



*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
*Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique*  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
*Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem*  
جامعة عبد الحميد بن باديس  
*Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie*  
كلية علوم الطبيعة و الحياة



## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**Bordji Soumia**

Pour l'obtention du diplôme de

## MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité : **Nutrition et Pathologie**

### THÈME

## PHYTOCHIMIE ET ACTIVITÉ ANTIOXYDANT DU ZESTE DE CITRON

*Soutenu le **Juillet 2022**, devant le jury:*

Qualité	Nom et Prénom	Grade	Etablissement d'origine
Président	CHAALAL Abdelmalek	MCA	Université de Mostaganem
Examineur	ZABOURI Younes	MCB	Université de Mostaganem
Rapporteur	MIR Hakima	MCA	Université de Mostaganem

*Année Universitaire*  
**2022/2023**

## REMERCIEMENTS

*Ce travail été réalisé au Laboratoire de biologie Animale du Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem*

*Mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance vont à mon Rapporteur de recherches Madame **MIR H**, Maître de Conférences A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, sa simplicité, sa compétence, sa rigueur scientifique, ses conseils éclairés et ses critiques m'ont été très bénéfiques. Sa présence à chaque étape de ce mémoire et la confiance qu'elle m'a accordée m'ont soutenue et motivée pour mener à terme ce travail.*

*J'exprime mes respectueux remerciements à Monsieur **CHAALAL A**, Maître de Conférences A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.*

*Il m'est agréable de remercier Monsieur **ZABOURI Y**, Maître de Conférences B à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, qui a bien voulu participer dans ce jury et examiner ce travail*

*Il y a certaines personnes qui méritent un remerciement spécial: Mr Abaidi Ahmed. Merci aussi à tous ceux - sans citer de nom, de peur d'oublier quelqu'un - avec qui j'ai travaillé durant la réalisation de mon mémoire.*

*SOUMIA*

## Dédicace

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mon cher père et ma chère defunte maman*

*Abd elkader bordji , Fatima*

*Mes chers frères.*

*Mes chères soeurs,*

*Ma tante zahia Rouai*

*Mon fiancé BELOUDANE Faycal*

*Mes meilleures et chers amis*

*BOUAMAMA Farida , SAKMECHE Khaoula*

*Soumia*

# SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
1. Stress oxydatif et les Radicaux libres.....	4
2. Défense antioxydante.....	6
3. Les antioxydants naturels d'origine végétale.....	9
3.1. Les composés polyphénoliques.....	9
3.2. Les principales sources alimentaires des polyphénols.....	9
3.3. Classification des polyphénols.....	10
3.3.1. Les acides phénoliques.....	10
3.3.2. Les flavonoïdes.....	10
3.3.3. Les tanins.....	10
3.4. Biodisponibilité des polyphénols.....	11
3.5. Effets biologiques des polyphénols.....	11
3.5.1. Effet anti oxydant.....	12
4. Effets des agrumes sur le stress oxydant et le statut antioxydant.....	14
5. Choix du matériel biologique.....	18
5.1. Matériel végétal.....	18
<b>Matériels &amp; Méthodes</b>	
1. Description et choix de la variété Citron jaune.....	20
1.1. Systématique de Citrus limon.....	21
1.2. Préparation de l'extrait de l'écorce de Citrus jaune.....	21
1.2.1. Calcul du rendement durant l'obtention de l'extrait de l'écorce de Citron jaune...	22
2. EVALUATION DU POTENTIEL ANTIOXYDANT DU CITRON JAUNE.....	22
2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT) de l'extrait de l'écorce de citron jaune.....	22
2.2. Mesure de l'activité anti-radicalaire.....	24
4. Analyse statistique.....	25
<b>Résultats &amp; Discussion</b>	
1. Résultats de préparation des végétaux étudiés.....	26
2. Evaluation du potentiel antioxydant du citron jaune.....	27

2.1.	Teste de polyphénol.....	29
2.2.	Teste de DPPH.....	30
	<b>Conclusion.....</b>	<b>31</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>32</b>

## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1:</b> Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène .....	5
<b>Figure 2:</b> Rôle des espèces oxygénées activées (EOA) dans les cellules .....	6
<b>Figure 3:</b> Les différentes espèces oxygénées activées (EOA) et les antioxydants régulateurs de leur production.....	7
<b>Figure 4:</b> Structure chimique du phénol .....	9
<b>Figure 5:</b> Schéma général du métabolisme des polyphénols.....	12
<b>Figure 6:</b> Caractéristiques morphologiques d'un Citrus .....	14
<b>Figure 7:</b> Citrus limon .....	20
<b>Figure 8 :</b> Dosage des polyphénols totaux .....	24
<b>Figure 9 :</b> Les étapes de préparation la poudre de zeste de citron.....	26
<b>Figure 10 :</b> La courbe d'étalonnage des polyphénols totaux réalisée à l'aide de l'acide ascorbique.....	28
<b>Figure 11 :</b> Effet scavenger d'extrait d'écorce de citron jaune et les standards vis-à-vis du radical DPPH.....	31

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1:</b> Antioxydants et marqueurs d'oxydation .....	8
<b>Tableau 2 :</b> Propriétés biologiques des polyphénols et effets sur la santé.....	13
<b>Tableau 3 :</b> Composition moyenne de quelques agrumes (pour 100g de fruits).....	15
<b>Tableau 4 :</b> Les grands producteurs de citron et lime de monde.....	29
<b>Tableau 5:</b> Teneurs en polyphénols totaux d'extrait d'écorce de citron jaune .....	30
<b>Tableau 6 :</b> Teneurs en polyphénols (mg/100g) de certains agrumes et leurs écorces .....	31

## Résumé

---

Des extraits méthanoliques d'écorces de citron ont été testés pour leurs activités antioxydantes. Les composés phénoliques (poly phénols totaux et les flavonoïdes) extraits par le solvant d'extraction (méthanol) présentent des variations selon l'extrait et la variété, l'évaluation du pouvoir antioxydant in vitro a révélé des capacités antioxydantes chez tous les extraits.

Pour cela plusieurs méthodes d'extractions ont été utilisées :

La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des phénols totaux, des flavonoïdes par le réactif du folin - ciocalteu, par le trichlorure d'aluminium.

La deuxième partie est l'étude de l'activité antioxydante des extraits de plantes en utilisant ainsi des techniques : Piégeage du radical DPPH.

Les résultats obtenus ont été très significatifs la corrélation entre l'activité anti-oxydante et la teneur en composés phénoliques totaux a été également investiguée.

Les résultats aux quels nous avons abouti ont montré que :

La teneur en polyphénols totaux dans les extraits méthanoliques montre des résultats différents qui sont de 83,5 ; 91,33mg GAE/g ES, correspondant à l'extrait écorce de citron.

L'augmentation de l'acide gallique est proportionnelle avec l'augmentation de la densité optique de l'extrait d'écorces de citron.

Les écorces de citron présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celle de la référence.

Mots-clés : Zeste de citron, Polyphénols, Activité antioxydante, DPPH

## Abstract

---

Methanolic extracts of lemon peels were tested for their antioxidant activities the phenolic compounds (total polyphenols and flavonoids) extracted by the extraction solvent (ethanol) show variations according to the extract and the variety, the evaluation of the In vitro antioxidant power revealed antioxidant capacities in all extracts.

For this, several extraction methods were used:

The first part of this study concerns the extraction and quantification of total phenols, flavonoids by the reagent of folin - ciocalteu, by aluminum trichloride

The second part is the study of the antioxidant activity of plant extracts using techniques:

Scavenging of the DPPH radical,

The results obtained were very significant; the correlation between the antioxidant activity and the content of total phenolic compounds was also investigated.

Our results showed that:

The content of total polyphenols in the methanolic extracts shows different results which are 83.5; 91.33mg GAE/g ES, corresponding to lemon peel extract.

The increase in gallic acid is proportional with the increase in the optical density of lemon peel extract.

lemon peels have antioxidant activities that are significantly lower than that of the reference.

**Keywords:** Lemon peel, Polyphenols , Antioxidant activity ,DPPH

## المخلص

تم اختبار المستخلصات الإيثانولية لقشور الليمون من حيث نشاطها كمضاد للأكسدة ، حيث أظهرت المركبات الفينولية (البوليفينول الكلي والفلافونويد) المستخلصة من مذيب الاستخلاص (الإيثانول) تباينات حسب المستخلص والصنف ، وكشف تقييم قوة مضادات الأكسدة في المختبر عن قدراتها المضادة للأكسدة في كل المقطعات

لهذا ، تم استخدام العديد من طرق الاستخراج

يتعلق الجزء الأول من هذه الدراسة باستخراج وتقدير إجمالي الفينولات والفلافونويدات بواسطة كاشف فولين - سيوكالتيو بواسطة ثلاثي كلوريد الألومنيوم

الجزء الثاني دراسة النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات النباتية باستخدام تقنيات الكسح من قوة DPPH الجذرية

النتائج التي تم الحصول عليها كانت معنوية جدا ، كما تم دراسة الارتباط بين النشاط المضاد للأكسدة ومحتوى المركبات الفينولية الكلية

أظهرت نتائجنا أن

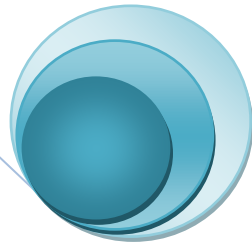
يظهر محتوى البوليفينول الكلي في المستخلصات الإيثانولية نتائج مختلفة وهي 83.5 ؛

91.33mg GAE / g ES ، الموافق لمستخلص قشر الليمون

تناسب الزيادة في حمض الجاليك مع الزيادة في الكثافة البصرية لمستخلص قشر الليمون .

قشور الليمون لها أنشطة مضادة للأكسدة أقل بكثير من تلك المرجعية .

DPPH,الكلمات المفتاحية: قشر الليمون ، بوليفينول ، نشاط مضاد للأكسدة



# INTRODUCTION

L'alimentation et le mode de vie sont reconnus comme étant la première ligne d'intervention pour la réduction du risque de survenue des maladies liées à l'athérosclérose (**Getz & Reardon, 2007**). En effet, plusieurs données épidémiologiques et cliniques ont démontré l'ampleur du bénéfice de certaines mesures nutritionnelles sur l'événement cardiovasculaire (**Parolini et al., 2014**).

Les nutritionnistes recommandent de manger au moins cinq portions de fruits et légumes par jour afin de protéger au maximum contre l'apparition de diverses pathologies chroniques (maladies cardiovasculaire, cancer...) dans lesquelles un stress oxydant est potentiellement impliqué (**PNNS, 2006**).

Les bénéfices santé des fruits d'agrumes ont été principalement attribuée à la présence de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques (par exemple, les flavanones glycosidés, acides hydroxycinnamiques) (**Marchand, 2002**), la vitamine C, et les caroténoïdes (**Rao & Rao, 2007**).

Les agrumes sont les fruits des végétaux du genres *Citrus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* et *Poncitrus* (famille des Rutaceae), parmi lesquels on trouve les citrons, les clémentines, les kumquats, les bergamotes, les limes, les mandarines, les oranges, les pamplemousses, les pomelos, les tangerines et les cédrats.

De très nombreux travaux ont été réalisés pendant ces vingt dernières années pour sélectionner les sources végétales les plus avantageuses pour des applications industrielles, ou pour des compléments alimentaires. Toutes les plantes renferment des composés phénoliques et sont, à ce titre, sources potentielles d'antioxydants (**Sarni-Manchado & Cheynier, 2006**).

Les polyphénols ou composés phénoliques sont des substances du règne végétal, présentes partout ; racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits de tous les végétaux. Ils ont des structures chimiques extrêmement variées. Mais toutes en commun la présence de fonctions phénoliques (**Murat, 2009**). Ils constituent en fait une importante famille d'antioxydants dans les fruits et les légumes puisqu'elle comprend plus de six mille molécules. (**Pincemail et al., 2007**).

L'alimentation fournit environ 1 g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et en jus de fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales (**Murat, 2009**). Ce sont des phytomicronutriments et ce sont généralement des pigments, responsables des teintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge) (**Edeas, 2007**).

Les polyphénols peuvent se regrouper en plusieurs catégories : les acides phénoliques, les tanins (obtenus par polymérisation des flavonoïdes); les lignanes et stilbènes, et les

flavonoïdes (flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols) (**Edeas, 2007**).

Les antioxydants représentés par la famille des flavonoïdes, sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques telles antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-carcinogènes (**Perveen et al., 2013**).

Les flavonoïdes des agrumes pourraient être efficaces contre l'hyperlipidémie. Le citron et la lime renferment différents types de flavonoïdes. Ces composés permettent, entre autres, de neutraliser les radicaux libres du corps et, ainsi de prévenir l'apparition des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies chroniques (**Suleria et al., 2012**).

Les principaux flavonoïdes contenus dans le citron et la lime sont l'ériocitrine et l'hésperétine. Des expériences menées sur des animaux ont démontré que ces deux composés, extraits de l'écorce (peau) du citron ou de son jus, pouvaient diminuer ou prévenir l'augmentation des dommages liés au stress oxydatif (**Gorinstein et al., 2004**).

Les flavonoïdes et les limonoïdes des agrumes et de leurs jus pourraient aussi avoir un effet hypocholestérolémiant. Des études réalisées chez l'animal ont démontré que certains d'entre eux abaissaient le cholestérol sanguin (**Boshtam et al., 2010 ; Kurowska et al., 2000**).

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré qu'un apport régulier en flavonoïdes provenant d'agrumes est associé à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires (**Benavente-Garcia & Castillo, 2008**). Les flavonoïdes contribueraient à améliorer la vasodilatation coronarienne, à diminuer l'agrégation des plaquettes sanguines et à prévenir l'oxydation des LDL.

Les flavonoïdes, des composés antioxydants contenus dans les agrumes, ont démontré qu'ils pouvaient ralentir la prolifération de plusieurs lignées de cellules cancéreuses (**Poulose et al., 2005 ; Benavente-Garcia & Castillo, 2008**) et diminuer la croissance des métastases (**Kunimasa et al., 2010**).

D'autres composés contenus dans les agrumes (les limonoïdes) ont également démontré des effets anti cancer in vitro ou sur des modèles animaux. Ils pourraient diminuer la prolifération de cellules cancéreuses du sein, de l'estomac, du poumon, de la bouche et du côlon (**Tanaka et al., 2000**).

Le citron jaune, appelé aussi lime, est un agrume. C'est le fruit du limettier, arbuste de la famille des Rutacées. Les principaux flavonoïdes contenus dans le citron vert sont l'ériocitrine et l'hésperétine (**Minato et al., 2003**).

Des expériences menées sur des animaux ont démontré que l'ériocitrine et l'hespérétine, extraits de l'écorce (peau) du citron ou de son jus, pouvaient diminuer ou prévenir l'augmentation des dommages reliés au stress oxydatif (**Minato et al., 2003**).

Il existe plusieurs méthodes sur le potentiel antioxydant, bien que certains chercheurs rapportent de façon ponctuelle l'usage de méthodes cellulaires, la majorité des tests de potentiel antioxydant rapportés sont de nature strictement chimique. Ces méthodes ne sont pas mauvaises pour autant, au contraire elles demeurent importantes pour la caractérisation approfondie du **potentiel antioxydant**.

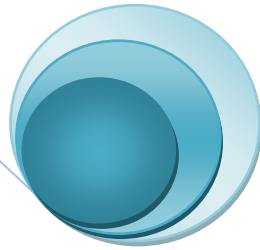
Pour cela nous nous somme fixés:

- sur la composition des écorces d'agrumes essentiellement le citron jaune
- De mettre en évidence le pouvoir antioxydant d'un extrait d'écorce de citron jaune

Différents dosages effectués *in-vitro*, à savoir :

- Les polyphénols totaux
- Le radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Avant de présenter les résultats, une revue bibliographique succincte est réalisée sur les antioxydants, les flavonoïdes, et l'effet des polyphénols sur la santé.



**REVUE**

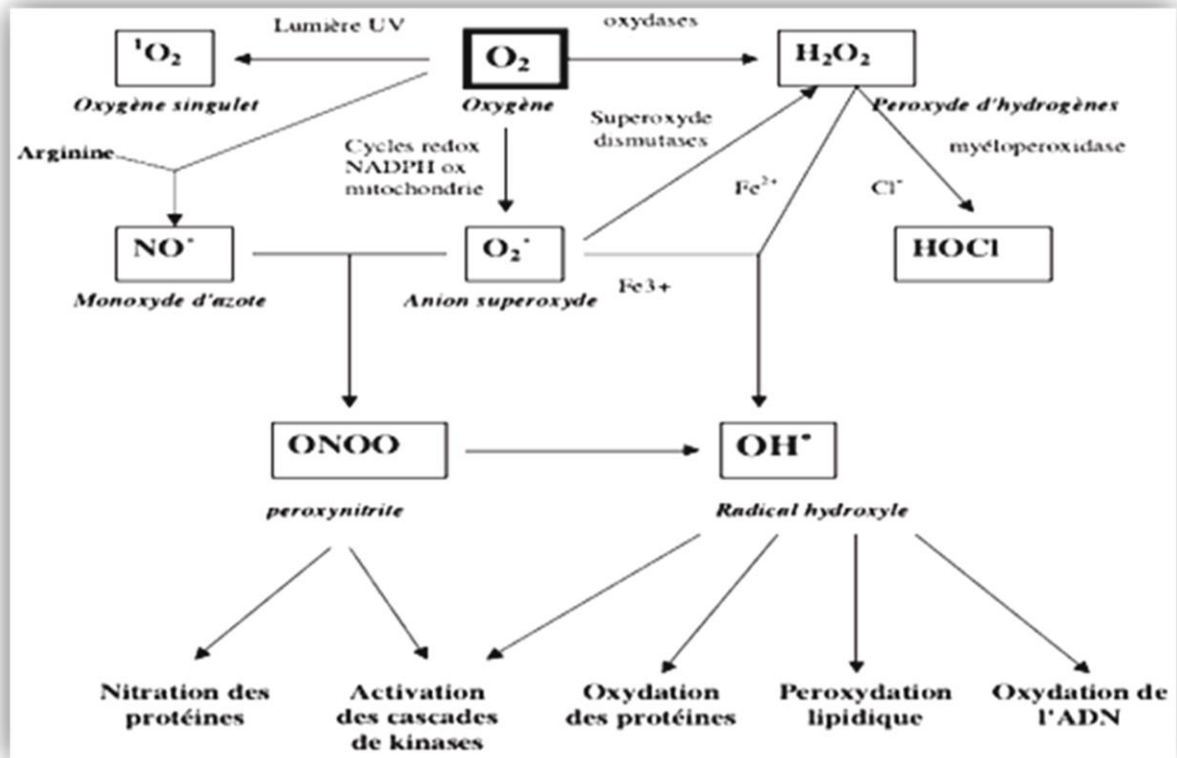
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Stress oxydatif et les Radicaux libres :

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (**Bloomer *et al.*, 2009**). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants. L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (**Nieman *et al.*, 2010**).

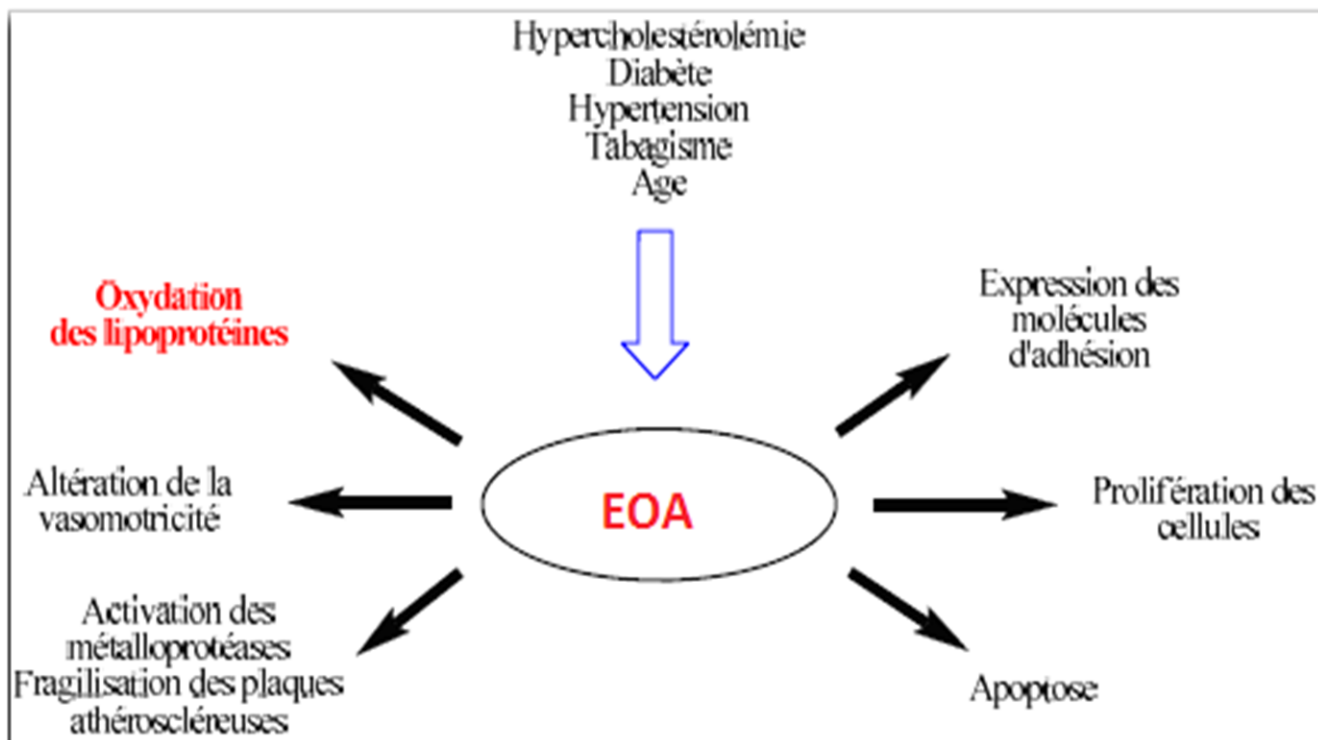
Les radicaux libres sont des molécules instables de notre métabolisme qui font partie des espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites lors de la réduction de l'O<sub>2</sub> en eau. Les ERO primaires sont principalement l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le radical hydroxyle (OH). Les radicaux libres et les autres ERO sont pour la plupart piégés et transformés en substances inactives par des systèmes antiradicalaires et antioxydants. Cette ligne de défense de l'organisme est constituée d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, glutathion transférase) et d'antioxydants, piègeurs de radicaux libres (**Lamprecht *et al.*, 2009**).

Les radicaux libres et le stress oxydatif sont impliqués dans les mécanismes pathogènes des MCV (**Defraigne & Pincemail, 2008 ; Haleng *et al.*, 2007**). L'hypercholestérolémie représente un facteur de risque dans la progression de l'athérosclérose (**Dimitrova-Sumkovska *et al.*, 2006**), engendrant des complications cardiovasculaires ainsi, en conjonction avec le stress oxydatif joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose (**Yhirga, 2006**).



**Fig. 1.** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

Plusieurs études (Halliwell & Gutteridge, 2007 ; Favier, 2003) ont bien montré le rôle des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives dans la genèse de nombreuses maladies. En effet, la production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Sanz & Fayad, 2008).



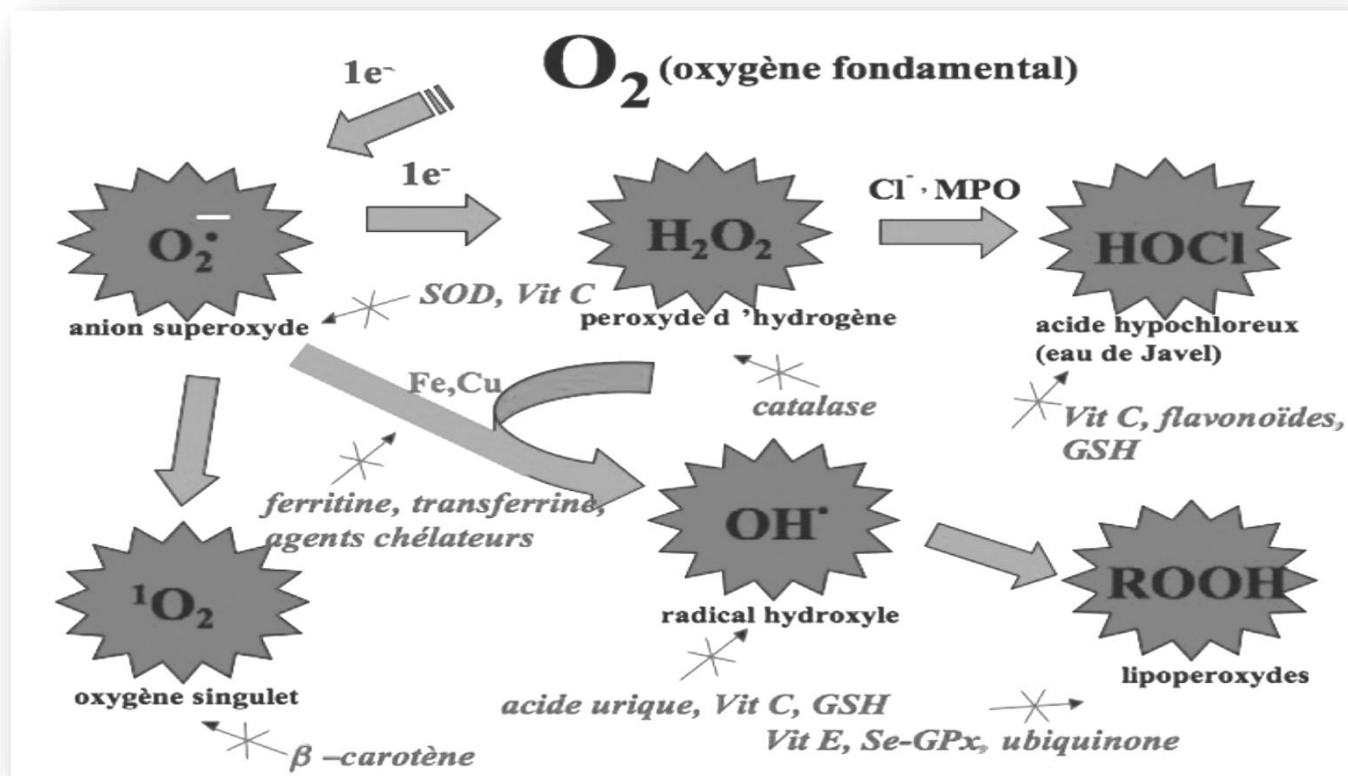
**Fig. 2.** Rôle des espèces oxygénées activées (EOA) dans les cellules  
(Gardès-Albert *et al.*, 2003)

## 2. Défense antioxydante

L'alimentation apporte une grande variété d'antioxydants jouant un rôle important comme facteur protecteur de la santé. Plusieurs études suggèrent que les antioxydants réduisent les risques de maladies chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires, certains cancers ou les diabètes type 2 (Scalbert *et al.*, 2005). Ainsi l'apport de composés à activité antioxydante dans les aliments n'a plus pour seul objectif de préserver les qualités sensorielles du produit, mais également de renforcer sa valeur nutritionnelle.

Un antioxydant peut être défini comme une substance qui, lorsqu'elle est présente à des concentrations faibles comparées à celle d'un substrat oxydable, empêche ou retarde de manière significative une oxydation du substrat (Halliwell, 2008).

Pour se protéger des effets délétères des EOA, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes (Haleng *et al.*, 2007) (Fig. 3). Plusieurs lignes de défense sont mises à la disposition de l'organisme et agissent de manière synergique. En effet, si les antioxydants s'avèrent puissants lorsqu'ils sont utilisés de manière individuelle, ils le sont bien davantage encore s'ils sont regroupés.



**Fig. 3.** Les différentes espèces oxygénées activées (EOA) et les antioxydants régulateurs de leur production (Haleng *et al.*, 2007)

- *Les systèmes enzymatiques* : les principaux sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GSH-Px) et la glutathion réductase (GSH-Red) (Garrel *et al.*, 2007). Ces enzymes sont produites par nos propres cellules, spécifiquement pour enrayer les radicaux libres qui s'y attaquent. Les enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, la thioredoxine réductase ou la thioredoxine peroxydase utilisent pour la plupart d'entre elles, le NADPH comme donneur d'équivalent réducteur, et constituent avec la glutathion la plaque tournante de la défense antioxydante.
- *Les «piégeurs»* : Ils agissent principalement à l'extérieur des cellules. Ces molécules produites par le corps, donnent des électrons pour neutraliser les radicaux libres (acide urique par exemple).
- *Les antioxydants exogènes* : Ils sont apportés par l'alimentation, et agissent en piégeant les radicaux et en captant les électrons célibataires, les transformant en molécules ou ions stables (Kinsky, 1989). En font partie, entre autres, les polyphénols, les caroténoïdes, le zinc, le sélénium, ainsi que les vitamines A, B6, C et E (Zablocka & Janusz, 2008 ; Hamilton, 2007)

**Tableau 1.** Antioxydants et marqueurs d'oxydation (Haleng *et al.*, 2007).

<b>Mode d'action et intérêt du dosage</b>	
<b>Antioxydants</b>	
Vitamine C	- Piégeur de radicaux libres , marqueurs de la consommation de fruits - Valeur plasmatique basse associée avec l'apparition de diverses pathologies
$\alpha$ - tocophérol	- Inhibiteur de la peroxydation lipidique - Action de synergie avec la vitamine C (rapport idéal de concentration)
$\gamma$ - tocophérol	- Valeur plasmatique basse plus prédictive que l' $\alpha$ -tocophérol dans la survenue de pathologies cardiovasculaires et de cancer de la prostate
Vitamine A	- Piégeur de radicaux libres - Implication dans la vision
$\beta$ - carotène	- Piégeur de radicaux libres - Implication dans la vision - Marqueur de la consommation de légumes piégeur de l'oxygène singulet (photoprotecteur) - Inhibition à forte concentration de mécanismes physiologiques de défense
Glutathion réduit (GSH) Glutathion oxydé (GSSG) Rapport GSH/GSSG	- Marqueur de la présence d'un stress oxydant action de synergie avec la vitamine C et l' $\alpha$ -tocophérol
Acide urique	- Marqueur de la présence d'un stress oxydant - Action de synergie avec la vitamine C et l' $\alpha$ -tocophérol
Vitamines B <sub>6</sub> , B <sub>9</sub> et B <sub>12</sub>	- Régulatrices de la concentration plasmatique en homocystéine - Implication dans la synthèse de l'ubiquinone
Superoxyde dismutase (SOD)	- Elimination de l'anion superoxyde
Glutathion peroxydase (GPx)	- Elimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques - Reflet d'une adaptation au stress oxydant
<b>Oligoéléments</b>	
Sélénium	- Cofacteur des différentes GPx - Rôle dans l'immunité
Cuivre	- Cofacteur de la SOD - Facteur prooxydant à forte concentration
Zinc	- Cofacteur de la SOD - Inhibe les réactions d'oxydation induites par le cuivre-rôle dans l'immunité
Rapport Cu/Zn	- Marqueur de la présence d'un stress oxydant - Corrélation positive avec le taux plasmatique de peroxydes lipidiques
<b>Marqueurs de l'oxydation</b>	
Peroxydes lipidiques	- Marqueur des dommages oxydatifs au niveau des lipides - Implication dans le développement de l'athérosclérose
LDL oxydées	- Facteur de risque cardiovasculaire - LDL petites et denses plus susceptibles à l'oxydation
Isoprostanes	- Marqueur spécifique de la peroxydation lipidique
<b>Sources d'oxydation</b>	
Fer libre	- Fer toxique conduisant à une augmentation accrue de radicaux libres
Fer sérique	- Surcharge en fer
Ferritine Homocystéine	- Facteur de risque cardiovasculaire indépendant du cholestérol - Contribue à l'oxydation des LDL

### 3. Les antioxydants naturels d'origine végétale

#### 3.1. Les composés polyphénoliques

Les polyphénols, également connus sous le nom de « composés phénoliques » (Hennebelle et *al.*, 2004) ou hydroxyphénols, sont une classe structurale de produits chimiques organiques principalement naturels mais également synthétiques ou semi-synthétiques, caractérisés par la présence de multiples unités structurales phénoliques. Le nombre et les caractéristiques de ces structures de phénol (fig.4) sont à la base des propriétés physiques, chimiques et biologiques (métaboliques, toxiques, thérapeutiques, etc.) de certains membres de la classe (Srivastava & Mishra, 2015).

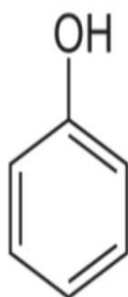


Fig.4. Structure chimique du phénol (Sobiesiak, 2017)

Les polyphénols sont des antioxydants puissants qui complètent et ajoutent aux fonctions des vitamines l'effet antioxydant ainsi qu'aux enzymes et cela en améliorant la défense de ceux-ci contre le stress oxydatif causé par l'excès d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Tsao, 2010). Ils participent aussi aux réactions de défense face à différents stress biotique (agents pathogènes, blessures, symbiose) abiotiques (lumière, rayonnements ultraviolets, faible température, carences). Ces composés contribuent à la qualité organoleptiques des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (Boubekri, 2014).

#### 3.2. Les principales sources alimentaires des polyphénols

Les polyphénols sont des micronutriments abondants dans l'alimentation humaine. Les principales sources alimentaires de ces composés phénoliques sont : les fruits et les légumes, les céréales, les graines oléagineuses, les légumes secs. Les fruits tels que pommes, les poires, les cerises les raisins, les cerises et les baies contiennent jusqu'à 200 à 300mg de polyphénols par 100g de poids frais (Srivastava & Mishra, 2015).

### 3.3. Classification des polyphénols

Bien que les polyphénols soient chimiquement caractérisés en tant que composés ayant des caractéristiques structurales phénoliques, ce groupe de produits naturels est très diversifié et contient plusieurs sous-groupes de composés phénoliques (Tsao, 2010). Trois grandes classes sont distinguées et suscitent un intérêt particulier grâce à leurs propriétés fortes intéressantes dans les domaines agroalimentaire, cosmétique, et pharmaceutique, à savoir les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins condensés.

#### 3.3.1. Les acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxyle et un hydroxyle phénolique. On distingue deux sous classes des acides phénoliques (Thompson & Mottola, 1984) :

➤ Les acides hydroxybenzoïques : Ce sont les dérivés de l'acide benzoïque. Ce groupe présente une structure commune pour tous ces dérivés en (C6-C1). Ces acides sont particulièrement bien représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes. La variation des formes de ces acides est due à l'hydroxylation et à la méthylation du cycle aromatique, dont les principaux composés sont l'acide gallique hydroxybenzoïque, vanillique et l'acide salicylique (Afanas'ev et al., 1989).

➤ Les acides hydroxycinnamiques : ils possèdent une structure de base (C6-C3), dont dérivent également l'acide cinnamique. Ils sont généralement combinés à d'autres molécules de la plante comme les protéines, la cellulose ou les lignines, ou sous forme d'esters avec le glucose ou les acides quiniques, tartriques et malique (Thompson & Mottola, 1984).

#### 3.3.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent la majorité des composés phénoliques qui sont caractérisés par leur faible poids moléculaire. Plus de 4000 flavonoïdes sont responsables de la pigmentation des plantes, comme les anthocyanosides donnant la coloration rouge et les flavonols qui ont la couleur jaune (Korkina & Afanas'ev, 1997).

#### 3.3.3. Les tanins

Les tanins sont divisés en deux groupes :

➤ Tanins hydrolysables : ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique.

➤ Tanins condensés : ou proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavanes reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6. En raison de leur complexation avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de

l'astringence caractéristiques des fruits avant maturité et de l'amertume du chocolat (Afanas'ev *et al.*, 1989)

### 3.4. Biodisponibilité des polyphénols

Généralement, les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle ; cependant, la plupart des polyphénols sont présents dans les aliments sous la forme d'esters, de glycosides ou de polymères qui ne peuvent pas être absorbés sous forme native (Pandey & Rizvi 2009). Ces substances doivent être hydrolysées par des enzymes intestinales ou par la microflore du colon avant qu'elles puissent être absorbées. Lorsque la flore est déficitaire, l'efficacité de l'absorption est souvent réduite car la flore dégrade également les aglycones qu'elle libère et produit divers acides aromatiques simples dans le processus (Manach, 2004). Au cours de l'absorption réalisée, les polyphénols sont conjugués dans l'intestin grêle et plus tard dans le foie. Ce processus comprend principalement la méthylation, la sulfatation et la glucuronidation (Pandey & Rizvi, 2009). L'accumulation des polyphénols dans les tissus est la phase la plus importante du métabolisme des polyphénols car c'est la concentration qui est biologiquement active pour exercer les effets des polyphénols. L'excrétion des polyphénols avec leurs dérivés se fait par l'urine et la bile.

### 3.5. Effets biologiques des polyphénols

Des études épidémiologiques ont montré à plusieurs reprises une association inverse entre les maladies chroniques humaines et la consommation d'aliments riches en composés polyphénoliques . Dans le corps humain, les polyphénols sont des antioxydants et ont des propriétés biologiques diverses comme, anti-inflammatoire, cardioprotectrice, ostéoprotectrice, neuroprotecteur, protection cérébrovasculaire ( Ganesan & Baojun, 2017).

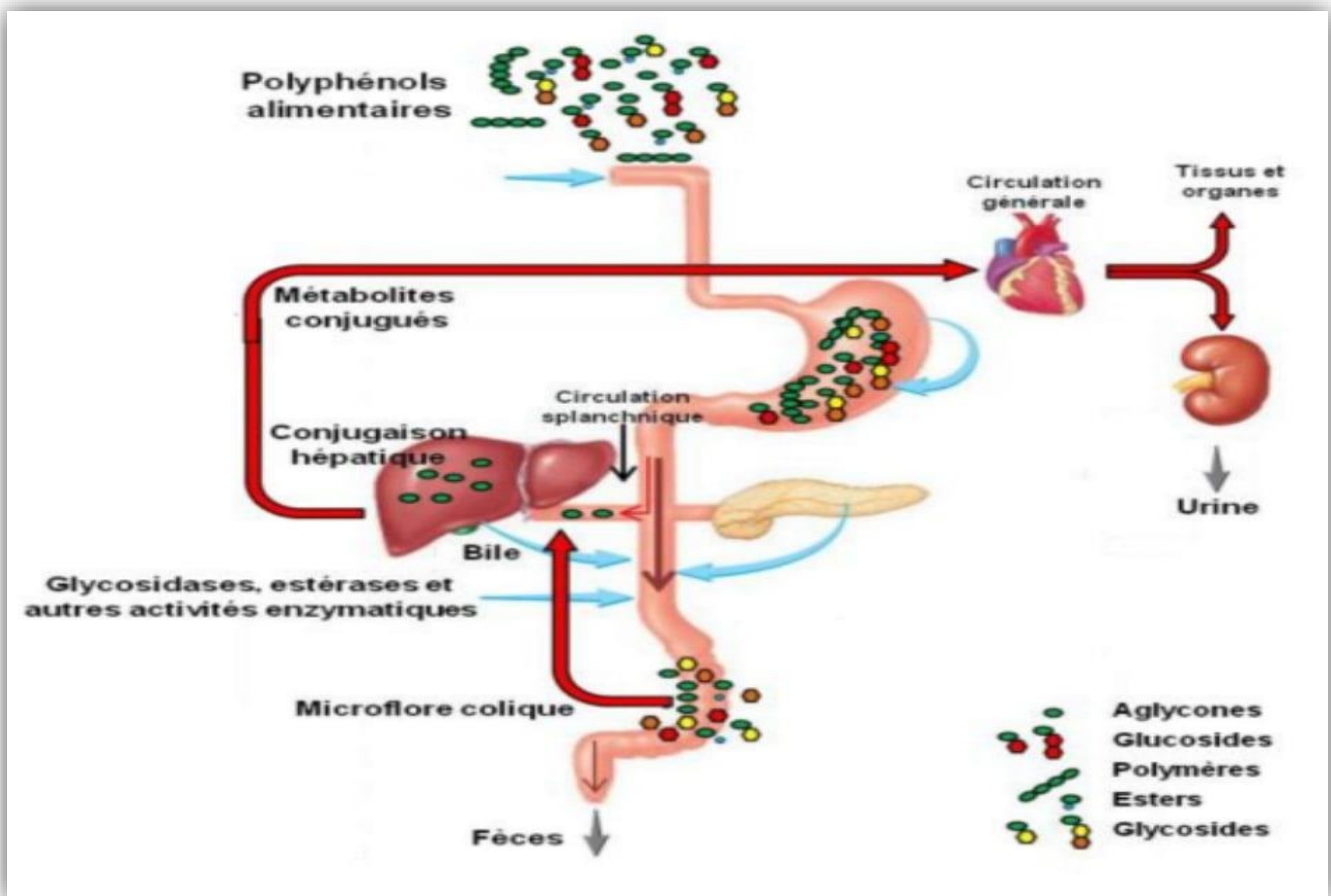


Fig.5. Schéma général du métabolisme des polyphénols (Allouche, 2012)

### 3.5.1. Effet anti oxydant

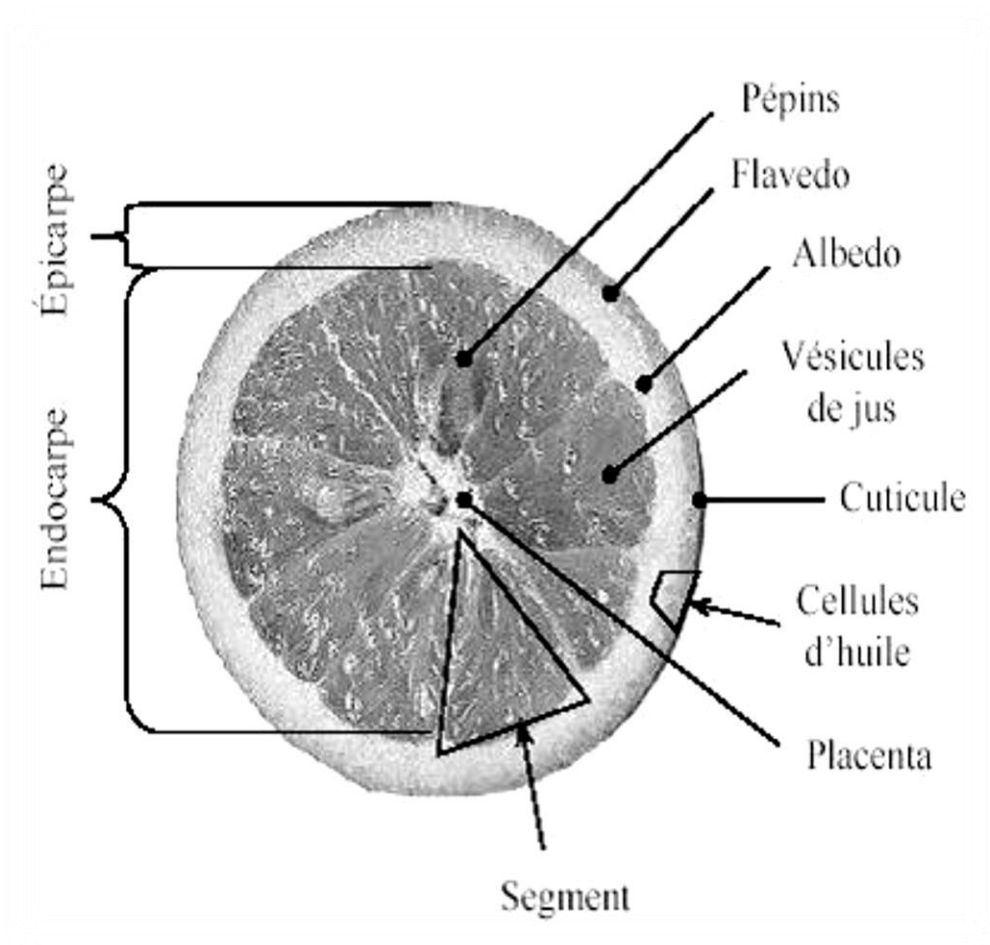
Les polyphénols sont des agents réducteurs, ayant la capacité de ralentir ou de prévenir l'oxydation d'autres molécules. Les groupes phénoliques dans les polyphénols peuvent accepter un électron pour former des radicaux phénoxylés relativement stables, perturbant ainsi les réactions d'oxydation en chaîne dans les composants cellulaires (Landete, 2012).

**Tableau 2.** Propriétés biologiques des polyphénols et effets sur la santé  
(Morand & Milenkovic, 2012).

Polyphénols	Activités biologique	Auteurs
<i>Acides phénols</i>	Antibactériennes, antiulcéreuses, antiparasitaires, antifongique, antioxydantes	(Gurbuz <i>et al.</i> , 2009)
<i>Coumarines</i>	Protectrices vasculaires, anti-inflammatoires, antioxydantes, antiparasitaires, analgésiques et anti-œdémateuses	(Smyth T <i>et al.</i> , 2009)
<i>Flavonoïdes</i>	Antitumorales, antiparasitaires, vasodilatatrices, antibactériennes, anti carcinogène, anti- inflammatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétique, ostéogène, antioxydantes, antiathérogènes, antithrombotiques, anti-allergique.	(Tripoli <i>et al.</i> , 2007)
<i>Anthocyanes</i>	Protectrices capillaro-veineux, antioxydant	(Bruneton, 1993)
<i>Proanthocyanidines</i>	Effets stabilisant sur le collagène, antioxydantes, antitumorales, antifongiques, anti-inflammatoires	(Masquelier <i>et al.</i> , 1979)
<i>Tannins galliques et catéchiques</i>	Antioxydantes	(Kubata <i>et al.</i> , 2005)
<i>Saponines</i>	Antioxydantes, anti-inflammatoires, analgésiques	(Kim <i>et al.</i> , 2009)

#### 4- Effets des agrumes sur le stress oxydant et le statut antioxydant

Le genre *Citrus* renferme la plupart des agrumes cultivés pour leurs fruits ou leurs huiles essentielles. Certaines études répartissent ces agrumes dans 3 grands groupes en fonction des similarités génétiques. Il s'agit du groupe des orangers et mandariniers, du groupe des pomélos et pamplemoussières et du groupe des limes et citronniers (**González-Molina et al., 2010 ; Luro et al., 2001**).



**Fig. 6.** Caractéristiques morphologiques d'un *Citrus* (**Barboni, 2010**).

**Tableau 3.** Composition moyenne de quelques agrumes (pour 100g de fruits)(Souci *et al.*, 2008).

	<i>Citron</i>	<i>Clémentine</i>	<i>Orange</i>	<i>Mandarine</i>	<i>Pamplemousse</i>	
<b>Composants (g)</b>	<i>Glucides</i>	3,16	10,4	9,00	10,1	7,41
	<i>Protides</i>	0,90	0,70	1,00	0,70	0,60
	<i>Lipides</i>	0,40	0,20	0,20	0,30	0,15
	<i>Eau</i>	88,5	86,9	86,3	86,5	88,5
	<i>Fibres alimentaires</i>	2,10	1,40	1,80	1,70	1,60
<b>Minéraux (mg)</b>	<i>Phosphore</i>	18,00	15,00	14,00	20,00	16
	<i>Calcium</i>	25,00	26,00	40,00	33,00	24
	<i>Magnésium</i>	16,00	11,00	10,00	11,00	9,60
	<i>Sodium</i>	4,000	3,000	1,000	1,100	1,10
	<i>Fer</i>	0,500	0,350	0,120	0,300	0,66
	<i>Cuivre</i>	0,090	0,030	0,050	0,056	0,037
	<i>Zinc</i>	0,100	0,100	0,070	0,063	0,066
	<i>Manganèse</i>	0,030	0,040	0,040	0,037	0,026
	<i>Nickel</i>	0,020	0,003	0,017	0,003	0,007
<b>Vitamines (mg)</b>	<i>Vitamine C</i>	52,00	41,00	53,00	30,00	44,00
	<i>Provitamine A</i>	0,011	0,300	0,120	0,105	0,077
	<i>Vitamine B1</i>	0,050	0,080	0,090	0,060	0,048
	<i>Vitamine B2</i>	0,020	0,040	0,040	0,030	0,024
	<i>Vitamine B3 ou PP</i>	0,200	0,300	0,280	/	/
	<i>Vitamine B5</i>	0,230	0,200	0,300	/	0,250
	<i>Vitamine B6</i>	0,070	0,040	0,060	0,023	0,028
	<i>Vitamine B8</i>	0,005	0,001	0,002	0,004	0,003
	<i>Vitamine B9</i>	0,009	0,026	0,030	0,070	0,011
	<i>Vitamine E</i>	0,800	0,550	0,240	0,320	0,297
<i>Apport énergétique (Kcal)</i>	29,00	46,00	45,00	46,00	38,00	

Actuellement, la production mondiale d'agrumes est de l'ordre de 122 millions de tonnes. C'est la deuxième production fruitière derrière le groupe des bananes et plantains (125 millions de tonnes) (**Loeillet, 2010**). Les productions d'agrumes sont réparties en 3 groupes par la FAO (Food agriculture organisation). Il s'agit du groupe des oranges, celui des pamplemousses et pomélos et du groupe des citrons et limes. Les citrons constituent 10% de la production des agrumes.

Le programme Algérien de développement des agrumes occupe une place prépondérante dans la nouvelle politique agricole du pays, considérant les vocations pédoclimatiques des différentes zones agricoles Algériennes. L'Algérie possède une collection variétale composée de 178 variétés d'agrumes constituant un patrimoine génétique inestimable. L'agrumiculture occupe une superficie de 65 000 ha, dont 55 000 réservés à la production. La production agrumicole est constituée à 72% d'oranges, 16% de clémentines, 7% de citrons et 4% de mandarines. Les autres variétés (pomelos, pamplemousse, etc.) étant estimées à 1% de la production globale (**Kerboua et al., 2001**).

En Algérie, les composés phénoliques dérivant d'agrumes ont suscité ces dernières années un vif intérêt due à la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leurs implications probables dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant (**Merghem, 2011 ; Treki, 2009 ; Benkiniouar, 2007 ; Merghem, 2000**). Largement distribués dans le règne végétal et abondants dans nos régimes alimentaires, les composés phénoliques sont aujourd'hui les composés phytochimiques les plus étudiés (**Rock & Fardet, 2014 ; Knežević et al., 2012**).

D'après **Hurtado-Fernandez et al., (2010)** beaucoup de travaux présentés par la communauté scientifique se sur:

- La structure chimique des phénols antioxydants dans les différents aliments végétaux, des plantes aromatiques et des matières végétales les plus diverses.
- Le rôle probable des composés phénoliques dans la prévention de diverses maladies associées aux stress oxydatifs telles que les maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives et le cancer.
- La capacité de certaines catégories de composés phénoliques particulièrement les flavonoïdes de se lier aux protéines.

La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit l'incidence de nombreuses pathologies, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et le diabète (**Hanhineva, 2010**). Cela peut être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies.

Les polyphénols sont en effet capables d'abaisser la pression artérielle chez le rat, d'empêcher l'oxydation des LDL (lipoprotéines de faible densité), d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses, d'empêcher l'agrégation plaquettaire et de stabiliser les cellules immunitaires (**Martin & Andrantsitohaina, 2002**). Ils ont été décrits comme étant des antioxydants, des anti-agrégants plaquettaires, des anti-inflammatoires, des anti-allergènes, des anti-thrombotiques et des antitumoraux (**Hanhineva, 2010**). Ils ont été décrits comme neuroprotecteurs, antiviral, chimio préventive, et plus d'arguments indiquent que les polyphénols ont une influence sur le métabolisme lipidique et glucidique (**Hanhineva, 2010 ; Ghosh & Scheepens, 2009**).

Les agrumes sont la principale source de flavonoïdes pour l'homme. Les flavonoïdes représentent la plus grande classe de composés polyphénoliques dérivés de citron (**Gattuso et al., 2007**). Les flavanones (hespéridine, naringine) sont une sous-classe des flavonoïdes, ils sont le plus souvent liés à des glucosides et sont rarement libres (aglycones). L'hespéridine et la naringine sont des glycosides flavanones, composés d'une aglycone, l'hespéretine et la naringénine respectivement, lié à un disaccharide, le rutinose. L'hespéridine est l'hespéretine 7-O- $\beta$ -rutinoside, et la naringine est la naringénine-7-rhamnoglucoside (**Huang et al., 2011**). L'hespéridine et la naringine ont été largement utilisées pour leurs propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Celles-ci ont été récemment utilisées pour la prévention de l'obésité, l'insulinorésistance et la dyslipidémie (**Akiyama et al., 2010 ; Miceli et al., 2007 ; Jung et al., 2006**).

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré qu'un apport régulier en flavonoïdes provenant d'agrumes notamment le citron est associé à une diminution du risque de maladies cardiovasculaires (**Yamada et al., 2011 ; Tounsi et al., 2011**). Les flavonoïdes contribueraient à améliorer la vasodilatation coronarienne, à diminuer l'agrégation des plaquettes sanguines et à prévenir l'oxydation du « mauvais » cholestérol (LDL) (**Benavente-García & Castillo, 2008**).

Les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes, possèdent des propriétés très variées au niveau du système cardiovasculaire : action vasodilatatrice en favorisant la libération de NO à partir des cellules endothéliales, inhibition de la cyclooxygénase, de la

lipooxygénase et de l'agrégation plaquettaire (flavonols, cathéchines), diminution du cholestérol sanguin (isoflavones), et la régulation de l'expression de gènes (**Roberfroid, 2008**).

Les agrumes sont riches en fibres solubles, principalement en pectine, que l'on retrouve dans l'écorce et dans la membrane blanche autour de la chair (albédo). Par leur aptitude à diminuer le cholestérol sanguin, les fibres solubles contribuent à réduire l'incidence des maladies cardiovasculaires (**Coats, 1998**). Des chercheurs ont démontré que l'écorce de citron était efficace pour diminuer les taux de cholestérol sanguin et hépatique chez l'animal (**Terpstra et al., 2002**). De plus, la pectine du citron, comparée à celle de 3 autres agrumes (pamplemousse, tangerine et orange), présente la meilleure capacité d'inhiber la croissance de certaines tumeurs cancéreuses *in vitro* (**Patil & Chidambara Murthy, 2009**). Cependant, d'autres composés présents dans l'écorce du citron pourraient participer à ce processus.

## 5. Choix du matériel biologique

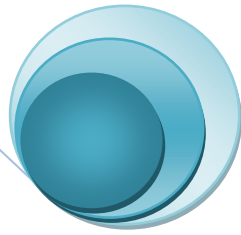
### 5.1. Matériel végétal

*Citrus limon* est une espèce de la famille des *Rutaceae*, génétiquement triploïde. Cet arbre fruitier est aussi appelé Limettier de Perse ou Limettier de Tahiti ou citrons jaune. Sa croissance est rapide, le citron est de forme oblongue ou ovoïde, jaune vif avec une écorce épaisse, Sa chair est acide et de couleur jaune pâle (**Tomer, 2010**). Dans les agrumes, les caroténoïdes sont les pigments responsables de la coloration externe et interne du fruit. La composition et la concentration en caroténoïdes sont influencées par les conditions de culture, les origines géographiques et la maturité du fruit. Le citron contient principalement de la  $\beta$ -cryptoxanthine (de la famille des caroténoïdes) et de la chlorophylle responsables respectivement de la couleur jaune et verte du citron. Tout au long de la maturation du fruit, une dégradation des chlorophylles a été observée, ainsi qu'une augmentation de la  $\beta$ -cryptoxanthine (**Conesa, 2019**).

Le goût acide est dû à la présence d'acide citrique (**Tomer, 2010**). En effet, le citron a une forte concentration en acides organiques (6,01 g pour 100 g) (**Ciqual, 2020**), dont 5,90 g d'acide citrique. Les composés volatils majoritairement présents dans le jus sont principalement des monoterpènes, monoterpénoïdes et esters. Des sesquiterpènes ont été identifiés dans la pelure (**Cano-Lamadrid, 2018**). L' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène, le linalool et le limonène sont des terpènes caractéristiques du zeste de citron (**Guadayol, 2018**). Excellent pour la santé reconnue pour ses nombreux effets bénéfiques.

Il a été démontré que les extraits des citrons (agrumes) ont beaucoup d'effets sur le diabète et l'obésité. Par exemple, une amélioration de la fonction métabolique du foie est notée avec des extraits de mandarine (1% ou 3% du régime alimentaire). Ce extraits stimulent les enzymes antioxydantes, chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine (**Sugiura et al., 2006**). Par ailleurs, la consommation d'extrait (1% ou 3% du régime alimentaire) de *Citrus* pendant 10 semaines chez des rats diabétiques (type 2) Goto-Kakizaki améliore la tolérance au glucose (**Sugiura et al., 2006b**). **Park et al., (2013)** ont révélés un effet hypoglycémiant de l'extrait du zeste de citron (*Citrus*) (2g/100g d'aliment) chez des souris mâle transgénique diabétique et obèse /KsJ-db/db, cet effet semble être partiellement expliqué par l'inhibition de l'expression de l'activité hépatique de la gluconéogène phosphoénol pyruvate carboxykinase, de l'ARNm et par une induction de la sécrétion de l'insuline et du glucagon. Cet extrait affiche également une diminution significative du gain de poids et de la masse grasse, de la stéatose hépatique, de l'hypertriglycéridémie en inhibant l'expression génique, et inversement ; augmentant l'activation des enzymes antioxydantes et de la lipogenèse au niveau hépatique (**Park et al., 2013**).

Elle est utilisée comme agent antibactérien et lutte contre les infections (**Economos & Clay, 1999**), contre les troubles respiratoires, destinés à traiter les cicatrices. Ses propriétés désinfectantes permettent de nettoyer les coupures et blessures et protègent la peau. Ses propriétés antioxydantes peuvent aider à lutter contre les dommages des radicaux libres. D'autres propriétés thérapeutiques existent : elle est antimicrobienne, antifongique, anti-allergique et anti-inflammatoire (**Kummer et al., 2013 ; Jazet-Dongmo et al., 2002 ; Choi et al., 2000**). Aussi il a de multiples usages en cuisine, non seulement le citron assaisonne bien de nombreux plats, mais encore, il surclasse les vinaigres pour les dyspeptiques. Il leur permet de mieux digérer les crudités. On l'utilise Le zeste du citron pour parfumer la pâtisserie, les pains, les gâteaux, les boissons. Il peut aussi être employé en cuisine pour parfumer les plats, car Il contient les huiles essentielles du citron. Les citrons permettent de réaliser d'excellentes confitures, soit seuls, soit associés à d'autres fruits. En jus pour les marinades de poissons crus (thon, saumon, sardine...), mélangé à l'huile d'olive et au persil haché sur les poissons, en tarte meringuée, en fins quartiers pelés à vif dans les salades (fruits ou légumes), dans les sauces de salade. Additionné d'eau et de sucre, il compose la citronnade : une boisson rafraîchissante, de plus, on peut congeler le jus de citron, par exemple dans un bac à glaçons.



**MATERIELS**

**&**

**METHODES**



## 1. Description et choix de la variété Citron jaune

Le citron (ou citron jaune) est un agrume, fruit du citronnier (*Citrus limon*). Il existe sous deux formes : le citron doux, fruit décoratif de cultivars à jus peu ou pas acide néanmoins classé *Citrus limon* (L.) Burm. f.; et le citron acide, le plus commun de nos jours, dont le jus a un pH d'environ 2,5.

Ce fruit, mûr, a une écorce qui va du vert tendre au jaune éclatant sous l'action du froid. La maturité est en fin d'automne et début d'hiver dans l'hémisphère nord. Sa chair est juteuse, le citron acide est riche en vitamine C, ce qui lui vaut - avec sa conservation facile - d'avoir été diffusé sur toute la planète par les navigateurs qui l'utilisent pour prévenir le scorbut. De l'écorce qui contient entre autres substances du limonène et du citral.

La variété de citron retenue dans cette étude est très répandue dans la région centre-ouest algérienne (La plaine de la Mitidja). Il s'agit d'un fruit très apprécié en Algérie. Le citron jaune (*Citrus limon*, Rutaceae) a été acheté dans un marché local à Mostaganem (Algérie) au mois de mars 2022.



**Fig. 7.** *Citrus limon* (L.) Burm. f

### 1.1. Systématique de *Citrus limon*

Selon Cronquist, (1982), la classification qu'occupe *Citrus limon* dans la systématique est la suivante:

<b>Règne.....</b>	<b>Plantae</b>
<b>Sous-règne.....</b>	<b>Tracheobionta</b>
<b>Division.....</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Classe.....</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Sous-classe.....</b>	<b>Rosidae</b>
<b>Ordre.....</b>	<b>Sapindales</b>
<b>Famille .....</b>	<b>Rutaceae</b>
<b>Genre.....</b>	<b><i>Citrus</i></b>
<b>Espèce.....</b>	<b><i>Citrus limon</i></b>

### 1.2. Préparation de l'extrait de l'écorce de *Citrus jaune*

La partie extérieure de citron jaune est nettoyée, zeste est prélevé à partir de la peau en râpant la partie superficielle, ensuite les pelures obtenues sont séchées dans une étuve (Tau Steril Suc FinoMomasco, Italy) à 38°C pendant 24 heures, puis finement broyées et conservées à 4°C.

Le choix de cette variété se justifie par :

- Source de vitamine C et sa capacité à favoriser une bonne digestion grâce à sa concentration en acide citrique,
- Sa qualité gustative et nutritionnelle, son abondance au niveau du territoire national et sa facilité de conservation,

### 1.2.1. Calcul du rendement durant l'obtention de l'extrait de l'écorce de Citron jaune

Le rendement est calculé à partir de 100 g de matière première sèche (épicarpe de Citron) selon la méthode de **Ptichkina et al. (2008)** Ou il est donné selon l'expression suivante :

$$\text{Rd} = \text{M} / \text{M0} \cdot 100$$

Rd : rendement en pectine exprimé en %.

M : masse en gramme de poudre.

M0 : masse en gramme d'épicarpe de citron sèche.

<p><b>Le rendement en poudre de citron = <math>\frac{\text{Poids de la poudre obtenue}}{\text{Poids d'épicarpe}} \times 100</math></b></p>
--

## 2. EVALUATION DU POTENTIEL ANTIOXYDANT DU CITRON JAUNE

L'activité antioxydant d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, in vitro, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl picrylhydrazyle) (**Sharma Om & Bhat, 2009**).

### 2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT) de l'extrait de l'écorce de citron jaune

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires retrouvés dans la plupart des espèces végétales. Les flavonoïdes et les tanins. Parmi les méthodes de quantification des composés phénoliques nous utilisons dans notre laboratoire préférentiellement un protocole utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu , qui a été décrit par (**Wong et al., 2008**).

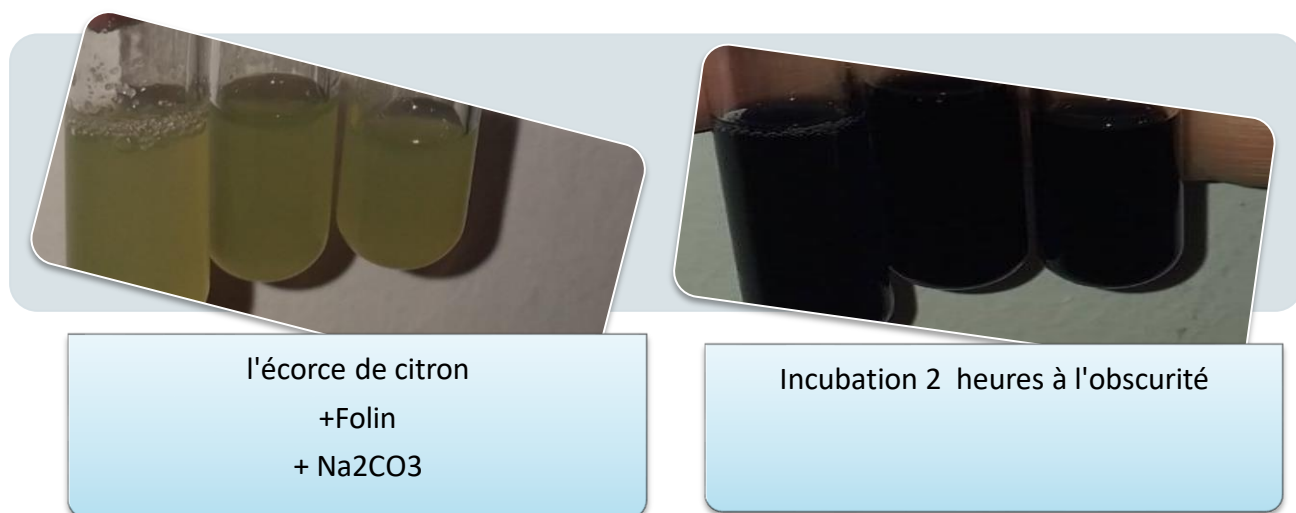
Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) (**Benamara et al., 2009**). Le dosage des polyphénols a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible à double faisceaux qui permet d'obtenir directement la densité optique des différentes concentrations préparées à partir de l'échantillon. Pour

s'assurer de la fiabilité des résultats, le dosage est réalisé en trois essais et la moyenne est retenue comme valeur. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Ghazi et Sahraoui, 2005**).

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu (W8O23).

#### **Mode préparatoire :**

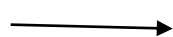
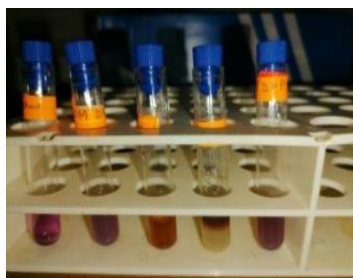
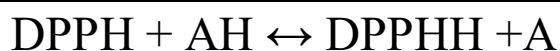
- Prélever 200 µl de notre échantillon dans les tubes à essai,
- Ajouter 1ml de réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois dans de l'eau distillé), puis agitation du mélange. Le garder à l'obscurité et à T° ambiante.
- Après 4mn, ajouter 800 µl de carbonate de Sodium (Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>) dilué dans 7,5% d'H<sub>2</sub>O, agiter le tube.
- Laisser incubé pendant 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. Dans les mêmes conditions un témoin est préparé en utilisant l'acide gallique. C'est la gamme d'étalonnage qui consiste à lire les absorbances des différentes concentrations (de 0 à 1000µg /ml) d'acide gallique avec 0,2 ml d'eau distillée à la place de l'extrait de l'écorce de Citron. C'est la solution mère à partir de laquelle nous avons préparé des dilutions filles.
- Le tout a été mis dans un agitateur de milieux et incubé à l'obscurité pendant une durée de 2 heures.
- La lecture de l'absorbance des différentes concentrations est faite contre un blanc à 765nm.
- Une gamme étalon est effectuée à partir d'une solution mère d'acide gallique à une concentration de 1 mg/ml. L'acide gallique est utilisé comme standard pour établir une courbe de référence.



**Fig.8.** Dosage des polyphénols totaux

## 2.2. Mesure de l'activité anti-radicalaire

La capacité de l'extrait de l'écorce de Citron jaune à capter les radicaux libres a été mesurée par le test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl qui est décrite par **Ammar et al., 2009**. La méthode de DPPH est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire, le DPPH-H. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H<sup>+</sup> (AH est un composé capable de céder un H<sup>+</sup> au radical DPPH).



Virement de la couleur lors du test DPPH

La réduction induit un changement de sa couleur violette en couleur jaune.

Le test au DPPH permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la CI 50 (concentration inhibitrice médiane) des substances antioxydantes contenues dans un extrait.

**Mode préparatoire:**

Selon la méthode décrite par **Bourgou et al.,(2008)**

- 1,5 ml de notre échantillon à différentes concentrations (0,5 ; 1 et 1,5mg/ml) sont mélangés avec 37,5 µl d'une solution méthanolique de DPPH (1,3 mg/ml).
- Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement, incubé pendant 60 mn à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre à 517nm.
- Tous les tests sont répétés trois fois.
- Les vitamines E et A sont des antioxydants de référence utilisés comme témoins positifs. L'activité antiradicalaire obtenue à partir de la poudre de dattes a été exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) du radical DPPH suivant l'équation :

$$PI \quad (\%) \quad = \quad \frac{[A \quad \text{blanc} - A \quad \text{échantillon}]}{[A \quad \text{blanc}]} \times 100$$

A blanc : *correspond à l'absorbance du contrôle négatif (méthanol)*

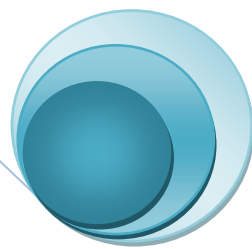
A échantillon : *correspond à l'absorbance de l'échantillon (poudre de datte).*

Ainsi, les résultats sont exprimés en concentration inhibitrice médiane (CI 50) qui est inversement liée à la capacité anti oxydante d'un composé.

La CI 50 exprime la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH. Plus la valeur de CI 50 est basse, plus l'activité anti oxydante d'un composé est élevée. Cependant, la concentration de la poudre de datte nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire est calculée en fonction des différents taux de sa substitution.

**4. Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés sous forme de M±ES de 3 essais par échantillon. Après analyse de variance, la comparaison des moyennes entre les différents échantillons est effectuée en utilisant le test 't' de Student (test 't' est significatif à **P<0,05**).



**RESULTATS**  
**&**  
**DISCUSSION**

### **1. Résultats de préparation des végétaux étudiés**

Nous avons utilisé 40 citrons, équivalent à 4 kg, nous l'avons bien lavé puis laissé sécher. Une fois le citron séché, nous le râpé, puis le met sur un chiffon blanc et l'exposons à l'air après qu'il ait partiellement séché. Faites chauffer le four et mettez-le de dans pour qu'il sèche complètement. Puis finement broyés à l'aide d'un broyeur électrique et conservés pour des analyses ultérieures



**Fig. 9 .** Les étapes de préparation la poudre de zeste de citron

## 2. EVALUATION DU POTENTIEL ANTIOXYDANT DU CITRON JAUNE

La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxylés phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2\cdot$ ).

Dans la présente étude, la capacité antioxydante est déterminée après le dosage des polyphénols totaux au niveau de l'extrait d'écorce de citron jaune. La méthode utilisée, est le radical libre 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle ( $\alpha,\alpha$ -diphényle- $\beta$ -picrylhydrazyle) DPPH•

### 2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)

La couleur bleu après 2h d'incubation confirme la présence des polyphénols qui ont réduit le réactif folin-ciocalteu. L'intensité de la couleur qui varie entre le bleu clair et le foncé est fonction de la teneur en polyphénols.

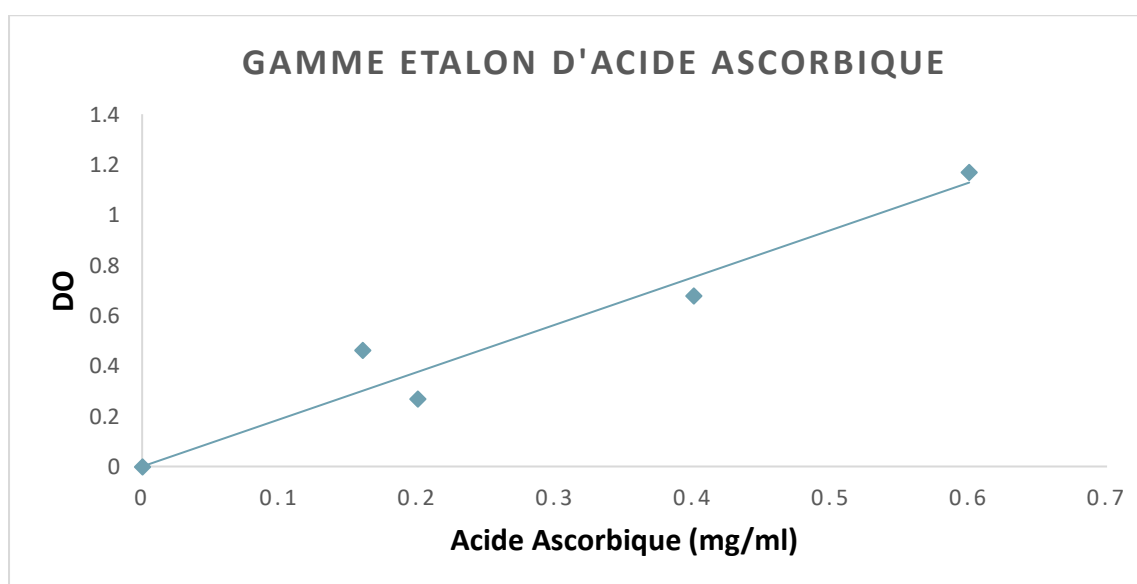


Les agrumes renferment des substrats dits composés phénoliques. Leurs teneurs varient selon les variétés, le taux de maturation et la culture. Le dosage des polyphénols totaux nous donne une estimation globale de la teneur en composés phénoliques contenus au niveau des extraits d'écorces d'agrumes. La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour les raisons suivantes ; (i) c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, (ii) la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée, (iii) la grande longueur d'onde (**765nm**) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, en plus c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (**Huang et al., 2005**).

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols car il réagit avec les acides aminés comme la tyrosine et le tryptophane. De telles interférences peuvent être négligées car ces acides aminés

aromatiques sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits (Boizot & Charpentier, 2006).

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été réalisée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Les résultats étaient lus sur spectrophotomètre à 765 nm, la concentration des polyphénols totaux d'extrait d'écorce de citron jaune est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage ( $y=0.236x$ ,  $R^2=0.94$ ) établie avec des concentrations croissantes en acide ascorbique (Fig.9). Elles sont exprimées en mg d'équivalents d'acide ascorbique par gramme de l'extrait.



**Fig.10.** La courbe d'étalonnage des polyphénols totaux réalisée à l'aide de l'acide ascorbique.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que l'écorce de citron vert est riche en composés phénoliques (90.13mg/100g) en comparant à l'acide gallique qui a été utilisé comme standard.

**Tableau 4.** Teneurs en polyphénols totaux d'extrait d'écorce de citron jaune

	<b>Polyphénols totaux (mg d'acide ascorbique/g d'écorce</b>	<b>Polyphénols totaux (mg d'acide ascorbique/100g d'écorce</b>
Extrait d'écorce de citron vert	0.901±0.002	90.13±0.002

La valeur représente la moyenne± écart type de 3 échantillons (n=3).

Selon **Rafaëla et al., 2010** l'ordre de classement des teneurs en polyphénols d'écorces d'agrumes montre des valeurs importantes au niveau de l'écorce de citron vert (124mg/100g) suivie par le citron jaune (87.77mg/100g), l'orange (79.75mg/100g), les pamplemousses et les mandarines. Si on compare les résultats du dosage avec ceux de la bibliographie, on constate que la teneur en polyphénols de l'extrait d'écorce de citron vert (90.13mg/100g) est inférieur par rapport à celle trouvée par **Rafaëla et al., 2010** (124mg/100g).

**Dhuique-Mayer, 2007** indique que l'orange est une importante source de vitamine C, minéraux,..., et contient également des composés phénolique, tanins et la teneur en vit C seule est d'environ (150 mg /100g) d'écorce. Par ailleurs, il est bien connu que l'activité antioxydante des agrumes pourrait être attribuée à leurs différences dans le contenu en composés phénolique (**Hassanien, 2008**).

En général, la partie externe la plus ensoleillée, a une teneur plus forte en minéraux, vitamines et polyphénols. Dans d'autre étude, le classement des écorces d'agrumes en fonction de leurs richesses en polyphénols (principalement les citroflavonoïdes) est similaire à celui de **Gorinstein, 2001** qui montre que les teneurs de ces composés sont plus élevés au niveau du citron ; la différence peut être due à la différence des variétés des agrumes disponibles dans chaque pays (en fonction de la culture, la maturation et l'ensoleillement). Des études très récentes ont montré que plus le contenu en polyphénols dans les fruits était important, plus grande était la capacité antioxydante totale de ces aliments (**Stratil et al., 2006**).

**Tableau 5.** Teneurs en polyphénols (mg/100g) de certains agrumes et leurs écorces  
(Gorinstein *et al.*, 2001)

Fruits	Polyphénols totaux
Citron	164
Écorce de citron	190
Orange	154
Ecorce d'orange	179
Pamplemousse	135
Ecorce de pamplemousse	155

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques, des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que des facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Khadri *et al.*, 2008 ; Kusznierewicz *et al.*, 2008).

Le citron jaune a une forte activité antioxydante. Le potentiel antioxydant d'extrait dépend non seulement de la concentration des polyphénols mais aussi de leur structure ; c'est le concept de la « structure-activité » (Downs *et al.*, 2003).

Selon Chen *et al.*, (2007) l'extrait qui possède les forts taux de polyphénols contient aussi des hautes teneurs en flavonoïdes.

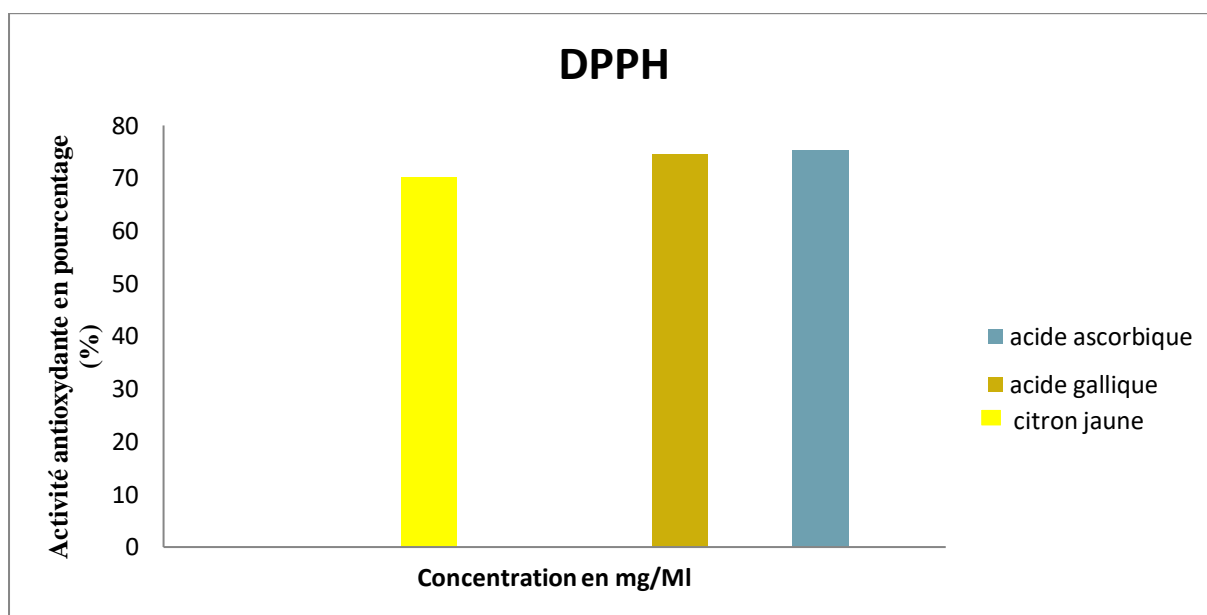
## 2.2. Effet scavenger du radical DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire d'extrait d'écorce d'agrumes, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrate) comme un radical libre relativement stable. Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrate : dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

Le tableau représente la capacité antioxydante, exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup>, de deux témoins positifs antioxydant, acide ascorbique et acide gallique, ainsi de l'extrait d'écorce de citron jaune.

**Tableau 6.** Effet scavenger d'extrait d'écorce de citron jaune et les standards vis –à vis du radical DPPH.

	Activité antioxydante en (%)
<b>Acide ascorbique</b>	75.17±0.003
<b>Acide gallique</b>	74.48±0.002
<b>Extrait d'écorce de citron jaune</b>	70.12±0.007

**Fig.11.** Effet scavenger d'extrait d'écorce de citron jaune et les standards vis –à vis du radical DPPH.

Chaque histogramme représente la moyenne  $\pm$ ES (n=3).

Les résultats de l'activité antiradicalaire exprimés en pourcentages (%) montrent que l'activité antioxydante d'écorce de citron jaune testés est de 70,12 % à une concentration de 1mg/mL de méthanol. En comparant l'échantillon avec les standards acide ascorbique (75,17) et acide gallique (74,48) les pourcentages de réduction du radicale DPPH' se rapprochent et les valeurs obtenues avoisinent 80 %.

La réduction de ce radical donne une coloration jaune pale selon la réaction suivante (Roginsky & dissi, 2005) :

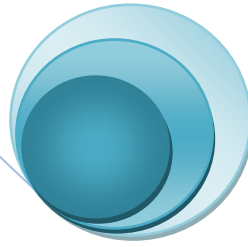


(AH) n : représente une molécule capable de réduire (céder un atome d'hydrogène au radical DPPH<sup>•</sup>) le radical DPPH<sup>•</sup> violet au DPPH-H (DPPH réduit) d'une couleur jaune pale. Ainsi la perte de couleur est rapide ce qui montre que le donneur de proton dans l'échantillon est considéré comme un antioxydant fort.

L'effet scavenger des écorces d'agrumes est fort probablement attribué à leur richesse en citroflavonoïdes principalement l'ériocitrine et l'hésperétine dans la lime. (Minato *et al.*, 2003).

En effet, les composés phénoliques est plus particulièrement les citroflavonoïdes sont reconnu comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène, l'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libre (R<sup>•</sup>) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle. Cette réaction donne naissance au radical aroxyl (FLO<sup>•</sup>) et à la molécule radicalaire rendue stable (RH), le (FLO<sup>•</sup>)Subira par la suite un réarrangement structural permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux aroxyle (Jovanovic *et al.*, 1994).

Par ailleurs, l'effet antioxydant /prooxydant des composés phénoliques est déterminé par leur concentration, le nombre et la position des groupements hydroxyles portés sur ces composés, le PH et la concentration des métaux de transition dans les milieux réactionnel (Simić *et al.*, 2007). Donc, Les dérivés phénoliques sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et plus particulièrement leurs propriétés piégeurs de radicaux libres.



# CONCLUSION

Les *Citrus* « agrumes » sont une source fiable des principes actifs connus pour son pouvoir antioxydant, et leurs propriétés thérapeutiques. Ces propriétés sont recherchées dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressées sur l'extraction des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydant (activité anti radicalaire à DPPH, contenus dans le citron). Ces couples d'activités biologiques ont été choisies pour leurs rôles primordiaux dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires et ses complications graves qui menacent la santé publique, et constituent la première cause de décès à travers le monde.

Ces résultats indiquent que le zeste de citron apparait comme un réservoir d'antioxydant susceptible d'être utilisés dans la lutte contre les radicaux libres.

Les résultats de cette étude nous permettent de conclure que le zeste des agrumes étudiés et leur mélange constitue une excellente source de différents antioxydants,

En perspectives, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur le zeste de Citrus, et de faire l'association d'Écorce de citron.

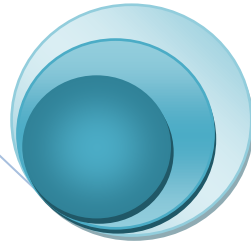
Ce travail nous a permis en premier lieu de maîtriser les plus simples techniques analytiques en passant de l'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale, la méthode d'extraction par macération en utilisant méthanol comme solvant d'extraction de écorce de citron.

-Les principaux résultats obtenus indiquent que, la teneur en polyphénols totaux est significativement supérieure dans les extraits de citron.

-L'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits analysés a été réalisé par la détermination de leur pouvoir de piégeage du radical du DPPH, les extraits de l'écorce de citron sont plus puissants.

Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques nutritionnelles afin de diminuer ou idéalement neutraliser les effets métaboliques, oxydatifs néfastes du cholestérol athérogénique. La consommation des protéines de sardine et du citron semble être une stratégie attrayante de lutte contre l'hypercholestérolémie.

Ces travaux ouvrent un certain nombre de perspectives et appellent un prolongement de certaines études afin de pouvoir approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques du Citron. Des études supplémentaires, notamment à long terme, sont nécessaires pour confirmer ce potentiel extrêmement intéressant des Citron et déterminer le ou les mécanisme(s) qui permettent cet effet préventif identifié dans la présente étude.



**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**



## A

- ❑ **Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. & Lomri A. (2007).** Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Rev rhum.* **74**:636-643.
- ❑ **Akiyama S., Katsumata S., Suzuki K., Ishimi Y., Wu J. & Uehara M. (2010).** Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr.* **46**: 87-92.
- ❑ **Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.** Table de composition nutritionnelle des aliments Ciqual 2020. Consultée
- ❑ **Anandan R. & Subramanian P. (2012).** Renal protective effect of hesperidin on gentamicin-induced acute nephrotoxicity in male Wistar albino rats. *Redox Rep.* **17(5)**: 219-226.
- ❑ **Assini J.M., Mulvihill E.E. & Huff M.W.(2013).** Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* **24(1)**:34-40.
- ❑ **Atkin M.A., Gasper A. & Ullegaddi R. (2005).** Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: response to antioxidants in vitro and to antioxidants supplementation. *Clin Chem.* **51(11)**: 2138-2144.

## B

- ❑ **Barros H.R., Ferreira T.A. & Genovese M.I. (2012).** Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chem.* **134(4)**:8-1892.
- ❑ **Baudin B. & Cohen A. (2009).** Données épidémiologiques des maladies cardiovasculaires et prise en charge des accidents cardiovasculaires. *Revue francophone des laboratoires.* **409(39)**:27-39.
- ❑ **Beaudeau J., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A. & Peynet J. (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Imm Ana Biol.* **21(3)**: 144-150.
- ❑ **Belkheiri N. (2010).** Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse.

- ❑ **Benavente-Garcia O. & Castillo J. (2008).** Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J AgricFood Chem.* **56(15):** 6185-6205.
- ❑ **Bernabé J, Mulero J, Cerdá B, García-Viguera C, Moreno D.A, Parra S, Avilés F, Abellán J, Zafrilla P. (2013).** Effects of a citrus based juice on biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome patients. *Journal of Functional Foods.* **5(3):** 1031-1038.
- ❑ **Berrouiguet A.Y., Benyoucef M., Meguenni K. & Brouri M. (2009).** Enquête sur la prévalence des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires à Tlemcen (Algérie). *Médecine des maladies Métaboliques.* **3(3):** 313-319.
- ❑ **Boshtam M., Moshtaghian J., Naderi G. & Asgary S. (2010).** Citrus limon Burm f. can change affinity of LDL and ox-LDL to their receptors in rabbits with atherogenic diet. *Atheroscler Suppl.* **11(2):** 145
- ❑ **Brickell C. (2003).** The Royal horticultural Society A-Z Encyclopedia of Garden Plants. Third edition. Dorling Kindersley, London, United Kingdom.

## C

- ❑ **Choi G.S., Lee S., Jeong T.S., Lee M.K., Lee J.S., Jung U.J., Kim H.J., Park Y.B., Bok S.H. & Choi M.S. (2004).** Evaluation of hesperetin 7-O-lauryl ether as lipid-lowering agent in high-cholesterol-fed rats. *Bioorg Med Chem.* **12(13):** 3599-3605.
- ❑ **Choi H.S., Song H.S., Ukeda H. & Sawamura M. (2000).** Radical-scavenging activities of Citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem.* **48(9):** 4156-4161.
- ❑ **Cirico T.L. & Omaye S.T. (2006).** Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem Toxicol.* **44(4):** 510-516.
- ❑ **Costa R., Russo M., De Grazia S., Grasso E., Dugo P. & Mondello L. (2014).** Thorough investigation of the oxygen heterocyclic fraction of lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) juice. *J Sep Sci.* **37(7):** 792-797.
- ❑ **Conesa A, Manera FC, Brotons JM, Fernandez-Zapata JC, Simon I, Simon-Grao S, Alfosea-Simon M, Martinez-Nicolas JJ, Valverde JM, Garcia-Sanchez F.** Changes in the content of chlorophylls and carotenoids in the rind of Fino 49 lemons during maturation and their relationship with parameters from the CIELAB color space. *Scientia Horticulturae.* 2019;243:252-60.

- ❏ **Cano-Lamadrid M, Lipan L, Hernandez F, Martinez JJ, Legua P, Carbonell-Barrachina AA, Melgarejo P.** Quality Parameters, Volatile Composition, and Sensory Profiles of Highly Endangered Spanish Citrus Fruits. *Journal of Food Quality*. 2018;13.
  
- ❏ **Cronquist A. (1982).** An Integrated System of Classification of Flowering Plants. *Brittonia*. **34(2)**: 268-270.

## D

- ❏ **Defraigne J.O. & Pincemail J.(2008).** Stress oxydant et antioxydants:mythes et réalités. *Rev Med Liège*. **63(S1)**: 10-19.
  
- ❏ **Dimitrova-Sumkovska J., Dosić-Markovska B., Zafirova-Roganović D. & Anastasovska V. (2006).** Effects of different dietary fatty acid supplements upon lipoprotein metabolism and lipid peroxides production in hyperlipidemic rats. *Prilozi*. **27(1)**: 67-86.
  
- ❏ **De Rosa S., Cirillo P., Paglia A., Sasso L., Di Palma V. & Chiariello M. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach? *Curr Vasc Pharmacol*. **8(2)**:75-259.
  
- ❏ **Dong X, Hu Y, Li Y, Zhou Z.** The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [*Citrus limon* (L.) Burm. f.]: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content. *Scientia Horticulturae*. 2019;243:281-89.
  
- ❏ **Duan L., Guo L., Liu K., Liu E.H. & Li P. (2014).** Characterization and classification of seven citrus herbs by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and genetic algorithm optimized support vector machines. *J Chromatogr A*. **1339**:27-118.

## E

- ❏ **Economos C.& Clay W.D. (1999).** Nutritional and health benefits of citrus fruits. *Food Nutr Agric*. **24**: 11-18.

**F**

- ❑ **Favier A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Review. L'actualité chimique. pp. 108-115.

**G**

- ❑ **Gardès-Albert M., font-Rousselot D.B., Abedinzadeh Z. & Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? L'actualité chimique. pp. 91-96.
- ❑ **Getz G.S. & Reardon C.A. (2007).** Nutrition and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **27(12)**: 2499-2506.
- ❑ **González-Molina E, Moreno DA, García-Viguera C.** Genotype and harvest time influence the phytochemical quality of Fino lemon juice (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) for industrial use. *J Agric Food Chem.* 2008;56(5):1669-75.
- ❑ **Guadayol M, Guadayol JM, Vendrell E, Collgrós F, Caixach J.** Relationship between the terpene enantiomeric distribution and the growth cycle of lemon fruit and comparison of two extraction methods, *Journal of Essential Oil Research* 2018;30(4):244-52.
- ❑ **Ghosh D. & Scheepens A. (2009).** Vascular action of polyphenols. *Mol Nutr Food Res.* **53(3)**: 322-331.
- ❑ **González-Molina E., Domínguez-Perles R., Moreno D.A. & García-Viguera C.(2010).** Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J Pharmaceut Biomed.* **51(2)**: 327-345.
- ❑ **Gorinstein S., Haruenkit R., Park Y.S., Jung S.T., Zachwieja Z. & Jastrzebski Z.(2004).** Katrich E., Trakhtenberg S., Belloso O.M. Bioactive compounds and antioxidant potential in fresh and dried Jaffa sweeties, a new kind of *Citrus* fruit. *J Sci Food Agric.* **84(12)**: 1459-1463.
- ❑ **Green C.O., Wheatley A.O., McGrowder D.A., Dilworth L.L& Asemota H.N.(2013).** Citrus peel polymethoxylated flavones extract modulates liver and heart function parameters in diet induced hypercholesterolemia rats. *Food Chem Toxicol.* **51**: 306-309.
- ❑ **Gutteridge, J.M. (1995).** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* **41(12 Pt2)**: 1819-1828.

## H

- ❑ **Haleng J., Pincemail J. & Defraigne J.O.(2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liège*.**62(10)**: 628-638.
- ❑ **Halliwell, B. (2012).** Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutrition review*.**70 (5)**: 257-265.
- ❑ **Hamilton K.L. (2007).**Antioxidants and cardioprotection. *Med Sci Sports Exerc*.**39(9)**: 1544-1553.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17805087>
- ❑ **Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H.& Poutanen H. (2010).** Impact of Dietary Polyphenols On Carbohydrate Metabolism. *Int J Mol Sci*. **11(4)**: 1365-1402.
- ❑ **Horcajada M.N., Habauzit V., Trzeciakiewicz A., Morand C., Gil-Izquierdo A., Mardon J., Lebecque P., Davicco M.J., Chee W.S., Coxam V. & Offord E. (2008).** Hesperidin inhibits ovariectomized-induced osteopenia and shows differential effects on bone mass and strength in young and adult intact rats. *J Appl Physiol*.**104(3)**: 648-654.
- ❑ **Hosomi R., Fukao M., Fukunaga K., Okuno M. & Yagita R. (2010).**Effect of fish protein and peptides on lipid absorption in rats. *Trace Nutrients Research*. **27**:21-27.
- ❑ **Hosomi R., Fukunaga K., Arai H., Kanda S., Nishiyama T. & Yoshida M. (2011).**Effect of simultaneous intake of fish protein and fish oil on cholesterol metabolism in rats fed high-cholesterol diets. *The Open Nutraceuticals Journal*.**4**: 12-19.
- ❑ **Hosomi R., Fukunaga K., Arai H., NishiyamaT. & Yoshida M. (2009).**Effects of dietary fish protein on serum and liver lipid concentrations in rats and the expression of hepatic genes involved in lipid metabolism. *J Agric Food Chem*.**57(19)**:9256-9262.
- ❑ **Hurtado-Fernandez E., Romero M.G. & Pancorbo A.C. (2010).**Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *J Pharmaceut Biomed*.**53(5)**: 1130-1160.

## J

- ❑ **Jazet-Dongmo P.M., Kuate J., Boyom F.F., Ducelier D., Damesse F. & Zollo, P.H. A. (2002).** Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles du citrus sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*. *Fruits*. **57(2)**: 95-104.

- ❏ **Jung U. J., Lee M.K., Park Y.B., Kang M.A. & Choi M.S. (2006).** Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol.***38(7):** 1134-1145.

## K

- ❏ **Khan Y., Khan R.A., Afroz S. & Siddiq A. (2010).** Evaluation of hypolipidemic effect of citrus limon. *J Bas Appl Sci.* **6(1):** 39-43.
- ❏ **Klimek-Szczykutowic M, Szopa A, Ekiert H.** Citrus limon (Lemon) Phenomenon—A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. *Plants.* 2020;9:119.
- ❏ **Koechlin-Ramonatxo C. (2006).**Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires Insuffisance respiratoire et nutrition. *Nutr Clin Métab.* **20(4):** 165-177.
- ❏ **Kim H.K., Jeong T.S., Lee M.K., Park Y.B. & Choi M.S. (2003).** Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clin Chim Acta.* **327(1-2):** 129-137.
- ❏ **Kummer R., Fachini-Queiroz F.C., Estevão-Silva C.F., Grespan R., Silva E.L., Bersani-Amado C.A. & Cuman R.K. (2013).** Evaluation of anti-inflammatory activity of citrus latifolia tanaka essential oil and limonene in experimental mouse models. *Evid Based Complement Alternat Med.* Article ID 859083, 8 pages.
- ❏ **Kurowska E.M., Spence J.D., Jordan J., Wetmore S., Freeman D.J., Piché L.A. & Serratore P. (2000).**HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr.* **72(5):** 1095-1100.

## L

- ❏ **Leborgne L., Mazière J.C., Mazière C. & Andrejak M. (2002).** Stress oxydant, athérogénèse et facteur de risque cardiovasculaire. *Arch Mal Coeur Vaiss.* **95(9):**805-814.
- ❏ **Lee M.K., Bok S.H., Jeong T.S., Moon S.S., Lee S.E., Park Y.B. & Choi M.S. (2002).** Supplementation of naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high cholesterol-fed rats. *Bioorg Med Chem.* **10(7):**2239-2244.

- ❑ **Loeillet D.(2010).** In Cyclope 2010 : les marchés mondiaux. "La renaissance du Palais d'Eté". Paris : Economica. pp. 421-424.
- ❑ **Loscalzo J. (2003).** Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc.* **23(Pt5)**: 1059-1061.
- ❑ **Luro F., Rist D. & Ollitrault P. (2001).** Evaluation of genetic relationships in citrus genus by means of sequence tagged microsatellites. *Acta Hort.* **546**: 237-242.

## M

- ❑ **Mahmoud M.F., Hamdan D.I., Wink M.& El-Shazly A.M. (2014).** Hepatoprotective effect of limonin, a natural limonoid from the seed of *Citrus aurantium* var. bigaradia, on D-galactosamine-induced liver injury in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **387(3)**:251-261.
- ❑ **Martin S. & Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann Cardiol Angiol.* **51(6)**: 304-315.
- ❑ **Miceli N., Mondello M.R., Monforte M.T., Sdrafkakis V., Dugo P., Crupi M.L., Taviano M.F., De Pasquale R.& Trovato A. (2007).** Hypolipidemic effects of *Citrus bergamia* Risso et Poiteau juice in rats fed a hypercholesterolemic diet. *J Agric Food Chem* **55(26)**: 10671-10677.
- ❑ **Minato K., Miyake Y., Fukumoto S., Yamamoto K., Kato Y., Shimomura Y. & Osawa T. (2003).** Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life Sci.* **72(14)**:1609-1616.
- ❑ **Miyake Y., Sakurai C., Usuda M., Fukumoto S., Hiramitsu M., Sakaida K., Osawa T. & Kondo K. (2006).** Difference in plasma metabolite concentration after ingestion of lemon flavonoids and their aglycones in humans. *J Nutr Sci Vitaminol.* **52(1)**: 54-60.
- ❑ **Miyake Y., Yamamoto K., Tsujihara N. & Osawa T. (1998).** Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids.* **33(7)**.689-695.
- ❑ **Monforte M.T., Trovato A., Kirjavainen S., Forestieri A.M., Galati E.M. & LoCurto R.B. (1995).** Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco.* **50(9)**: 595-599.

**N**

- ❑ **Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. (2010)** Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. Database, doi: 10.1093/database/bap024. Full text (free access).
- ❑ **(Niemanetal.,2010)**Nieman DC McAnulty SR., Fox-Rabinovich M., Duran V., McAnulty LS., Henson DA., Jin F., Landram MJ. (2010) Effect of n-3 fatty acids and antioxidants on oxidative stress after exercise. *Med Sci Sports Exerc* 12:1704–1711

**O**

- ❑ **Organisation Mondiale de la Santé(OMS). (2010).** WHO Library Cataloguing-in-publications data; world health statistics.**pp.** 2-177.
- ❑ **Organisation Mondiale de la Santé(OMS) (2015).**Maladies cardio-vasculaires. Aide-mémoire.

**P**

- ❑ **Pari L. & Shagirtha K. (2012).** Hesperetin protects against oxidative stress related hepatic dysfunction by cadmium in rats. *Exp Toxicol Pathol.***64(5):** 513-520.
- ❑ **Park Y.B., DoK.M., Bok S.H., Lee M.K., Jeong T.S. & Choi M.S. (2001).** Interactiveeffect of hesperidin and vitamin E supplements on cholesterol metabolism in high cholesterol fed rats. *Int J Vitam Nutr Res* **71(1):** 36-44.
- ❑ **Paschalis V., Theodorou A.A., Kyparos A., Dipla K., Zafeiridis A., Panayiotou G., Vrabas I.S.& Nikolaidis M.G.(2014).**Low vitamin C values are linked with decreased physical performance and increased oxidative stress: reversal by vitamin C supplementation. *Eur J Nutr.***pp.** 1-9
- ❑ **Patil J.R. & Chidambara Murthy K.N. (2009).**Bioactive compounds from Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells.*J Agric Food Chem.* **57:**10933-10942.
- ❑ **Perveen R., Suleria H.A.R., Anjum F.M., Butt M.S., Pasha I. & Ahmad S. (2013).** Tomato (*Solanum lycopersicum*) carotenoids & lycopenes chemistry; Metabolism, absorption, nutrition and allied health claims- A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci.*

- ❑ **Pincemail J., Degruene F. & Voussure S. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **21(2)**: 66-75.

## R

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

## S

- ❑ **Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C. & Jiménez L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci*. **45(4)**: 287-306.

- ❑ **Settanni L, Randazzo W, Palazzolo E, Moschetti M, Aleo A, Guarrasi V, Mammina C, San Biagio PL, Marra FP, Moschetti G, Germanà MA.** Seasonal variations of antimicrobial activity and chemical composition of essential oils extracted from three Citrus limon L. Burm. cultivars. *Nat Prod Res*. 2014;28(6):383-91.

- ❑ **Souci S.W., Fachmann W. & Kraut H. (2008).** La composition des aliments. Tableaux des valeurs nutritives, 7<sup>e</sup> édition, Med Pharm Scientific Publishers. Taylor & Francis.

- ❑ **Suleria H.A.R., Butt M.S., Anjum F.M., Saeed F., Batool R. & Ahmad A.N. (2012).** Aqueous garlic extract and its phytochemical profile; special reference to antioxidant status. *Int J Food Sci Nutr*. **63(4)**:431-439.

## T

- ❑ **Tounsi M.S., Wannas W.A., Ouerghemmi I., Jegham S., Ben Njima Y., Hamdaoui G., Zemni H. & Marzouk B. (2011).** Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *J Sci Food Agric*. **91(1)**:142-151.

- ❑ **Tomer K, Sethiya NK, Shete A, Singh V.** Isolation and characterization of total volatile components from leaves of citrus limon linn. *J Adv Pharm Technol Res*. 2010;1(1):49-55.

- ❑ **Trovato A., Taviano M.F., Pergolizzi S., Campolo L., De Pasquale R. & Miceli N. (2010).** Citrus bergamia Risso & Poiteau juice protects against renal injury of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Phytother Res*. **24(4)**:514-519.

## U

**Ullah N., Khan M.A., Khan T. & Ahmad W.(2014).** Nephroprotective potentials of *Citrus aurantium*: a prospective pharmacological study on experimental models. *Pak J Pharm Sci.***27(3)**: 505-510.

## V

- ❑ **Vladimir-Knezevic S., Blazekovic B., Stefan M.B., Babac M. (2012).** Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In “Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health. Edition Venketeshwer Rao. pp.155-180.

## Y

- ❑ **Yamada T., Hayasaka S., Shibata Y., Ojima T., Saegusa T., Gotoh T., Ishikawa S., Nakamura Y.& Kayaba K.(2011).** <sup>1</sup> Frequency of citrus fruit intake is associated with the incidence of cardiovascular disease: the Jichi Medical School cohort study. *J Epidemiol.***21(3)**:169-175.

## Z

- ❑ **Zablocka A. & Janusz M. (2008).** [The two faces of reactive oxygen species]. *Postepy Hig Med Dosw.* **62**:118-124.
- ❑ **Zhang L, Ma G, Kato M, Yamawaki K, Takagi T, Kiriwa Y, Ikoma Y, Matsumoto H, Yoshioka T, Nesumi H.** Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs in vitro. *J Exp Bot.* 2012; 63(2):871-86.
- ❑ **Zhang Q, Tan C, Cai L, Xia F, Gao D, Yang F, Chen H, Xia Z.** Characterization of active antiplatelet chemical compositions of edible *Citrus limon* through ultra-performance liquid chromatography single quadrupole mass spectrometry-based chemometrics. *Food & Function.* 2018(5).

