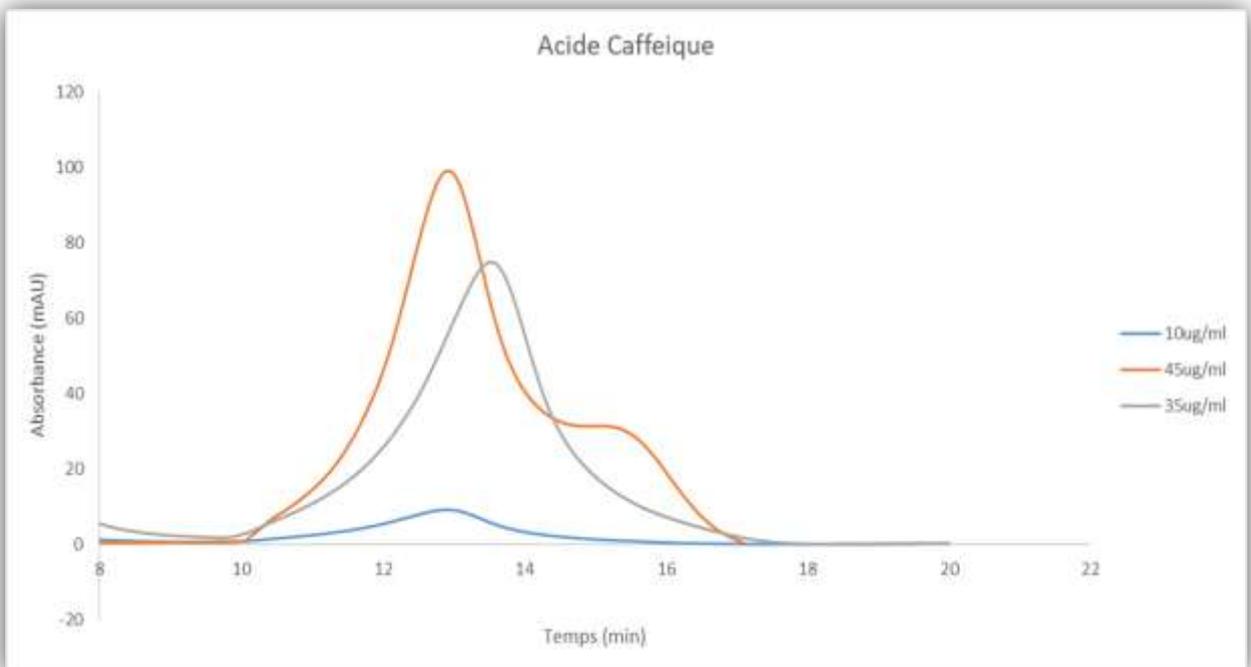
2-Quercetine



3-Acide hydroxy benzoïques

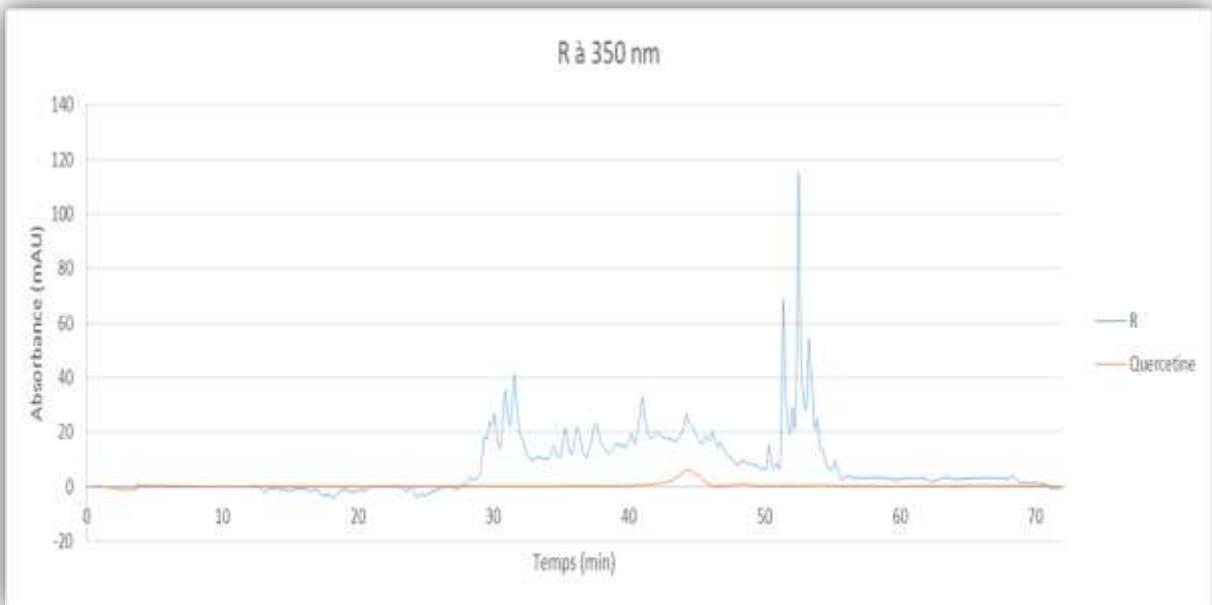


4-Courbe d'acide caféique

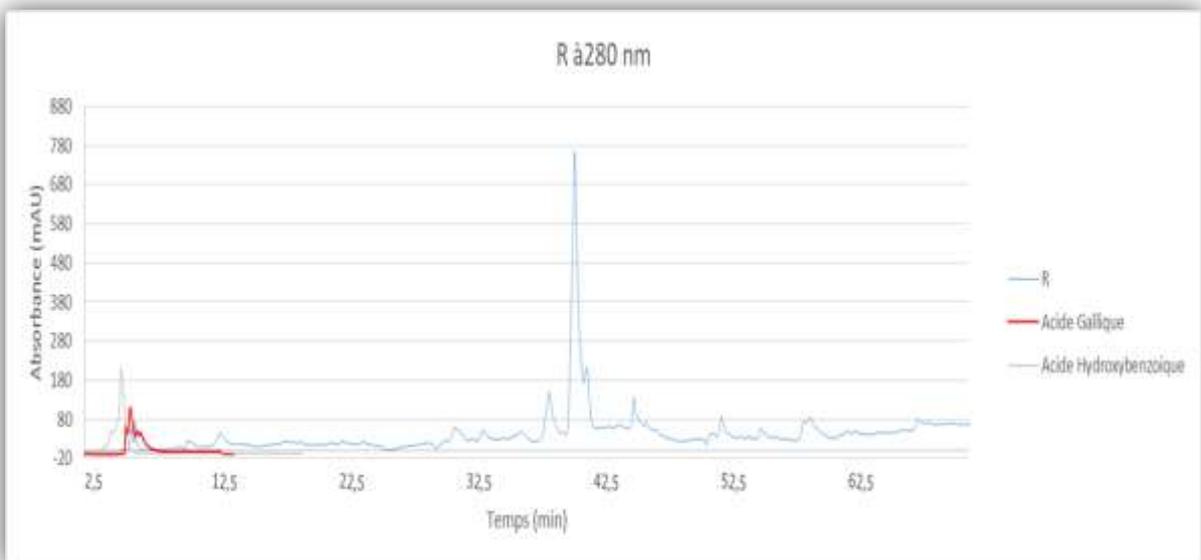


Chromatogrammes des résultats de l'analyse de l'extrait des résidus d'orange

1. Courbe d'absorbance à 350nm



2. Courbe d'absorbance à 280nm



Résumé

L'écorce d'orange de la saison est étudiée avec un objectif de valoriser l'un des déchets de l'industrie agroalimentaire, comme une source de substances bioactives à intérêt divers. Pour obtenir cet objectif, nous avons suivi la méthode suivante : Récupération de l'écorce à partir des oranges commercialisées pendant la saison d'hiver, caractérisation chimique de l'écorce obtenue via la détermination de leurs contenus en eau, en minéraux et en sucres, caractérisation phytochimique de l'extrait des résidus via la détermination de leurs contenus en phénols et en flavonoïdes. Une analyse par chromatographie à haute performance (CLHP) est ainsi investiguée en utilisant l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide benzoïque et la quercitrine comme des standards et Caractérisation biologique de l'extrait en déterminant son pouvoir antioxydant, antidiabétique, anti-Alzheimer et antibactérien. Vu son richesse en composés phénoliques notamment les flavonoïdes, notre résidu pourrait être une source importante de métabolites secondaires d'intérêt industriels et pharmaceutiques.

Abstract

The orange peel of the season is studied with the objective of enhancing one of the waste products of the food industry, as a source of bioactive substances of various interests. To achieve this objective, we followed the following method: Recovery of the peel from oranges marketed during the winter season, chemical characterization of the peel obtained by determining their water, mineral and sugar content, phytochemical characterization of the residue extract via the determination of their phenol and flavonoid content. An analysis by high performance chromatography (HPLC) is thus investigated using gallic acid, caffeic acid, benzoic acid and quercitrin as standards and biological characterization of the extract by determining its antioxidant and antidiabetic power, anti-Alzheimer's and antibacterial. Given its richness in phenolic compounds, especially flavonoids, our residues could be an important source of secondary metabolites of industrial and pharmaceutical interest.

ملخص

تمت دراسة قشر البرتقال لهذا الموسم بهدف تعزيز أحد نفايات صناعة الأغذية، كمصدر للمواد النشطة بيولوجياً ذات الاهتمامات المختلفة. لتحقيق هذا الهدف، اتبعنا الطريقة التالية: استعادة قشر البرتقال الذي يتم تسويقه خلال فصل الشتاء، والتوصيف الكيميائي للقشر الذي تم الحصول عليه من خلال تحديد المحتوى المائي والمعدني والسكر، والتوصيف الكيميائي النباتي لمستخلص البقايا عن طريق تحديد خصائصها. محتوى الفينول والفلافونويد. يتم إجراء تحليل كروماتوجرافي عالي الأداء (HPLC) باستخدام حمض الجاليك وحمض الكافيك وحمض البنزويك وكيرسيتينين كمعايير وتوصيف بيولوجي للمستخلص من خلال تحديد قوته المضادة للأكسدة ومضادات السكر ومضادات الزهايمر والبكتيريا. نظراً لغناها بالمركبات الفينولية، وخاصة مركبات الفلافونويد، يمكن أن تكون مخلفاتنا مصدراً مهماً للأبحاث الثانوية ذات الأهمية الصناعية والصيدلانية.

Université Des Frères Mentouri Constantine -Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biochimie et biologie cellulaire et moléculaire	
Nom : KHALFA, HAMROUCHE Prénom : Raounek, Nour El Imen	Date de soutenance : 23/09/2021
<u>Intitulé</u> Etude des résidus d'orange (Ecorce) par la combinaison de deux approches, chimique et biologique	
<i>Résumé</i> <p>L'écorce d'orange de la saison est étudié avec un objectif de valoriser l'un des déchets de l'industrie agroalimentaire, comme une source de substances bioactives à intérêt divers. Pour obtenir cet objectif, nous avons suivi la méthode suivante : Récupération d l'écorce à partir des oranges commercialisées pendant la saison d'hiver , caractérisation chimique de l'écorce obtenue via la détermination de leurs contenus en eau, en minéraux et en sucres, caractérisation phytochimique de l'extrait des résidus via la détermination de leurs contenus en phénols et en flavonoïdes. Une analyse par chromatographie à haute performance (CLHP) est ainsi investiguée en utilisant l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide benzoïque et la quercitrine comme des standards et Caractérisation biologique de l'extrait en déterminant son pouvoir antioxydant, antidiabétique, anti-Alzheimer et antibactérien. Vu son richesse en composés phénoliques notamment les flavonoïdes, notre résidus pourrait être une source importante de métabolites secondaires d'intérêt industriels et pharmaceutiques.</p>	
Mots clés : Résidus, Ecorce d'orange, valorisation, biomolécules	
Laboratoires de recherche : *Laboratoire d'analyse des aliments, CRBt ; *Laboratoire d'analyse et contrôle qualité, CRBt ; *Laboratoire de Biochimie, CRBt ; *Laboratoire bactériologie, CRBt.	