الجمهورية الجزائرية الديموقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Ahmed Zabana de Relizane

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nutrition

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Spécialité : Agro-alimentaire et contrôle de qualité

Intitulé

Valorisation du β carotène à partir des écorces du fruit de *Citrus sinensis* (Oranger) pour des applications pharmaceutiques

Présenté par :

- BENTATA IKRAM
- BEHIRA IMEN

Devant les membres de jury :

Président :	Dr AFFANE Fouad	MCB (Université de Relizane)
Encadrante :	Dr BOUKHENNOUFA Asma	MCA (Université de Relizane)
Examinateur :	Dr BENADA M'hamed	MCA(Université de Relizane)

Année Universitaire : 2025/2026

Remerciement

Avant été commencé la présentation de ce travail, nous disons «AlhamdouliAllah », c'est grâce à Allah qui nous a guidés, soutenus et nous a donné le courage, la santé et la patience que nous sommes arrivée là.

Puis nous profitons de l'occasion pour remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet de fin d'études. Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre encadrante, Madame : **BOUKHENNOUFA Asma**

Qui nous a accompagnées durant tout ce travail, pour sa disponibilité, pour la confiance qu'elle a su accorder et pour ces conseils précieux.

Nos teignons à remercier les membres de jury Monsieur : **Dr AFFANE Fouad** et Monsieur : **Mr BENADA M'hamed** pour avoir accepté d'évaluer notre travail.

Mes meilleurs remerciements à l'équipe de laboratoire de l'université

Veuillez trouver ici le témoignage de notre respect le plus profond, nous remerciement vont aussi à tous nous professeur, enseignants et toutes les personnes qui nous ont soutenus jusqu'au bout, aussi à nous collèges de la promotion.

Dédicace

Je dédie ce travail à

Ma sœur

Pour son encouragement incessant et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Qu'elle trouve dans ce travail la preuve modeste de ma reconnaissance infinie et d'un profond amour.

Mes chers parents

Sur qui j'ai pu compter et me ressourcer d'affection et de bénédiction tout au long de ma vie

Mes chers frères

Pour leur soutien, leur sincérité et les beaux moments partagés.

Moi-même

Pour tous les efforts, la patience et la persévérance fournis afin d'arriver à ce jour.

Mon cher binôme

Avec qui j'ai partagé ce travail, les efforts, le stress et les beaux souvenirs. Merci pour ta coopération et ton soutien.

BENTATA Ikram

Dédicace

Je dédie ce travail avec une immense gratitude et un profond amour :

A mes très chers parents,

Qui lui ont inculqué la valeur de l'effort et de la persévérance merci pour leur confiance aveugle, leurs encouragements continuels et d'avoir toujours fait de son éducation une priorité. Que ce modeste travail soit le reflet de leur immense générosité et une source de fierté pour eux.

A mes frères et mes sœurs,

Pour leurs soutiens moraux, leur bonne humeur contagieuse et leurs précieux conseils qui ont grandement facilité ce long cheminement.

A moi-même,

Pour toute la patience, la force et l'énergie que j'ai su puiser en moi même tout au long de cette étape cruciale.

A ma chère binôme,

Avec qui j'ai partagé chaque étape de cette aventure académique. Pour tous les beaux souvenirs gravés, les efforts partagés et les défis relevés ensemble. Merci pour ta confiance et ton soutien précieux.

En fin, à tous les personnes qui ont contribué de près ou loin à la réalisation de ce travail, Je leur adresse mes sincères remerciements.

BEHIRA IMEN

Table de matière

List des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : *Citrus sinensis*

I.1. Historique et origines des agrumes 3
I.2. Classification botanique.....5
I.3. Production d'oranges à l'échelle mondiale.....5
I.4. Description.....6
I.5. Composition chimique du fruit d'orange.....7

Chapitre II : Caroténoïde

II.1. Généralité 10
II.2. Le β-carotène.....11
II.3. Composition et les catégories du bêta-carotène 12
II.4. Sources du bêta-carotène.....13
II.5. Propriétés anti-oxydantes.....13
II.6. Détoxication des xénobiotiques 14
II.7. Métabolisme et activité provitamine A 14

Chapitre III - Utilisations des pigments

III.1. Synthèse microbienne.....15
III.2. Synthèse industrielle.....15
III.3. Emploi du bêta-carotène comme colorant alimentaire.....17
III.4. Application en pharmacie.....19

Partie expérimentale
Chapitre IV :Matériel et méthodes

IV.1. Objectifs 22
IV.2. Matériel végétal 23
IV.3. Caractérisation biochimique de la plante 23
IV.1.1 Teneur en eau 23
IV.1.2 Teneur en matière minérale 24

IV.4. Préparation de la matière végétale 24
IV.5. Extraction des pigments caroténoïdes 24
IV.5.1 Principe 24
IV.5.2 Mode opératoire 25

IV.6. Identification par CCM 25
IV.6.1 Principe 25
IV.6.2 Mode opératoire 26

IV.7. Séparation et vérification des pigments 26
IV.7.1 Séparation 26
IV.7.2 Vérification de la séparation de β-carotène 27
IV.7.3 Stérilisation des pigments extraits 27

IV.8. Formulation d'une poudre hydrosoluble 28

IV.9. Stabilité de la formulation 29

IV.9.1 Teneur en eau 29
IV.9.2 Influence de la température 29
IV.9.3 Analyse microbiologique 30
IV.9.3.1 Préparation de la dilution mère et des dilutions décimales 30
IV.9.3.2 Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile 30
IV.9.3.2.1 Principe 30
IV.9.3.2.2 Mode opératoire 30
IV.9.3.3 Dénombrement des levures et des moisissures 31
IV.9.3.3.1 Principe 31
IV.9.3.3.2 Mode opératoire 31

IV.10. Détermination de la durée de vie 31

IV.11. Etude statistique 31

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Caractérisation biochimique 32

V.2. Extraction des caroténoïdes 33

V.3. Caractérisation chromatographique (CCM) 33

V.4. Séparation et vérification du β carotène 34

V.41 Séparation 34

V.42 Vérification par spectrophotométrie 35

V.5. Formulation de poudre effervescente 36

V.6. Stabilité de la formulation 37

V.61 Teneur en eau 37

V.62 Influence de la température 37

V.63 Analyse microbiologique de la formulation 39

V.7. Durée de vie de la préparation 39

Conclusion générale 41

Références bibliographiques

Annexes

Listes des figures

Figure 1:Origine et aire de réparation des agrumes..... 4
Figure 2: Aire de répartition d'origine des agrumes 5
Figure 3:Données détaillées de production pour certains des principaux pays 6
Figure 4: L'oranger doux, Citrus sinensis 7
Figure 5: Anatomie de l'orange, coupe équatoriale 7
Figure 6: Les isomères de β-carotène : all-trans-β-carotène, cis- β-carotène..... 12
Figure 7: Principales étapes de production des caroténoïdes 16
Figure 8: Schéma récapitulatif du protocole expérimental..... 22
Figure 9: Fruit de Citrus sinensis 23
Figure 10: Aspect de l'extrait obtenu..... 25
Figure 11: Analyse de l'extrait par CCM 26
Figure 12:Séparation des caroténoïdes à partir de l'extrait brut..... 27
Figure 13: Stérilisation de l'extrait caroténoïde par filtration 28
Figure 14: Conservation de la poudre formulée..... 29
Figure 15: Cendres des écorces de Citrus sinensis 32
Figure 16: Aspect de l'extrait brut 33
Figure 17: Migration de l'extrait brut sur plaque CCM..... 34
Figure 18:Séparation du pigment caroténoïde (β carotène)..... 35
Figure 19: Calcul des absorbances de l'extrait pigmentaire..... 35
Figure 20: Analyse microbiologique..... 36
Figure 21: Pourcentage de rétention du Béta carotène..... 38
Figure 22: Analyse microbiologique..... 39

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification de *Citrus sinensis* 5

Tableau 2: Composition chimique du fruit de *Citrus sinensis*..... 7

Tableau 3: Teneurs en vitamines..... 8

Tableau 4: Distribution phytochimique des métabolites secondaires..... 9

Tableau 5: Couleurs, applications et activités biologiques des caroténoïdes..... 11

Tableau 6: Composition de la poudre effervescente..... 28

Tableau 7: Caractérisation biochimique des écores de Citrus sinensis..... 32

Liste des abréviations

- **ADN :** Acide Désoxyribonucléique
- **BHA :** Butylhydroxyanisole
- **BHT :** Butylhydroxytoluène
- **CCM :** Chromatographie sur Couche Mince
- **DO :** Densité Optique
- **ERO :** Espèces Réactives de l'Oxygène
- **FTAM :** Flore Totale Aérobie Mésophile
- **pH :** Potentiel Hydrogène
- **ROS :** Reactive Oxygen Species
- **SFC :** Chromatographie en Phase Supercritique
- **UFC :** Unité Formant Colonie
- **UV :** Ultraviolet
- **UV-Vis :** Spectrophotométrie Ultraviolet-Visible

Résumé/Abstract/ملخص

Résumé

Cette étude porte sur la valorisation des pelures de *Citrus sinensis* à travers l'extraction du β-carotène naturel et son incorporation dans des préparations pharmaceutiques et alimentaires, notamment une poudre effervescente. L'étude a débuté par une caractérisation physicochimique de la matière première afin de déterminer ses principales propriétés, notamment la teneur en eau et la teneur en cendres. Les caroténoïdes ont ensuite été extraits à l'aide de solvants organiques puis purifiés par chromatographie sur couche mince. Leur stabilité chimique et physique a également été évaluée.

Par la suite, l'extrait obtenu a été incorporé dans une formulation de poudre effervescente. La qualité du produit fini a été évaluée à travers l'étude de sa stabilité en fonction de la température et de la teneur en eau au cours de la conservation. Des analyses microbiologiques ont également été réalisées afin d'assurer l'innocuité du produit, notamment la recherche de la flore totale aérobie mésophile (FTAM), des levures et des moisissures.

Les résultats de la caractérisation ont révélé une teneur en eau élevée de 77,66 ± 0,49 %, tandis que la teneur en cendres était de 12,25 ± 3,0 %. L'analyse chromatographique a mis en évidence une valeur du rapport frontal (Rf) de 0,90 attribuée au β-carotène.

Le rendement d'extraction du β-carotène obtenu par extraction liquide/liquide était de 1,91 %, confirmé par une absorption maximale à une longueur d'onde de 450 nm. Les essais de stabilité ont montré que la poudre effervescente conservait ses caractéristiques physicochimiques, avec une teneur en eau de 2,85 ± 0,5 %. La conservation à 4 °C a assuré la meilleure stabilité du β-carotène (99 % puis 97 %), suivie de 25 °C (97 % puis 94 %), tandis qu'une conservation à 40 °C a entraîné la diminution la plus importante (92 % puis 85 %).

Sur le plan microbiologique, les résultats obtenus étaient conformes aux normes réglementaires. La flore totale aérobie mésophile (FTAM) a été estimée à 7×10^3 UFC/g, avec une absence totale de levures et de moisissures. Les essais de solubilité ont également démontré que la poudre possédait d'excellentes propriétés effervescentes, facilitant son utilisation en tant que complément nutritionnel.

Cette étude met en évidence l'intérêt technique, économique et environnemental des pelures d'orange comme source naturelle et durable de composés bioactifs, contribuant ainsi à la valorisation des résidus agroalimentaires.

Mots-clés : *Citrus sinensis*, β-carotène, extraction, valorisation, poudre effervescente.

Résumé/Abstract/ملخص

Abstract

This study focuses on the valorization of *Citrus sinensis* peels through the extraction of natural β-carotene and its incorporation into pharmaceutical and food preparations, particularly an effervescent powder formulation. The study began with a physicochemical characterization of the raw material to determine its main properties, especially moisture and ash contents. Carotenoids were then extracted using organic solvents and purified by thin-layer chromatography. Their chemical and physical stability was also evaluated.

Subsequently, the obtained extract was incorporated into an effervescent powder formulation. The quality of the final product was assessed by studying its stability as a function of temperature and moisture content during storage. Microbiological analyses were also carried out to ensure product safety, including the detection of total aerobic mesophilic flora (TAMF), yeasts, and molds.

The characterization results revealed a high moisture content of 77.66 ± 0.49%, while the ash content reached 12.25 ± 3.0%. Chromatographic analysis showed a retention factor (Rf) value of 0.90 attributed to β-carotene.

The β-carotene extraction yield obtained by liquid–liquid extraction was 1.91%, confirmed by a maximum absorbance at a wavelength of 450 nm. Stability studies demonstrated that the effervescent powder maintained its physicochemical characteristics, with a moisture content of 2.85 ± 0.5%. Storage at 4°C ensured the best β-carotene stability (99% then 97%), followed by 25°C (97% then 94%), whereas storage at 40°C resulted in the greatest decrease (92% then 85%).

From a microbiological perspective, the obtained results complied with regulatory standards. The total aerobic mesophilic flora (TAMF) was estimated at 7×10^3 CFU/g, with a complete absence of yeasts and molds. Solubility tests also demonstrated that the powder possessed excellent effervescent properties, facilitating its use as a nutritional supplement.

This study highlights the technical, economic, and environmental value of orange peels as a natural and sustainable source of bioactive compounds, thereby contributing to the valorization of agro-industrial residues.

Keywords: *Citrus sinensis*, β-carotene, extraction, valorization, effervescent powder.

Résumé/Abstract/ملخص

الملخص

تتناول هذه الدراسة تثمين قشور *Citrus sinensis* من خلال استخلاص البيتا-كاروتين الطبيعي وإدماجه في مستحضرات صيدلانية وغذائية، لاسيما في شكل مسحوق فوّار. بدأت الدراسة بإجراء توصيف فيزيائي-كيميائي للمادة الأولية بهدف تحديد خصائصها الرئيسية، خاصة محتوى الرطوبة ومحتوى الرماد. بعد ذلك، تم استخلاص الكاروتينات باستعمال مذيبات عضوية ثم تنقيتها بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة. كما تم تقييم استقرارها الكيميائي والفيزيائي.

لاحقًا، تم إدماج المستخلص المتحصل عليه في تركيبة مسحوق فوّار. وتم تقييم جودة المنتج النهائي من خلال دراسة ثباته تبعًا لدرجة الحرارة ومحتوى الرطوبة أثناء التخزين. كما أُجريت تحاليل ميكروبيولوجية لضمان سلامة المنتج، شملت الكشف عن الفلورا الهوائية المتوسطة المحبة للحرارة(FTAM) ، والخمائر، والعفن.

أظهرت نتائج التوصيف ارتفاع محتوى الرطوبة بنسبة 77.66 ± 0.49٪، في حين بلغ محتوى الرماد 12.25 ± 3.0٪. كما أظهر التحليل الكروماتوغرافي قيمة معامل الانتقال (Rf) تساوي 0.90 والمنسوبة إلى البيتا-كاروتين.

بلغ مردود استخلاص البيتا-كاروتين بطريقة الاستخلاص سائل/سائل نسبة 1.91٪، وتم تأكيد ذلك من خلال تسجيل أقصى امتصاص عند طول موجي قدره 450 نانومتر. كما بينت اختبارات الثبات أن المسحوق الفوّار حافظ على خصائصه الفيزيائية والكيميائية، حيث بلغ محتوى الرطوبة 2.85 ± 0.5٪. وقد أظهر التخزين عند 4 درجات مئوية أفضل استقرار للبيتا-كاروتين (99٪ ثم 97٪)، يليه التخزين عند 25 درجة مئوية (97٪ ثم 94٪)، بينما أدى التخزين عند 40 درجة مئوية إلى أكبر انخفاض (92٪ ثم 85٪) .

ومن الناحية الميكروبيولوجية، كانت النتائج المتحصل عليها مطابقة للمعايير التنظيمية. وقد قُدِّرت الفلورا الهوائية المتوسطة المحبة للحرارة (FTAM) بـ 7×10^3 وحدة مكوّنة للمستعمرات/غ، مع غياب تام للخمائر والعفن. كما أثبتت اختبارات الذوبانية أن المسحوق يتمتع بخصائص فوّارة ممتازة، مما يسهّل استخدامه كمكمّل غذائي.

تُبرز هذه الدراسة الأهمية التقنية والاقتصادية والبيئية لقشور البرتقال كمصدر طبيعي ومستدام للمركبات النشطة حيويًا، مما يساهم في تثمين المخلفات الزراعية الغذائية.

الكلمات المفتاحية: *Citrus sinensis* ، البيتا-كاروتين، الاستخلاص، التثمين، مسحوق فوّار.

Introduction générale

Introduction générale

La valorisation des déchets agroalimentaires suscite, ces dernières années, un intérêt croissant, tant pour des considérations environnementales qu'économiques. Par ailleurs, les avancées technologiques, ainsi que le développement de secteurs tels que la pharmacie, la chimie et l'industrie alimentaire, ont renforcé le recours aux biomolécules issues de cette biomasse résiduelle, désormais considérée comme une ressource à fort potentiel.

Les agrumes font partie d'une vaste famille de plantes aromatiques nommée les *Rutacées*, qui constituent l'une des cultures fruitières les plus essentielles à l'échelle mondiale. On estime que leur production à l'échelle mondiale atteint plus de 115 millions de tonnes chaque année, dont 517 mille tonnes ont été produites en Algérie **(Panwar et *al.*, 2021).**

Les résidus produits après le pressage des agrumes (peaux, pulpes, pépins) constituent entre 50% et 60% du poids total des fruits pressés. Les peaux représentent plus de la moitié (60% à 65%) de cette masse résiduelle. Ces déchets, en particulier les peaux d'agrumes, sont riches en molécules bioactives. L'extraction de composés bioactifs tels que les huiles essentielles et les polyphénols provenant des sous-produits d'agrumes suscite un vif intérêt en raison de la recherche d'antioxydants naturels aux propriétés anti-radicalaires, antibactériennes et antifongiques. Ils sont employés dans la prévention de diverses maladies **(El Kantar, 2019).**

En Algérie et ailleurs, les oranges (C*itrus sinensis*) sont des agrumes particulièrement prisés par les consommateurs grâce à leur goût plaisant, leur haute valeur nutritionnelle et leur richesse en molécules bioactives (plus de 170 composés phytochimiques recensés) **(Wang, 2007).** On note également la présence du pamplemousse (*Citrus .maxima*), une espèce reconnue pour ses valeurs ethno-médicale, pharmacologique et phytochimique. Des analyses ont été menées sur les extraits ou composés pur de cette plante en termes de diversité d'activités biologiques **(Sapkota, 2022).**

Ces fruits sont très appréciés pour leur valeur nutritive, étant largement salués pour leur teneur élevée en vitamines, antioxydants et autres composés bioactifs. De plus, ils occupent une position centrale dans différents secteurs, comme l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. **(Hegde et *al*., 2016).**

Le bêta-carotène est un caroténoïde d'origine naturelle présent dans de nombreux fruits et légumes, notamment les carottes et les légumes verts. Il joue un rôle essentiel comme précurseur de la vitamine A, contribuant à la santé de la vision, du système immunitaire et de

la peau. Grâce à ses propriétés antioxydantes **(Burton et Ingold. 1984)**, il aide à lutter contre le stress oxydatif et le vieillissement cellulaire. Le bêta-carotène est largement utilisé dans les secteurs alimentaires comme colorant naturel, pharmaceutique pour ses bienfaits nutritionnels, et cosmétique pour ses effets protecteurs et embellissants sur la peau. Ainsi, il représente une biomolécule d'intérêt majeur dans la valorisation des ressources naturelles **(Lessin, 1997).**

La séquence de biosynthèse des caroténoïdes chez les plantes est la suivante : phytoène → phytofluène → β-carotène → neurosporène → lycopène → γ-carotène. Chaque étape enzymatique, du phytoène au lycopène, ajoute une double liaison à la molécule, aboutissant au lycopène, une molécule symétrique contenant 13 doubles liaisons. L'étape de biosynthèse suivant le lycopène implique la cyclisation enzymatique des groupements terminaux, ce qui donne le γ-carotène (un cycle β) et le β-carotène (deux cycles β). L'ajout d'oxygène à la molécule conduit à la formation des xanthophylles (**Goodwin, 1980).**

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude, dont l'objectif général est de contribuer à la valorisation des écorces de *Citrus sinensis* en tant que source de pigments caroténoïdes, ainsi qu'à la formulation d'une poudre effervescente à des fins pharmaceutiques.

Plus spécifiquement, il s'agissait de :

1) Caractérisation biochimique de la plante

2) Extraction des caroténoïdes

3) Formulation du complément alimentaire

4) Vérification de la qualité biochimique et microbiologique du complément alimentaire

Outre l'introduction et la conclusion suivie de quelques perspectives, le présent mémoire comprend trois grandes parties. La première partie, présente les généralités, à savoir une synthèse bibliographique sur le *Citrus sinensis*, pigments caroténoides, produits à base des pigments. La deuxième partie, est consacrée au matériel et aux méthodes. Elle expose le matériel utilisé et décrit toute la méthodologie appliquée afin d'atteindre les objectifs fixés. Les résultats générés seront présentés et discutés dans la troisième partie. Enfin, une liste des références scientifiques consultées est présentée.

Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Citrus sinensis

I.1. Historique et origines des agrumes

D'après les études, l'origine des agrumes remonte aux pays du Sud-Est asiatique, où leur domestication a coïncidé avec l'émergence des anciennes civilisations chinoises. Initialement, ces fruits étaient recherchés pour leurs parfums enivrants, puis ils ont également gagné en popularité pour leurs succulentes saveurs fruitées. Selon **Praloran, (1971),** c'est l'impact des grandes civilisations chinoises et hindoues qui a initié l'expansion de la culture des agrumes. Celle-ci s'est progressivement répandue dans toute la région du Sud-Est asiatique dès le premier millénaire avant notre ère, englobant le sud du Japon ainsi que l'archipel de Malaisie.

On pense que la culture des agrumes en Méditerranée a débuté au VIIe siècle avant J.-C., avec la plantation de cédratiers. On attribue l'introduction du bigaradier, du pamplemoussier et du citronnier en Méditerranée aux Maures, aux Génois et aux Portugais entre les Xe et XIIe siècles. La propagation mondiale des agrumes a été largement favorisée par l'essor du commerce maritime au XVe siècle. Christophe Colomb, lors de son deuxième voyage en 1493, les a introduits en Haïti. De là, leur propagation vers le Mexique en 1518 et ensuite vers les États-Unis d'Amérique (de 1569 à 1890) a commencé.

L'orange (orange douce) et le mandarinier n'ont été identifiés en Méditerranée qu'au XVe siècle et au XVIIIe siècle respectivement, tous deux provenant de Chine. Le voisinage de ces diverses sortes d'agrumes en Méditerranée a stimulé l'émergence de nouvelles variétés hybrides, telles que la bergamote, le clémentinier et le cédrat corse. Des variations naturelles, y compris les types d'oranges sanguines, ont aussi vu le jour. Quant au pomelo (*C. paradisi*), il a fait son apparition dans les Caraïbes vers la fin du XVIIIe siècle, suite à une pollinisation croisée accidentelle entre un pamplemoussier et un oranger **(Praloran, 1971).**

En Algérie, l'arrivée du bigaradier a eu lieu lors des invasions arabes au sein de l'empire Almohade. Durant l'ère ottomane, du XVIe au XVIIIe siècle, cet arbre décorait déjà les jardins des Beys. Il est possible que l'oranger ait été introduit quelques siècles plus tard en provenance d'Andalousie par les Maures. C'est en 1850, lors des débuts de la colonisatio n, que M. Harby a introduit le mandarinier en Algérie (Fig.1). C'est au XIXe siècle que le père Clément de l'orphelinat agricole de Misserghin, en associant le mandarinier ordinaire avec le bigaradier Granito, a mis au jour la clémentine **(Praloran, 1971).**

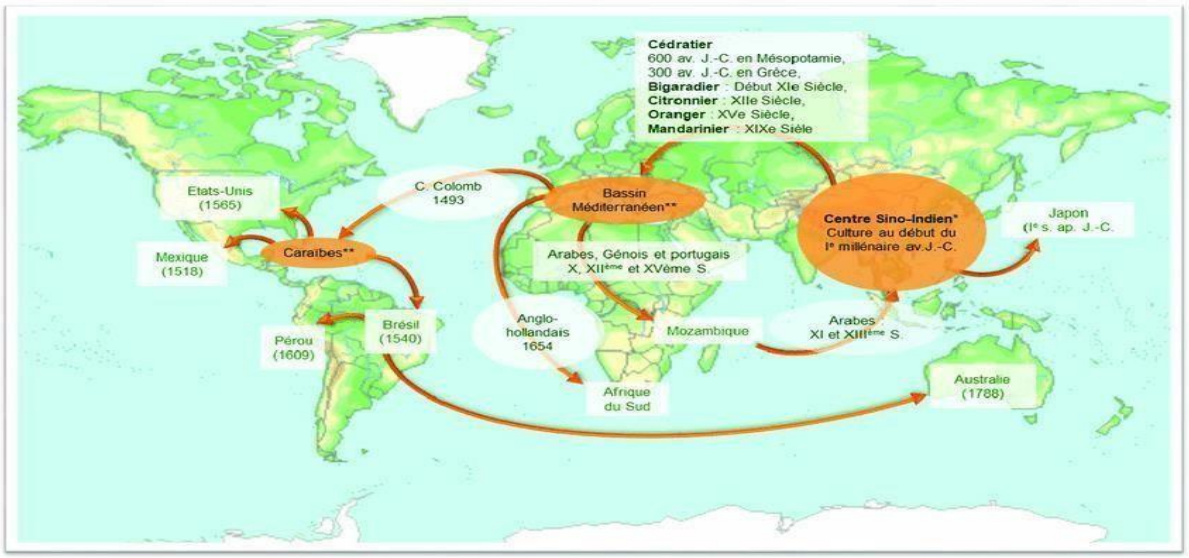


Figure 1:Origine et aire de réparation des agrumes **(Praloran, 1971).**

Les études en phylogénétique de *Scora, (1975)* et *Barrett et Rhodes, (1976)* ont révélé que la diversité des agrumes s'articule essentiellement autour de trois espèces majeures : le pamplemousse (*C. maxima* (L.) Osb.), le mandarin (*C. reticulata* Blanco) et le cédratier (*C. medica* L.).

L'origine de cette distinction entre ces espèces ayant une compatibilité sexuelle découle d'événements de dispersion géographique (pamplemoussiers : Archipel malais et Indonésie, cédratiers : nord-est de l'Inde et régions limitrophes de Birmanie et de Chine, mandariniers : Vietnam, sud de la Chine et Japon), ainsi que des processus d'évolution allopatrique. Des études moléculaires récentes ont aussi démontré la présence d'un quatrième taxon ancien, *C. micrantha* Wester **(Nicolosi et *al.*, 2000).**

Les autres types de cultures (Fig.2) comme les orangers, bigaradiers, citronniers et pomelos sont apparus plus tard grâce à des hybridations entre ces espèces fondamentales, stimulées par le commerce international et les migrations humaines **(Ollitrault et *al.*, 1999; Nicolosi et *al.*, 2000).**

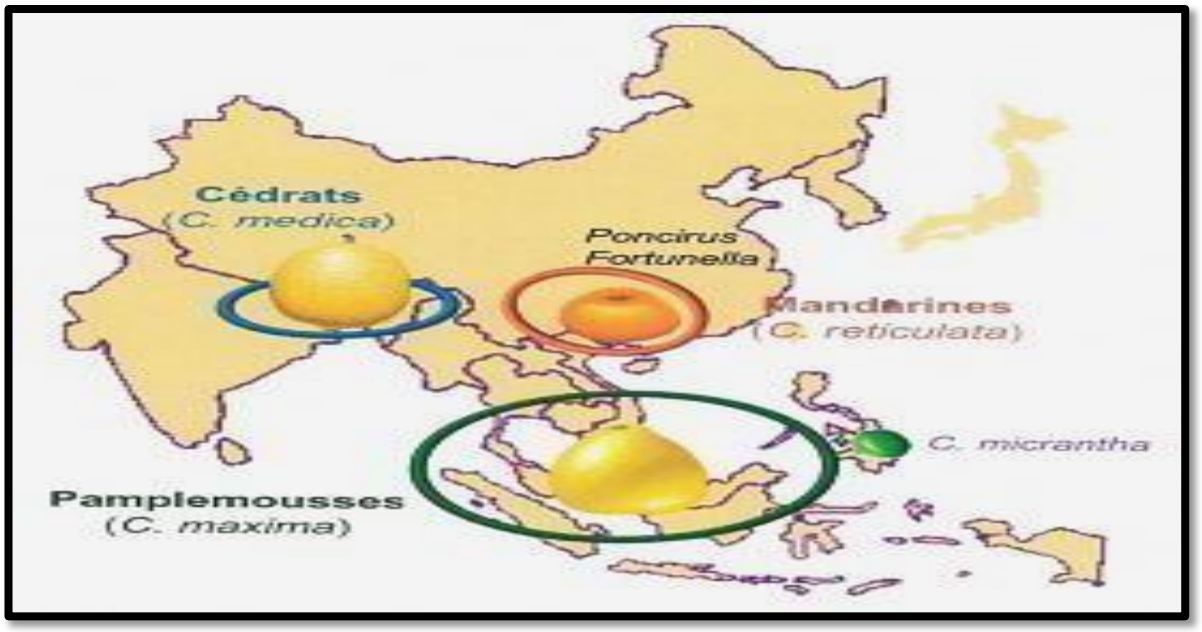


Figure 2: Aire de répartition d'origine des agrumes **(Garcia-Lor et al., 2013)**

I.2. Classification botanique

L'oranger (*Citrus sinensis*) appartient à la famille des rutacées selon le tableau 1

Tableau 1: Classification de *Citrus sinensis* ***(osbeck, 1765)***

Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Sapindales
Famille	Rutacées
Sous famille	Aurantoideae
Tribu	Citreae
Sous-tribu	Citrinae

I.3. Production d'oranges à l'échelle mondiale

Les principales zones de production concernées sont le Brésil, la Chine, l'Union européenne, le Mexique et l'Égypte (Fig.3)

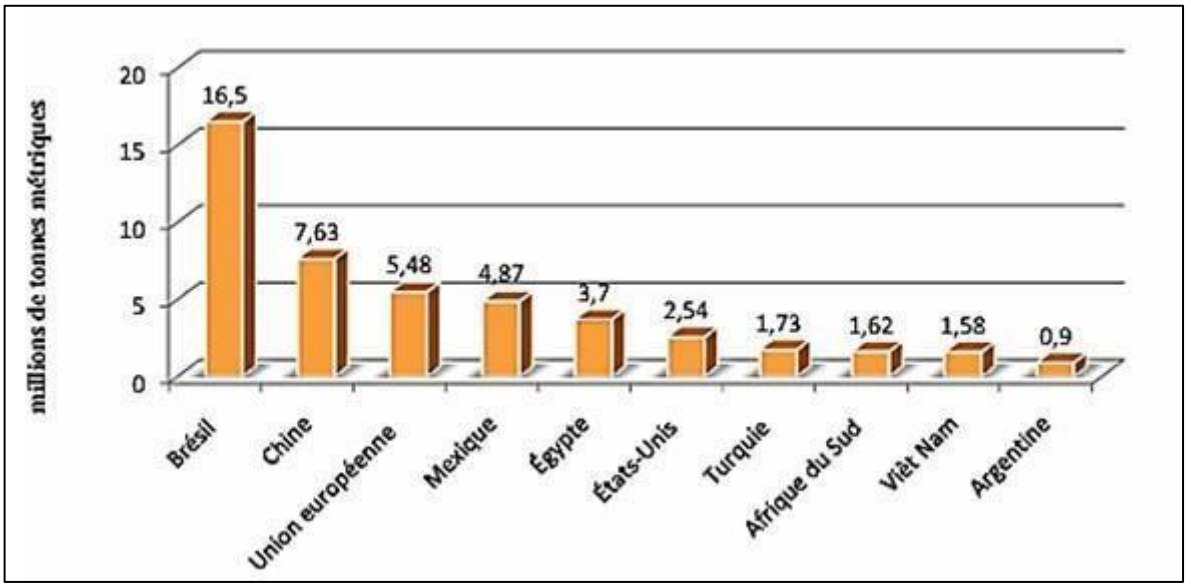


Figure 3:Données détaillées de production pour certains des principaux pays producteurs d'oranges **(USDA, 2024)**

L'augmentation de la production a été stimulée par des conditions météorologiques propices dans des pays tels que la Chine et les États-Unis, tandis que des zones comme le Brésil et l'Union européenne ont affiché des performances inégales **(USDA, 2024).**

I.4. Description

L'oranger est un arbuste sempervirent au port harmonieux et de croissance rapide, pouvant atteindre de 9 à 10 mètres de hauteur avec des branches épineuses portent des feuilles de forme des lames allant d'elliptiques, couleur vert sombre, ovales, coriaces et finement denticulées. Le pétiole possède une légère aile et dégage un parfum distinctif d'agrumes, grâce à l'abondance d'huile. Le calice des fleurs a 4 à 5 lobes, et il y a habituellement cinq pétales qui renferment des glandes sébacées (**Hernández et *al.*, 2016).**



Figure 4: L'oranger doux, Citrus sinensis **(Loubar et Mebarki Yasmina, 2020)**

I.4.1. Anatomie des oranges

Les oranges sont constituées d'une couche extérieur colorée, le flavédo, rappelant le mot « flaveur » car elle contient la glande a l'huiles essentielles et une couche intérieur blanche et spongieuse, l'albédo (ou mésocarpe), riche en pectines. Une partie comestible, l'endocarpe ou épiderme interne (Fig.5).

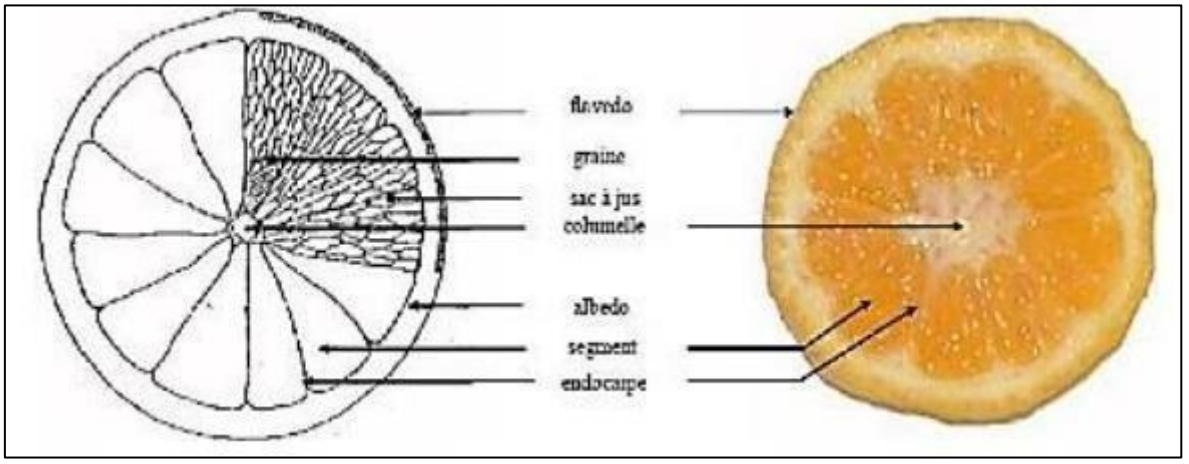


Figure 5: Anatomie de l'orange, coupe équatoriale **(Hut, 1991).**

I.5. Composition chimique du fruit d'orange

Le *Citrus sinensis* possède une composition variée riche en eau, pauvre en lipides et en protéines, et en fibres. De plus, les sucres qu'il renferme sont vite assimilables par l'organisme (Tab.2).

Tableau 2: Composition chimique du fruit de *Citrus sinensis****(Gallouin et al., 2013)***

Composition	Teneur
Energie (kcal)	45.00
Protéines(g)	1
Lipides(g)	0.2
Glucides(g)	8-12
Fibres(g)	1.5
Eau (g)	86

Le fruit, qui est une excellente source de vitamines (Tab.3), renferme également d'importantes quantités de minéraux et d'oligoéléments tels que le potassium, le calcium, le phosphore et d'autres composés.

Tableau 3: Teneurs en vitamines**(Gallouin et al.,2013 ; Etebu et al.,2014)**

Composé	Teneur (ug)
Vitamine A	11
Bêta-carotène	87
Alpha-carotène	7.000
Bêta-crypto xanthine	116.000
Folates totaux	30.000
Composé	**Teneur (MG)**
Thiamine (vitamine B1)	0.08
Riboflavine (vitamine B2)	0.04
Niacine (vitamine B3 ou PP) en équivalent en niacine totale	0.3
Niacine (acide nicotinique)	0.575
Acide pantothénique (vitamine B5)	0.5
Vitamine B6	0.1
Vitamine C	60
Vitamine E	0.98
Vitamine B8	0.02
Vitamine B9	0.04
Vitamine K	0.03

Un grand nombre de métabolites secondaires présents dans les fruits, la pulpe, les feuilles, l'écorce et les graines de *C. sinensis* comprennent les types de composés chimiques mentionnés dans le tableau 4 **(Khan-Niazi et *al.*, 2023).**

Tableau 4: Distribution phytochimique des métabolites secondaires dans l'orange

Composant	Organe	Référence
Flavonoïdes	Feuilles Ecorces Fruits	**(Gattuso *et al*.,2007)**
Coumarines	Ecorce	**(Sidana et *al.*, 2013)**
Caroténoïdes	Fruits	**(Sidana et *al*., 2013)**
Mucilage	Grains Ecorce Pulpe Fruits	**(Abobatta, 2019)**
Huile essentielle	Fruits Grains Feuilles	**(Abobatta, 2019)**
Tanins	Fruits Feuille	**(Abobatta, 2019)**
Stéroïdes	Feuille	**(Favela-Hernández et *al*., 2016)**

Chapitre II : Caroténoïde

II.1. Généralité

À ce jour, Ils ont identifié plus de 600 caroténoïdes. Ces pigments sont non polaires et liposolubles. Ils font partie de la catégorie des terpénoïdes dotés de chaînes polyènes qui leur confèrent diverses caractéristiques grâce à leur conjugaison élevée. Les caroténoïdes se distinguent par leur longueur, leur dimension, leurs groupes fonctionnels, leur capacité à s'isomériser et leurs polarités. Ces propriétés structurelles jouent un rôle crucial dans la détermination **(Viñas-Ospino et *al*., 2023).**

Les caroténoïdes peuvent être divisés en deux catégories distinctes : les carotènes, qui se présentent sous la forme de hydrocarbures insaturés ou pur tels que le β-carotène et le lycopène, et les xanthophylles, qui sont des dérivés oxygénés (sous forme d'alcools) très semblables aux carotènes mais comportant au moins un groupe fonctionnel contenant de l'oxygène tel que la lutéine, la zéaxanthine et la fucoxanthine **(Bhatt et *al*., 2020).**

La structure fondamentale des caroténoïdes se compose de huit unités d'isoprène. (polyisoprénoïde), chacune composée de cinq carbones, ramifiés et répétées formant Une molécule de 40 atomes de carbone comportant des liaisons conjuguées **(Mosquera et *al*., 2021).** Les caroténoïdes peuvent se présenter sous deux formes géométriques principales : la forme trans stable et la forme cis qui est moins stable. La présence abondante de liaisons doubles est une caractéristique des caroténoïdes qui leur confère un potentiel réducteur du fait de leur aptitude à transférer. des électrons, capables d'absorber la lumière et de rendre les caroténoïdes aptes à effectuer l'oxydation et l'isomérisation **(Rodrigo-Baños et *al*., 2015).** Par conséquent, les caroténoïdes ont une importance cruciale dans la photoprotection en neutralisant les ROS. De plus, ils ont la capacité de capter et de diffuser la lumière vers les chlorophylles **(Tapiero et *al*., 2004).**

Des caroténoïdes comme l'α-carotène, le β-carotène, le γ-carotène et la β-cryptoxanthine possèdent un cycle β-ionone. L'organisme peut transformer ces composés en vitamine A, qui contribue à la protection contre diverses maladies. Selon *Ambati et al. (2019),* le marché mondial des caroténoïdes était évalué à 1,24 milliard USD en 2016 et a franchi la barre des 1,53 milliard USD en 2021. Les applications industrielles majeures des caroténoïdes incluent la nutrition humaine et animale, la cosmétique ainsi que le secteur nutraceutique. Effectivement, en 2014, l'industrie de l'alimentation animale représentait le principal débouché pour les caroténoïdes, détenant environ 47% de part de marché. En outre, on considère que les caroténoïdes agissent comme des agents de conservation pour freiner le

processus d'oxydation, diminuant par conséquent la détérioration des aliments. Les caroténoïdes, grâce à leurs qualités antioxydantes et leur grande valeur nutritive pour la peau et les cheveux, sont intégrés dans les produits de beauté tels que les crèmes et lotions **(Tapiero et *al*., 2004).**

II.2. Le β-carotène

Le β-carotène est un métabolite secondaire produit par divers organismes, notamment les plantes, les micro-organismes et les algues. Il fait partie d'un ensemble de composés caroténoïdes non oxydés. Il s'agit d'un composé polyène, issu de la structure acyclique, $C_{40}H_{56}$ possède une longue séquence de doubles liaisons en conjugaison. L'isomérisation des doubles liaisons est favorisée par une température élevée, entraînant un éclaircissement de leur couleur **(Kumar et *al*., 2020).** . Le β-carotène, qui a une structure similaire à celle de la molécule de rétinol, est un précurseur de la vitamine A. À l'instar de la plupart des caroténoïdes, le β-carotène possède des caractéristiques lipophiles **(Maurya et *al*., 2021).** Il est naturellement disponible en deux formats (Fig.6). Isomères (β-carotène all-trans et 9-cis-trans). Il se distingue par ses vertus antioxydantes et anticancéreuses. Il a la capacité de défendre la peau contre le vieillissement et autorise la régulation du taux de cholestérol, réduisant ainsi le risque de maladies. **(Amengual et *al*., 2011)** concernant les maladies cardiovasculaires. Les caractéristiques du β-carotène ont rendu ce composé un additif alimentaire de valeur. La Commission européenne **(EFSA, 2012; Levasseur et *al*., 2020)** a autorisé le β-carotène issu de la microalgue *Dunaliella salina* en tant qu'additif alimentaire (E160). À l'heure actuelle, ce colorant est couramment employé dans le secteur de l'alimentation pour colorer les gâteaux, le beurre, la margarine, le lait et les boissons. Sur le plan mondial, le β-carotène est principalement extrait des moules *Blakeslea Trispora* et de cultures de *Dunaliella salina* **(Bogacz-Radomska et *al*., 2018).** *Dunaliella salina* est la source commerciale principale et naturelle de β-carotène provenant des microorganismes. le marché international du β-carotène a franchi la barre des 520 millions USD en 2020 et pourrait grimper à 780 millions USD avant 2027 **(Patel et *al*., 2022).**

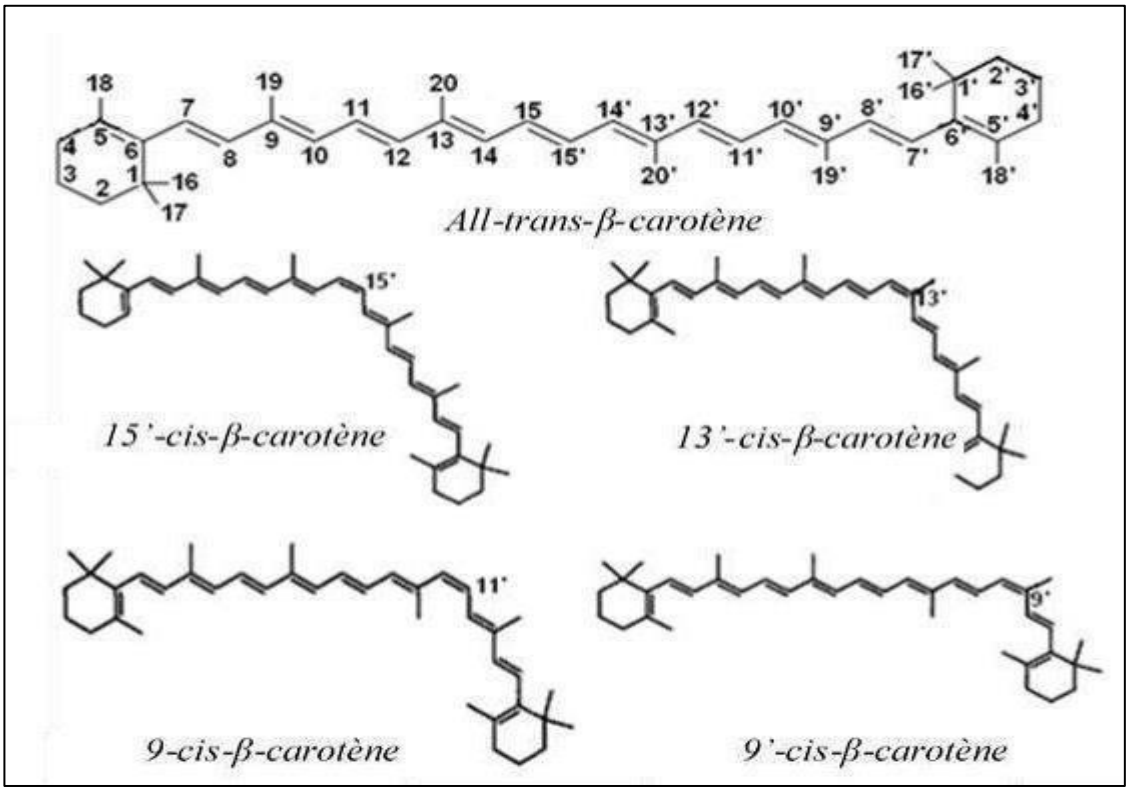


Figure 6: Les isomères de β-carotène : all-trans-β-carotène, cis- β-carotène **(Patel et al., 2022).**

II.3. Composition et les catégories du bêta-carotène

Le bêta-carotène présente une structure unique se composant de 40 atomes de carbone, agencés en huit unités isopréniques. Cette structure constitue un squelette linéaire avec des cycles aux deux extrémités, et est également dépourvue d'atomes d'oxygène **(Bogacz-Radomska & Harasym, 2018).** La molécule appartient à la famille des tétraterpènes et se distingue par son système de liaison double conjugué, qui confère stabilité et une résonance électronique accrue. **(Almagro et *al.*, 2022).** Cette structure permet le transfert d'électrons vers d'autres molécules, participant ainsi à ses diverses fonctions. En ce qui concerne les types, le bêta-carotène appartient à la famille des caroténoïdes, qui comprend une variété de pigments responsables des teintes rouges, oranges et jaunes dans différentes plantes. Beta-carotène, appartenant à la famille des caroténoïdes, est l'un des composés les plus présents. Il se présente sous différentes formes isomériques, y compris la forme all-trans qui possède une disposition linéaire des doubles liaisons contribuant à la couleur distinctive du beta-carotène, ainsi que divers isomères cis où certains doubles liens adoptent une configuration courbée ou ondulée **(Clark, 2007; Lavelli & Sereikaitė, 2022)**

II.4. Sources du bêta-carotène

On ne trouve la vitamine A que dans les produits d'origine animale, les sources les plus importantes étant : - l'huile de foie de poisson - la chair des poissons - le foie de mammifères - le beurre, le lait, le fromage et les oeufs. Le ~ carotène se rencontre surtout dans les végétaux : - carottes - épinards - choux - salades - oranges - abricots - courges Mais on en trouve également dans : - les reins - le foie - la rate - le lait, beurre, fromage (**Grosleron, 1985; Manesme, 1985; Lippman, 1987)**

A l'heure actuelle les consommations recommandées aux Etats-Unis sont de 1,5 mg de B carotène par jour en temps normal ce qui correspond à la quantité effectivement consommée si on en croit une enquête réalisée en 1985 par le ministère américain de l'agriculture. Une ration idéale devrait se situer dans un rapport de 2/3 de vitamine A pour 1/3 de p carotène. En ce qui concerne la prévention des cancers, il est recommandé de prendre 5 à 6 mg de B carotène /jour. Avec les habitudes alimentaires actuelles il manque 4 à 7 mg de B carotène/jour (**Salheld, 1991, Grosleron, 1985, Manesme, 1985).**

Le bêta-carotène se trouve couramment dans la nature et peut être trouvé dans de nombreuses plantes, fruits et légumes. Elle remplit plusieurs rôles, notamment en contribuant à la couleur de ces aliments et en agissant comme précurseur de la vitamine A. Le bêta-carotène se trouve naturellement dans les fruits et légumes, tels que les carottes, les patates douces, les citrouilles, le potiron, les poivrons, les mangues, les abricots, le cantaloup et les papayes. **(Ngamwonglumlert et *al*., 2017).**

II.5. Propriétés anti-oxydantes

Celles du bêta-carotène sont connues de longue date : elles sont surtout effectives aux faibles pressions partielles d'oxygène, d'ailleurs réalisées en milieu cellulaire. Grâce à son système de doubles liaisons conjuguées, le bêta-carotène fixe les radicaux peroxyles ROO° et le radical formé est stabilisé par mésomérie ; la propagation des oxydations en chaîne s'en trouve inhibée. Cette rupture est constatée pour les acides gras (protection contre les lipopéroxy-dations). Le bêta-carotène neutralise l'oxygène singulet. Cette atténuation excite le carotène qui relâche alors son énergie sous forme thermique et sans dommage pour la cellule. Dans ce domaine, d'autres caroténoïdes sont plus actifs que le bêta-carotène, le lycopène, la canthaxanthine **(Nicol et Maudet, 2000).**

II.6. Détoxication des xénobiotiques

Les caroténoïdes peuvent moduler l'activité du système complexe impliquant les cytochromes P 450 qui convertit les xénobiotiques en substances plus polaires par hydroxylation (enzymes de phase I) et les conjugue avec des molécules polaires (glutathion, notamment) pour en accroître la solubilité dans l'urine (enzymes de phase II). Cependant pour certains xénobiotiques, tels que le benzo(a)pyrène, les hydroxylations peuvent conduire à des composés cancérigènes et à une activation pathogène de l'agresseur. Cette constatation a été évoquée pour expliquer certains effets paradoxaux du bêta-carotène sur la cancérisation **(Nicol et Maudet, 2000).**

II.7. Métabolisme et activité provitamine A

Une soixantaine de caroténoïdes peuvent être métabolisés par l'animal et convertis en vitamine A et rétinoïdes indispensables. Chez l'homme, l'apport en vitamine A est assuré par le rétinol présent comme tel dans les aliments d'origine animale (lait, beurre) et par les produits de transformation de caroténoïdes des végétaux et fruits consommés; s'y ajoutent les bêta-carotènes et caroténoïdes de synthèse utilisés comme colorants ou antioxydants par l'industrie alimentaire. L'absorption des caroténoïdes est variable selon les espèces : l'homme partage avec le furet et le veau préruminant la faculté d'absorber le bêta-carotène intact. L'absorption varie aussi avec le type d'aliments ; chez l'homme, elle est faible à partir des végétaux crus : seul 1 à 2 % du bêta-carotène contenu dans les carottes râpées, par exemple, est absorbé. À l'état naturel, les caroténoïdes sont souvent associés à des protéines (caroténoprotéïdes) ou fixés à des structures non digestibles qui en diminuent l'absorption. Celle-ci est meilleure à partir de purées et est favorisée par la cuisson. Cependant, un chauffage excessif suscite des isomérisations ou conduit à des dérivés oxydés de valeur biologique réduite ou nulle, et souvent même toxiques **(Van et *al*., 2000).**

Chapitre III :
Utilisations du bêta-carotène

III.1. Synthèse microbienne

Parmi toutes les méthodes connues d'obtention du β-carotène, la biosynthèse microbienne présente un intérêt particulier. La nécessité d'une production commerciale de pigments naturels, y compris le β-carotène, a conduit à des recherches intensives dans ce domaineUne attention particulière est portée aux algues du genre *Dunaliella spp.*, qui ont la capacité de produire de grandes quantités de β-carotène **(Fazeli et *al*., 2006 ; Mogedas et *al*., 2009 ; Marchal et *al*., 2013),** ainsi qu'à l'algue *Eustigmatos* cf. *polyphem* **(Zhen et *al*., 2012).** La capacité de caroténogenèse a également été mise en évidence chez certaines bactéries telles que *Rhodococcus maris* et *Rhodobacter sphaeroides* **(Zhenxin Gu et *al*., 2008 ; Venil et *al*., 2013).** De nombreux travaux se sont également intéressés à différentes espèces de micro-organismes capables de synthétiser ce pigment d'intérêt industriel.

Les opérations de traitement en aval (downstream processing) après la biosynthèse constituent une étape importante dans la production du β-carotène. Le choix d'une méthode appropriée d'extraction du β-carotène, reposant sur la rupture des membranes cellulaires et l'isolement du composé à partir de l'intérieur de la cellule, représente une étape cruciale pour le développement du procédé **(Kaiser, 2009 ; Thakur et Azmi, 2013**).

Par ailleurs, afin d'augmenter l'efficacité de la production du β-carotène, des substrats issus de sous-produits d'autres procédés technologiques sont activement recherchés **(Frengova et *al*., 2004 ; Simova et *al.*, 2004)**. Actuellement, le sous-produit présentant le plus grand intérêt économique est le glycérol. De plus, les politiques de soutien à la consommation des biocarburants ont entraîné une augmentation importante de l'offre en glycérol. Celui-ci constitue ainsi une source de carbone particulièrement intéressante pour de nombreux procédés biotechnologiques **(Papanikolaou et *al*., 2008 ; Saenge et *al*., 2011 ; Sinisa et *al*., 2013).**

III.2. Synthèse industrielle

À l'échelle industrielle, le β-carotène est obtenu principalement par la culture du champignon filamenteux *Blakeslea trispora* et de la microalgue *Dunaliella salina*. Les cultures se déroulent généralement en trois étapes principales : la multiplication de l'inoculum, la biosynthèse de la biomasse, puis l'extraction des caroténoïdes. Selon la forme

finale souhaitée du β-carotène, la biomasse est soumise à différentes opérations technologiques appropriées **(Perez et *al*., 2003 ; Pawlowska, 2009 ; Xinde et *al*., 2012).**

La biosynthèse du β-carotène par *Blakeslea trispora* fait intervenir les deux types sexuels opposés, « + » et « − ». Les cultures sont réalisées dans des fermenteurs. Comme sources de carbone, on utilise notamment la farine de maïs et de blé, le sirop de maïs, le glucose, les marcs végétaux et fruitiers, ainsi que des hydrocarbures liquides tels que le pétrole purifié. L'ajout d'huiles végétales au cours de la phase de croissance stationnaire entraîne une augmentation significative de la concentration en β-carotène. La cristallisation du pigment est ensuite réalisée à l'aide d'alcools contenant de un à six atomes de carbone, par exemple le n-propanol à 60 °C. Après mélange avec de la gélatine, du saccharose, de l'amidon ou des huiles végétales, le β-carotène peut être utilisé comme additif alimentaire **(Perez et *al*., 2001 ; Joseph et Anandane, 2011 ; Xinde et *al*., 2012).**

Le procédé d'isolement du β-carotène est déterminé en fonction de la forme commerciale souhaitée du produit. Pour obtenir une poudre d'algues contenant 3 % de β-carotène**,** la biomasse est d'abord centrifugée puis séchée. En revanche, pour produire une émulsion de caroténoïdes, les pigments algaux sont soumis à des étapes successives d'extraction, de purification et de séparation des colorants. Le β-carotène est ensuite dissous dans des huiles végétales **(Pisal et Lele, 2005 ; Mykolaiovych et *al*., 2008).**

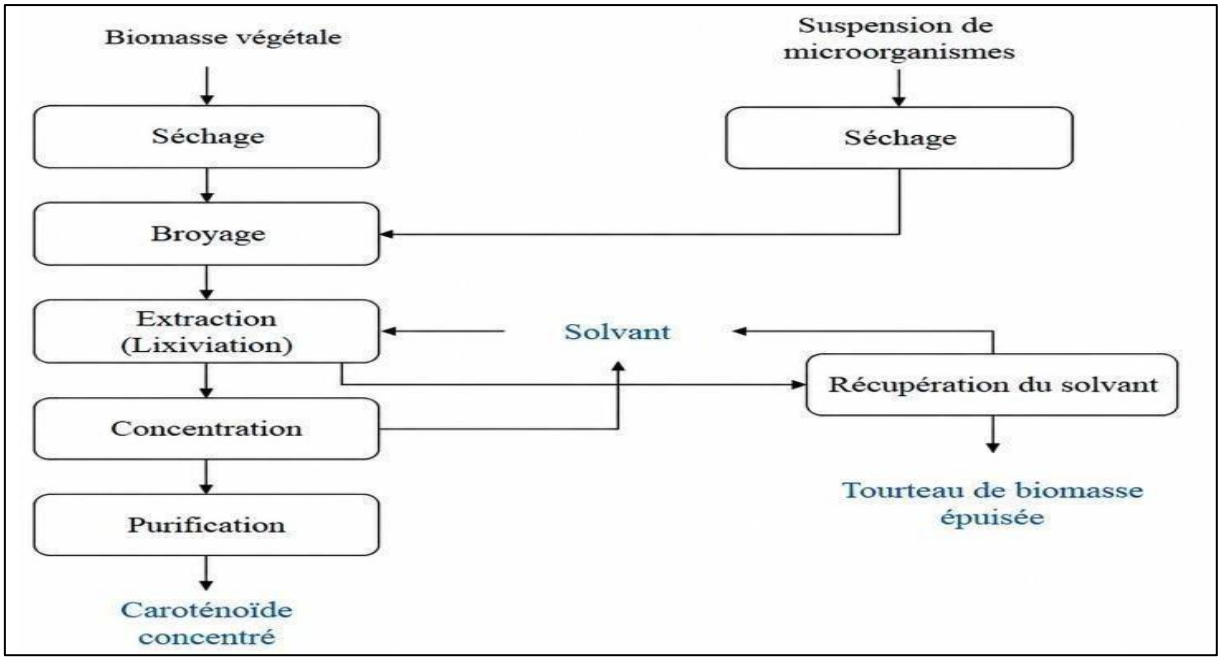


Figure 7: Principales étapes de production des caroténoïdes **(Cvetkovic et al., 2017).**

Les algues constituent la source la plus populaire de caroténoïdes naturels et bénéficient de la confiance des consommateurs. Toutefois, il convient de souligner qu'elles peuvent accumuler d'importantes quantités de métaux lourds ; par conséquent, elles ne sont pas toujours recommandées pour des applications alimentaires. Seules les algues issues de systèmes de production propres, sans exposition à un air pollué, représentent une source sûre de composés bioactifs de grande valeur.

III.3. Emploi du bêta-carotène comme colorant alimentaire

L'industrie alimentaire a fréquemment recours aux colorants synthétiques pour embellir l'apparence des produits, ces derniers étant généralement plus économiques et performants que les couleurs naturelles. Toutefois, des études indiquent que la consommation excessive de couleurs synthétiques peut avoir un impact négatif sur la santé, notamment en provoquant des allergies et des anomalies, ainsi qu'une augmentation du risque de cancer. Des colorants naturels, comme le bêta-carotène, peuvent servir à améliorer la couleur des aliments sans ces éventuels effets indésirables **(Kobylewski et Jacobson, 2012).**

Le bêta-carotène est un pigment colorant présentant l'activité provitaminique A la plus élevée. Au-delà de sa fonction en tant que pigment, le bêta-carotène peut être métabolisé en Les dérivés de la vitamine A, tels que l'acide rétinoïque (RA) et le rétinol. Le RA, qui régule plusieurs fonctions biologiques, est identifié par deux catégories de récepteurs nucléaires : les récepteurs d'acide rétinoïque (RARs) et les récepteurs X du rétinoïde (RXRs) **(Grune et al., 2010 ; von Lintig et al., 2005).**

Étant donné que le (9Z)-bêta carotène est un précurseur du (9Z)-RA, qui est le ligand des RXRs, les isomères bêta-carotène tout-E sont également des précurseurs. Pour (all-E)-RA, il se lie au **RAR (von Lintig, 2020 ; von Lintig et al., 2005).** Les colorants naturels possèdent également des caractéristiques antimicrobiennes biologiques. L'utilisation de colorants naturels dans les aliments peut également apporter des avantages pour prolonger la durée de conservation du produit **(Assadpour et al., 2020 ; Cavalcanti et al., 2022)**. Le bêta-carotène peut être naturellement extrait de matières premières telles que la patate douce, le igname, le riz, le maïs, la citrouille et les pommes de terre. Il peut aussi être incorporé en tant qu'additif alimentaire ou produit d'émulsion **(de Andrade Lima et al., 2019 ; Jati et al., 2022 ; Rivera et Canela, 2012 ; Tang et al., 2012).**

En envisageant le beta-carotène comme un produit émulsifié, sa stabilité et sa solubilité peuvent être améliorées pour son utilisation comme colorant alimentaire. Néanmoins,

l'utilisation d'un seul L'émulsification pour produire une émulsion de bêta-carotène huile dans l'eau peut ne pas être appropriée pour la production alimentaire industrielle en raison de la sensibilité à divers facteurs tels que la température, la lumière, le pH, la chaleur, l'oxygène et les radicaux libres. La microencapsulation du bêta-carotène peut également servir de substitut aux graisses dans les cupcakes et enrichir le produit, remplaçant potentiellement jusqu'à 36% de la matière grasse utilisée. **(Mueller et Boehm, 2011 ; Nayana et coll., 2021)**. La table 2 récapitule l'emploi du bêta-carotène comme colorant alimentaire.

Les niveaux de bêta-carotène ont diminué dans le produit en flocons, y compris la patate douce orange et le riz rouge. La dégradation thermique du bêta-carotène pourrait être à l'origine de ce phénomène. On reconnaît également que les caroténoïdes sont des composés sensibles à la lumière et à la chaleur. Le riz rouge et les patates douces orange renferment divers types de caroténoïdes. Suite à l'ébullition, une hausse des caroténoïdes a été observée, ce qui pourrait être lié à la perturbation thermique du système protéine-caroténoïde **(Trono, 2019).** Ils possèdent un mécanisme sophistiqué et basé sur une matrice pour la libération du carotène. Le niveau de caroténoïdes était influencé par la quantité de patate douce orange utilisée dans la formulation en flocons. La quantité de caroténoïdes dans les flocons augmente avec le pourcentage de patate douce orange.

L'enrichissement des produits alimentaires en sources de bêta-carotène (fruits et légumes) modifierait leur composition chimique. Liage des polymères, c'est-à-dire, des protéines, glucides et lipides aux matrices liées à l'hydrogène ou réseaux intramoléculaires dans un produit alimentaire **(Abano et al., 2020 ; Cakmakci et al., 2014)**.

L'ajout de farine de patate douce à chair orange dans le Gari a conduit à une faible capacité de gonflement en raison de la faible capacité du réseau de protéines et de glucides à absorber l'eau. Le bêta-carotène, qui est réactif à la chaleur et peut changer de couleur en conséquence, a un impact considérable sur la profondeur de la couleur. Des observations indiquent que la teinte du bêta-carotène peut varier du jaune au rouge **(Trancoso-Reyes et al., 2016).**

Le processus de Maillard peut modifier la couleur des flocons, avec des produits de réaction de Maillard plus importants entraînant une teinte plus foncée. De nombreux participants ont trouvé que la teinte orange foncé des aliments contenant du bêta-carotène était peu attrayante, sans appétit et paraissait moins fraîche en termes de caractéristiques sensorielles. Le bêta-carotène peut améliorer la luminosité et la rougeur d'un produit,

renforçant ainsi la préférence pour la couleur. La majorité des panélistes ont exprimé une préférence pour les flocons plus rouges et lumineux. La présence d'endosperme blanc dans le matériau est liée à un niveau de luminosité supérieur.Comme l'ont démontré des études antérieures, la dégradation des caroténoïdes lors de la transformation des aliments est due à l'application de la chaleur. Cela peut également réduire l'activité antioxydante des caroténoïdes. La capacité des substances bioactives à résister à la chaleur peut influencer leur activité antioxydante, étant donné qu'il existe une corrélation positive entre la réduction des substances bioactives et la diminution de la capacité antioxydante **(Bagchietal.,2021).** D'après une étude récente, l'augmentation des températures accélère le début de l'oxydation, diminuant ainsi l'efficacité des antioxydants. Les produits chimiques bioactifs se dégradent, subissent des modifications structurelles et finissent par devenir des substances inertes.

III.4. Application en pharmacie

Outre l'utilisation des aliments nutraceutiques comme moyen de prévention et de traitement des maladies, l'administration de composés bioactifs sous une forme concentrée constitue également une approche prometteuse pour la promotion de la santé. Le transport des caroténoïdes s'effectue depuis la muqueuse intestinale vers la circulation sanguine, où ils sont véhiculés par les lipoprotéines **(Niranjana et *al.*, 2015)**

Les propriétés fonctionnelles des caroténoïdes sont liées à diverses réactions chimiques se produisant au niveau des membranes biologiques, notamment des réactions d'oxydation, de réduction, d'abstraction d'hydrogène et d'addition. Leur pouvoir antioxydant joue un rôle fondamental dans la protection des cellules contre les radicaux libres ainsi que contre l'oxygène singulet généré dans les tissus (**Jomova et Valko, 2013).**

Certains caroténoïdes sont des précurseurs de vitamines et présentent également diverses activités biologiques, notamment des effets anti-inflammatoires, antioxydants, immunomodulateurs et anticancéreux, ainsi que des applications potentielles dans le traitement des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Shahidi et Ambigaipalan, 2015)** et dans la lutte contre l'obésité (**Lai et *al.*, 2015).**

Les caroténoïdes à activité provitamine A comprennent le β-carotène, l'α-carotène et la cryptoxanthine. La vitamine A est un nutriment essentiel au fonctionnement et au maintien de nombreuses fonctions biologiques, notamment la vision, la reproduction et l'immunité (**Revuelta et *al.*, 2016**). Le β-carotène est présent dans le sang et les tissus, où il exerce une

activité antioxydante. En association avec d'autres caroténoïdes ou antioxydants, il peut renforcer la protection contre les radicaux libres. Toutefois, son administration à fortes doses peut présenter certains risques pour la santé (**Curhan et al., 2015)**

En tant qu'antioxydants capables de neutraliser les radicaux libres, les caroténoïdes peuvent moduler le risque de développement de maladies chroniques en inhibant les réactions médiées par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces espèces sont produites au cours du métabolisme cellulaire en réponse à des agents infectieux ou chimiques, et peuvent endommager l'ADN, les protéines et les tissus, contribuant ainsi à l'apparition de maladies chroniques telles que le diabète, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires et le cancer **(Bakan et al., 2014).**

Outre leurs propriétés antioxydantes, les caroténoïdes possèdent également des activités anti-inflammatoires grâce aux effets protecteurs de certains composés phytochimiques tels que la lutéine et l'astaxanthine. Il a été démontré que l'astaxanthine inhibe la production de médiateurs pro-inflammatoires comme l'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages, régule les cytokines inflammatoires et réduit le stress oxydatif. Des effets neuroprotecteurs, une diminution de la neuroinflammation, une amélioration de la signalisation de l'insuline et une réduction des taux lipidiques ont également été observés (**Lu et Yen, 2015).**

L'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses du côlon par les caroténoïdes de la microalgue Neochloris oleoabundans a été mise en évidence, suggérant leur utilisation potentielle comme additif alimentaire fonctionnel ou nutraceutique dans la prévention du cancer colorectal **(Castro-Puyana et *al*., 2016).**Le β-carotène, l'astaxanthine et la capsanthine ont également montré des effets antiprolifératifs sur les cellules leucémiques K562 **(Zhang et *al*., 2011).**

Des études ont indiqué que l'utilisation simultanée de différents caroténoïdes peut être efficace contre le cancer du foie. Dans ces travaux, des patients ont reçu du jus de mandarine enrichi en β-cryptoxanthine ainsi que des capsules contenant un mélange de caroténoïdes comprenant la lutéine, la β-cryptoxanthine, le lycopène, la zéaxanthine et la fucoxanthine. Les analyses par puces à ADN et par puces d'anticorps protéiques ont montré que ces caroténoïdes interféraient avec l'induction de gènes tels que p16 et p73 **(Nishino et *al*., 2009).**

Tableau 5: Couleurs, applications et activités biologiques des caroténoïdes **(Cvetkovic et al., 2017).**

Caroténoïde	Couleur	Applications	Activités
Lutéine	Jaune	Aliment pour volailles ; nutriment fonctionnel	Antioxydant
Canthaxanthine	Orange	Aliment pour volailles ; aliment pour poissons ; cosmétique	Antioxydant, anticancéreux
Lycopène	Rouge	Complément dans les aliments fonctionnels ; additif dans les cosmétiques	Antioxydant, anticancéreux
β-carotène	Orange-rouge	Nutraceutique ; cosmétique ; industries de l'alimentation animale	Antioxydant, anticancéreux, précurseur de la vitamine A
Astaxanthine	Rose-rouge	Aliment pour poissons ; industrie cosmétique	Antioxydant, photoprotecteur, anticancéreux, anti-inflammatoire

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1. Objectifs

La présente recherche vise à extraire des pigments caroténoïdes naturels alternatifs aux pigments synthétiques pour des fins pharmaceutiques. Dans cette optique, notre choix s'est porté sur l'écorce de *Citrus sinensis* afin de préparer une forme médicamenteuse. Cette approche constitue également une valorisation des parties non comestibles de cette plante.

Cette étude a été réalisée au sein des laboratoires pédagogiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Relizane, durant la période allant de 01/02/2026 à 30/04/2026

Le protocole expérimental s'articule autour de plusieurs axes :
– Caractérisation biochimique de la plante
– Préparation de la matière végétale
– Extraction et caractérisation des pigments caroténoïdes
– Formulation d'une poudre soluble effervescente

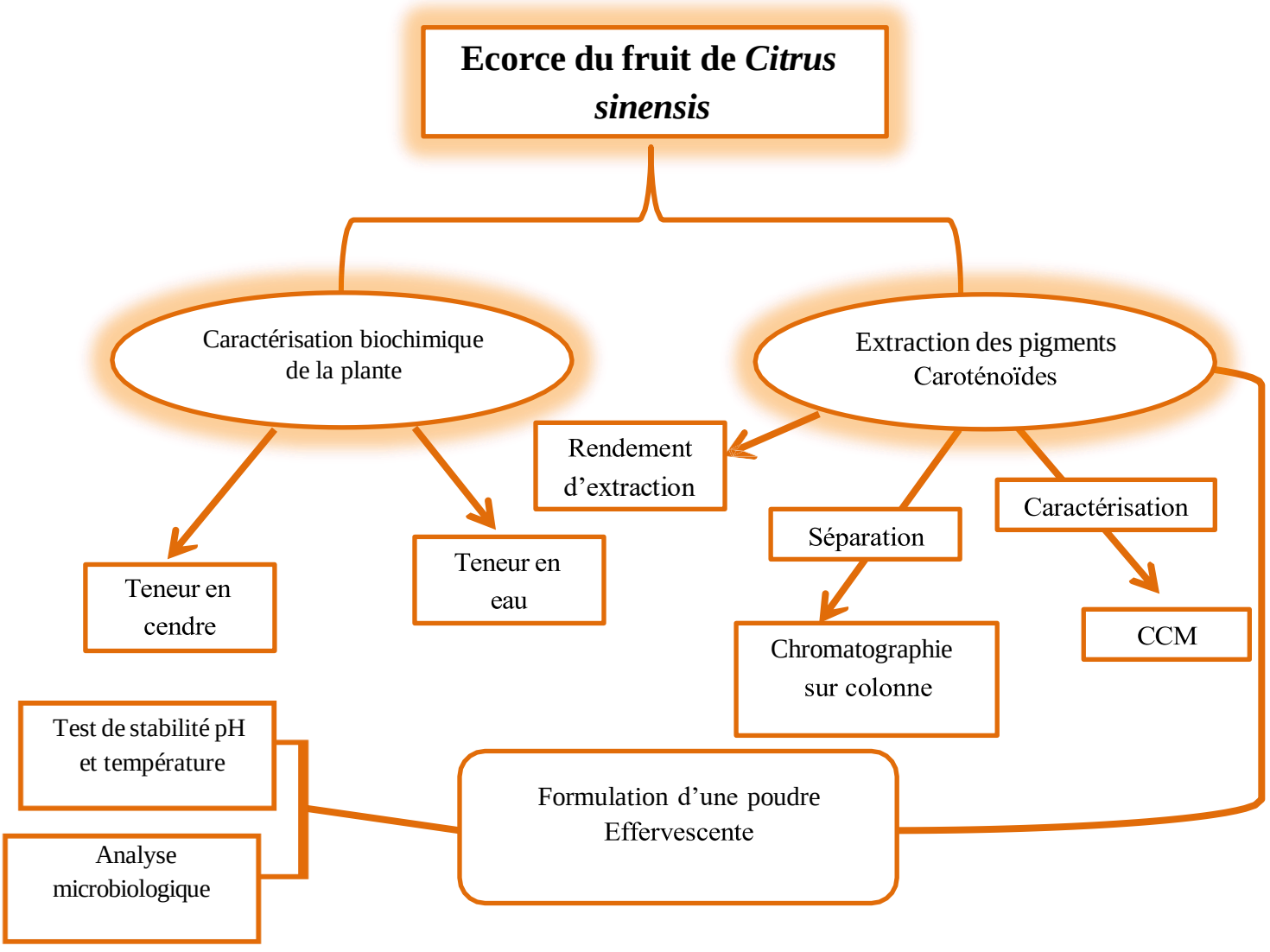


Figure 8: Schéma récapitulatif du protocole expérimental

IV.2. Matériel végétal

Les fruits de *Citrus sinensis* ont été récoltés au mois de février 2026 dans la région de Relizane, puis acheminés au laboratoire dans un sac en plastique propre hermétique.



Figure 9: Fruit de Citrus sinensis

La plante a été authentifiée, d'une part, par un botaniste de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et, d'autre part, par comparaison de ses caractères morphologiques avec ceux décrits dans la littérature.

IV.3. Caractérisation biochimique de la plante

IV.3.1 Teneur en eau

La teneur en eau est déterminée après une élimination totale de toute trace d'eau présente dans un matériel végétal, après une dessiccation dans une étuve isotherme réglée à 103± 2°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant de l'échantillon **(Audigie, 1978).** Des capsules vides sont séchées à l'étuve réglée à 103± 2°C pendant 15 min et laissées refroidir dans un dessiccateur. Un poids de 2 g est placé dans une capsule puis l'ensemble est mis dans une étuve réglée à la même température pendant 3 heures. Ensuite les capsules sont retirées de l'étuve et laissées refroidir dans un dessiccateur. Après refroidissement les capsules sont pesées. Ces dernières sont remises à l'étuve puis pesées encore une fois. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La teneur en eau ou d'humidité (H) est calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ H} = \frac{(\text{M1} - \text{M2})}{P} \text{ x } 100$$

M1 : masse initiale en g (Capsule + matière fraiche) avant dessiccation

M2 : masse finale en g (Capsule + matière sèche) après dessiccation

P : poids de la prise d'essai

Donc le taux de la matière sèche (MS) est conclu selon la relation suivante :

$$\mathbf{MS\ \% = 100 - H\%}$$

IV.3.2.Teneur en matière minérale

Selon la norme **(**NF V05-113,1972**),** la détermination de la teneur en cendre est basée sur l'incinération de toute matière organique contenue dans un matériel végétal sous l'effet d'une haute température qui est de 550±15°C. Une quantité de 2 g de chaque poudre pulvérisée de la plante est mise dans une capsule préalablement tarée. Ensuite l'ensemble est introduit dans un four à moufle réglé à une température égale à 550±25°C pendant 5 à 6 h jusqu'au changement de couleur de la poudre incinéré au grise claire ou blanchâtre. Après refroidissement les capsules sont retirées et leurs poids sont mesurés à nouveau. Le pourcentage de la matière organique (MO) est calculé selon l'équation suivante :

$$\mathrm{MO\%} = \frac{(M1 - M2)}{\mathrm{P}} \times 100$$

M1 : masse initiale en g (Capsule + matière sèche) avant incinération

M2 : masse finale en g (Capsule + cendre) après incinération

P : poids de la prise d'essai

Donc la teneur en cendre est calculée selon la relation suivante :

% de cendre = 100 - %MO

IV.4. Préparation de la matière végétale

L'écorce de Cs est lavée soigneusement à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les impuretés, puis séchée à l'air libre, à l'abri de la lumière, ou à l'étuve à basse température (≤ 40 °C). Après séchage, les échantillons sont finement broyés à l'aide d'un mortier ( ).

IV.5. Extraction des pigments caroténoïdes

IV.5.1. Principe

La poudre de l'écorce est mise en contact avec de l'éthanol absolu qui va les léser mécaniquement et va détruire les membranes des cellules dans le but d'en extraire les organites (les lipides et les lipoprotéines sont solubles dans l'éthanol). Le broyat ainsi obtenu est filtré et les pigments sont extraits grâce au dichlorométhane, solvant d'extraction. Après

une seconde filtration, le filtrat est chauffé afin de garder uniquement les pigments (Annexe 1).

IV.5.2. Mode opératoire

Une quantité de 10 g de poudre est mélangée avec 10 mL d'éthanol absolu. Le mélange est filtré dans un Erlenmeyer à l'aide de coton cardé. La pulpe récupérée est ensuite placée dans un bécher, à laquelle on ajoute 12 mL de dichlorométhane. L'ensemble est agité pendant deux minutes, puis soumis à une seconde filtration. Le filtrat obtenu est récupéré et soumis à une évaporation au bain-marie réglé à 95 °C. Des pigments colorés sont ainsi obtenus au fond de l'Erlenmeyer, puis redissous dans quelques millilitres d'un mélange de solvants polaire/apolaire (9:1) (Fig.10). Le rendement d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$R\ (\%) = \frac{masse\ de\ l'extrait\ obtenu\ (m)}{masse\ de\ la\ plante\ utilisée\ (p)}\ x\ 100$$

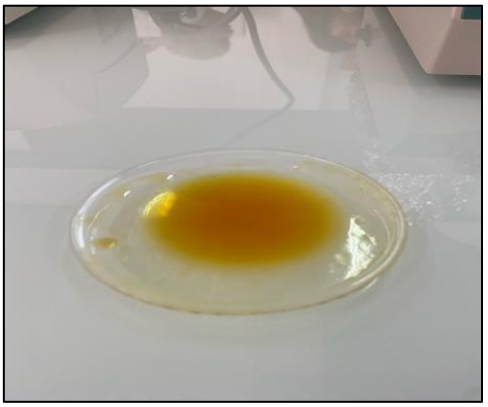


Figure 10: Aspect de l'extrait obtenu

IV.6. Identification par CCM

IV.6.1. Principe

La chromatographie sur couche mince permet une séparation des pigments dans un but d'analyse. La phase fixe est composée d'une couche solide sur laquelle est déposé un gel de silice servant de support et la phase liquide est constituée d'un éluant qui sépare les différents pigments. Plusieurs gouttes de solution de pigments sont déposées sur la phase fixe à l'aide d'un capillaire pour former une tâche. La plaque de silice est mise en contact avec la phase liquide qui va migrer et entrainer les pigments par capillarité. Une fois que la migration est

Terminée, on obtient plusieurs tâches colorées sur la plaque de silice correspondantes aux différents composants.

IV.6.2. Mode opératoire

Une plaque de silice d'environ 15 cm de longueur et 4 cm de largeur a été découpée. Une ligne de dépôt a été tracée à 1 cm du bord inférieur de la plaque, sur laquelle une goutte de pigments extraite a été déposée. La goutte a été séchée à l'aide d'un sèche-cheveux, et cette opération a été répétée six fois afin d'obtenir une tache visible. L'éluant a été préparé dans un volume total de 10 mL, composé de 40 % de solvant apolaire (éther de pétrole) et de 60 % de solvant polaire (éther diéthylique). Ce mélange a été versé dans une cuve de chromatographie, puis la plaque y a été introduite. L'ensemble a été couvert et maintenu à l'obscurité pendant environ une heure, jusqu'à ce que l'éluant atteigne le front supérieur de la plaque (Fig.11).



Figure 11: Analyse de l'extrait par CCM

IV.7. Séparation et vérification des pigments

IV.7.1. Séparation

Les pigments chlorophylliens ont été séparés à partir de l'extrait brut selon une méthode d'extraction liquide–liquide inspirée de Lichtenthaler (1987). Un volume de 5 mL de l'extrait végétal filtré a été introduit dans un tube à essai, puis mélangé à 10 mL d'hexane et à 5 mL d'eau distillée. Après une agitation douce pendant 1 à 2 minutes, le mélange a été laissé au repos pendant 5 à 10 minutes afin de permettre la décantation et la formation de deux phases distinctes. La phase organique supérieure, caractérisée par une coloration vert foncé intense,

contenait les pigments chlorophylliens et les caroténoïdes, tandis que la phase inférieure renfermait principalement les composés polaires. La phase supérieure a ensuite été récupérée et utilisée pour les analyses chromatographiques ultérieures (Fig.12).

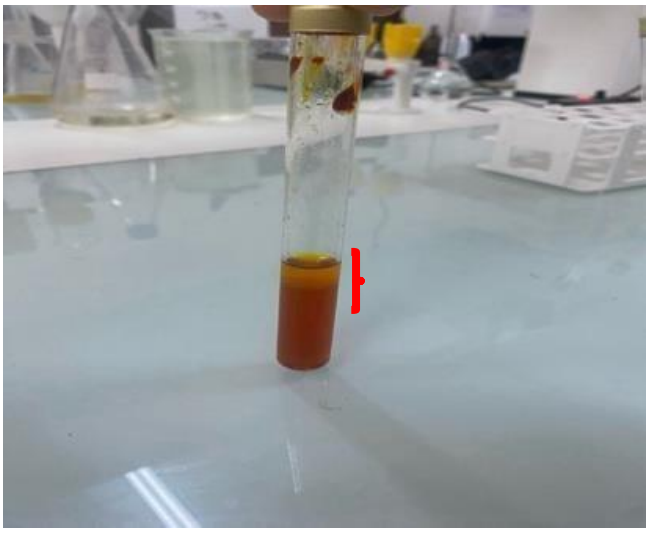


Figure 12:Séparation des caroténoïdes à partir de l'extrait brut

IV.7.2. Vérification de la séparation du β-carotène

Une quantité de 2 mg de β-carotène pur ou extrait est dissoute dans un volume de 10 mL d'hexane (ou d'un solvant apolaire adapté). Le tube est ensuite agité doucement pour assurer une dissolution complète, et la solution est protégée de la lumière (enveloppée dans du papier aluminium). Pour le blanc, le solvant pur (hexane) est placé dans une cuvette pour l'étalonnage du spectrophotomètre. La gamme de mesure est réglée entre 400 et 500 nm afin de déterminer l'absorbance maximale (λmax). Le β-carotène présente généralement un pic principal autour de 450 nm.

IV.7.3. Stérilisation des pigments extraits

L'extrait de caroténoïdes obtenu a été stérilisé par filtration membranaire sous vide à l'aide d'un dispositif de filtration équipé d'une membrane stérile de porosité 0,22 µm, permettant l'élimination des contaminants microbiens tout en préservant l'intégrité des composés sensibles à la chaleur. L'extrait a été transféré aseptiquement dans l'entonnoir de filtration, puis soumis à une aspiration sous vide jusqu'à récupération complète du filtrat dans un récipient stérile. Cette méthode de stérilisation à froid est particulièrement adaptée aux extraits riches en pigments naturels thermolabiles tels que les caroténoïdes (Fig.13).



Figure 13: Stérilisation de l'extrait caroténoïde par filtration

IV.8. Formulation d'une poudre hydrosoluble

La poudre obtenue est composée d'un principe actif, les caroténoïdes et des excipients, agents fonctionnels assurant la solubilité, la stabilité, le goût et la conservation du médicament. La composition est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 6: Composition de la poudre effervescente

Composant	Rôle	Quantité g/50 g
Caroténoïdes	Principe actif	0.25
Mannitol ou sorbitol	Agent hydrosolubilisant	25
Bicarbonate de sodium	Agent effervescent	18
Arome d'orange	Correcteurs de goût et d'odeur	0.5
Acide ascorbique	Agent de stabilité	6
Stéarate de magnésium	Agent anti-agglomérant	0.2

Pour le présent produit, la méthode du mélange direct a été utilisée. Elle consiste en une pesée précise des matières premières selon la formule de fabrication, suivie d'un mélange à l'aide d'un mélangeur rotatif. Après le mélange des composants, un tamisage du pré mélange a été effectué à travers un tamis de 0,8 mm (800 µm), afin d'éliminer les agglomérats éventuels et d'homogénéiser la granulométrie du mélange. Ensuite, une quantité de 6 g a été conditionnée dans des sachets stériles hermétiques, puis stockée à 5 °C, à l'abri de la lumière.

IV.1. Stabilité de la formulation

IV.9.1. Teneur en eau

La teneur en eau est déterminée selon la méthode décrite dans la Pharmacopée européenne (2023), avec une limite située entre 5,8% et 8%. La teneur d'humidité et calculer selon l'équation suivante :

$$\%H = \frac{(M1 - M2)}{P} \times 100$$

$$MS\ \% = 100 - H\%$$

IV.9.2. Influence de la température

Une étude de stabilité accélérée a été menée afin d'évaluer l'influence de la température sur la formulation effervescente naturelle à base de caroténoïdes **(Syamila et *al*., 2019)**. Les échantillons, conditionnés dans des sachets hermétiques et protégés de la lumière (Fig.14), ont été conservés à trois températures différentes : 4 °C (réfrigération), 25 °C (température ambiante) et 40 °C (conditions de vieillissement accéléré).

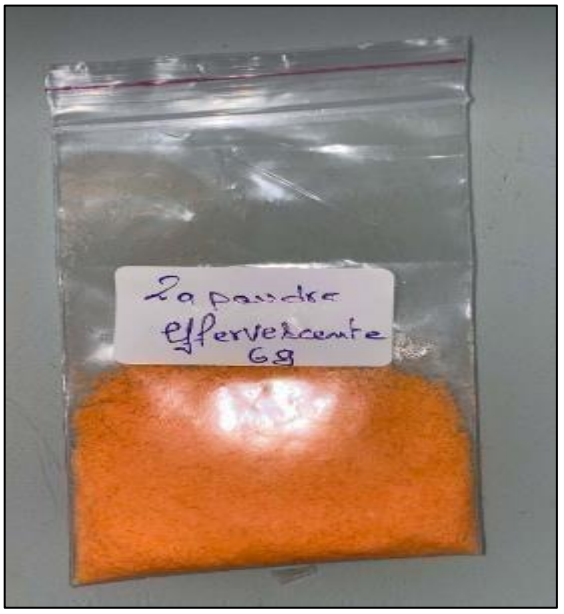


Figure 14. Conservation de la poudre formulée

Les analyses ont été réalisées au temps initial (J0), après 15 jours (J15) et après 30 jours (J30). À chaque intervalle, la teneur en caroténoïdes totaux a été déterminée par spectrophotométrie UV-Visible à 450 nm, et les résultats ont été exprimés en pourcentage de rétention par rapport à la teneur initiale.

$$\text{Rétention (\%)} = \frac{Ct}{C0} \times 100$$

où :

-C0 : concentration initiale en caroténoïdes à J0 (mg/g ou mg/100 g),

-Ct : concentration en caroténoïdes après un temps de stockage t (J15, J30).

IV.9.1. Analyse microbiologique

IV.9.1.1. Préparation de la dilution mère et des dilutions décimales

Une quantité de 1g de la poudre est placée dans un flacon stérile contenant 9 ml de diluant (eau physiologique) (Annexe 2), puis un volume de 1ml est introduit aseptiquement dans 9 ml du même diluant à l'aide d'une pipette pasteur stérile, la méthode est refaite de la même façon pour obtenir les dilutions 10^{-2} et 10^{-3}.

IV.9.1.2. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile

IV.9.1.2.1. Principe

La flore mésophile aérobie totale est l'ensemble des micro-organismes aptes à se multiplier à l'air à une température moyenne, plus précisément dans une température optimale de croissance située entre 25 et 40°C. Ils peuvent être des micro-organismes pathogènes ou d'altération.

IV.9.1.2.2. Mode opératoire

A partir des dilutions décimales allant de 10^{-3} à 10^{-1}. Un volume de 1 ml est porté aseptiquement dans une boite de pétri suivi de 20ml de gélose PCA (Annexe 02) fondue. L'ensemble est mélangé par des mouvements circulaires sous forme de 8. Après solidification, les boites sont incubées à 30°C pendant 72h. Les germes totaux se présentent sous forme lenticulaire en masse.

IV.9.1.3. Dénombrement des levures et des moisissures

IV.9.1.3.1. Principe

Les levures et les moisissures sont des champignons microscopiques dont la présence dans les produits alimentaires n'est pas souhaitable, car ils détruisent la qualité organoleptique (altération du goût, gonflement et mauvaise texture) **(Moreau et Belin, 1996).** Le milieu utilisé pour le dénombrement des levures et moisissures est le milieu PDA (Gélose Pomme de Terre Dextrose, en référence à son nom anglais Potato Dextrose Agar)

IV.9.1.3.2. Mode opératoire

Après avoir versé le milieu PDA (Annexe 02) dans les boites de pétri, un volume de 100 µL des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} de poudre formulée est placé puis étalé sur la surface solidifiée. Les boites sont ensuite incubées en position renversée 25°C pendant 72h. , les colonies de levures se présentent sous formes arrondies, lisses à contours réguliers et parfois pigmentées(couleur jaune, orange ou blanche) alors que les moisissures se présentent sous forme de colonies plus ou moins grandes comparativement aux colonies de levures. La lecture se fait sur des boites contenant de 10 à 100 colonies.

IV.9. Détermination de la durée de vie

La durée de vie des médicaments effervescents en sachets est généralement calculée selon la modélisation mathématique suivante :

$$\mathbf{C(t)}=C_0 e^{-0.007t}$$

Avec :

- C0=100%,
- t = temps en mois,
- 0.007 = constante de dégradation estimée.

IV.10. Etude statistique

L'échantillon a été analysé individuellement en triple exemplaire et les données sont rapportées en tant que moyenne ± écart type. Le test ANOVA est étudié suivi de post-hoc, Tukey. Une valeur moins de 0,05 est considérée comme significative.

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Caractérisation biochimique

Les caractéristiques biochimiques du matériel végétal sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 7: Caractérisation biochimique des écores de *Citrus sinensis*

	Teneur en eau (%)	**Teneur en matière sèche (%)**	**Teneur en cendre (%)**	**Teneur en matière organique (%)**
Ecorce de *Citrus sinensis*	77,66 ± 0,49	22,34 ± 0,49	12,25 ± 3,0	87,75 ± 3,0

A propos des résultats du tableau, le taux d'humidité est égal à 77,66 ± 0,49 % contre 22,34 ± 0,49 % de matière sèche.

Nos résultats sont proches à ceux constatés par Boumenikhra, (2015).ou les analyses des écorces du fruit des 3 espèces étudiées relèvent un taux d'humidité de 79.254 %, 65.682 % et 68.729% respectivement chez le *Citrus volkameriana*, le *Citrus aurantium,* le *Citrumelo* **(Boumenikhra, 2015)**.

L'eau est le constituent majeure de la plupart des aliments bien qu'elle n'apporte aucune valeur énergétique aux aliments, son existence joue un rôle très important car elle influence la structure, l'apparence, le gout des aliments et leur susceptibilité a la dégradation **(Pearson, 1976).** La détermination du contenu en eau est avant tout l'analyse générale la plus fréquente sur les denrées alimentaires **(Isengard, 2001).** Une faible teneur en eau explique une teneur élevée de matière sèche **(Benahmed,2007)**

La teneur en cendre de la poudre d'écorces de *citrus sinensis* a donné une valeur de 12,25 ± 3,0 contre 87,75 ± 3,0 % de la matière organique (Fig.15).



Figure 15: Cendres des écorces de Citrus sinensis

Cette teneur en cendres reste élevée par rapport à celle observée par Bentouati, (1987) mais proche de celle obtenue par **(Ghamri, 1979; Benabdelhafid et Hannani, 1996).** Ces différences peuvent être dues aux facteurs climatiques ou à variété végétale.

Les cendres sont des résidus inorganiques d'un produit après que la matière organique a été enlevée en la brûlant à des températures très élevées. Les cendres peuvent contenir une variété de composés inorganiques, y compris Sodium (Na), Potassium (K), calcium (Ca)…etc. La détermination du contenu en cendres peut être importante pour plusieurs raisons.

Les résultats trouvés sont supérieur à ceux obtenus par **(Boudraa ,2017),** qui ont trouvé une teneur en cendre de 1,43%. On peut conclure que le mode de séchage influence sur la teneur en cendres.

V.2. Extraction des caroténoïdes

L'extraction des pigments à partir de l'écorce d'orange (*Citrus sinensis*) a permis d'obtenir un extrait de texture huileuse, de couleur orange (Fig.16)



Figure 16: Aspect de l'extrait brut

Dans l'alimentation, de 70 à 90 % des lycopènes et β-carotènes proviennent des fruits et des végétaux **(Yahia et *al*., 2009).** On en trouve dans plusieurs fruits et plantes généralement de couleur rouge et orange. Ils peuvent être localisés dans divers types de tissus végétaux comme ceux des fruits (abricot, goyave, mangue,…), des légumes (tomate, potimarron,…), des racines (carotte), des feuilles (épinard), des fleurs (Cucurbita pepo) ou dans des cellules de micro-champignons (Blakeslea trispora) **(Cao-Hoang et *al*., 2009).**

V.3. Caractérisation chromatographique (CCM)

L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) de l'extrait brut de *Citrus sinensis* a permis de séparer plusieurs composés pigmentaires. Les valeurs du facteur de

rétention (Rf) sont comprises entre 0,40 et 0,90. Cinq taches distinctes ont ainsi été observées, avec les valeurs suivantes : Rf_1 = 0,40 ; Rf_2 = 0,56 ; Rf_3 = 0,88 ; Rf_4 = 0,90 ; et Rf_5 = 0,76 (Fig.17). La tache présentant la valeur de Rf la plus élevée (0,90) a été attribuée au β-carotène. Ce résultat est en accord avec le caractère fortement apolaire de ce pigment, qui interagit faiblement avec la phase stationnaire polaire (silice) et migre donc plus facilement avec la phase mobile.

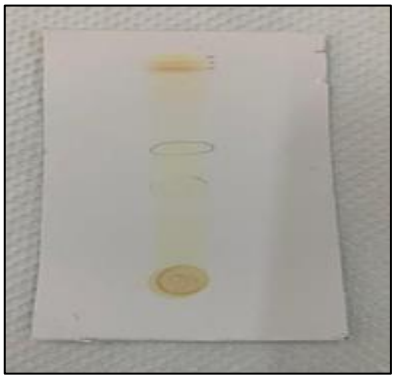


Figure 17: Migration de l'extrait brut sur plaque CCM

Nos résultats sont en accord avec ceux constatés auparavant, avec la même valeur du Rf = 0,90 dans les extraits de carotte, d'épinard et de courge (**Andriniaina et *al.*, 2008) .** L'analyse sur CCM montre de façon simple l'évidence de la présence de plusieurs molécules dans les extraits **(Andriniaina, 2007)**.

V.4. Séparation et vérification du β carotène

V.4.1. Séparation

La séparation du β-carotène par extraction liquide-liquide a conduit à la formation de deux phases distinctes : une phase supérieure (surnageante) et une phase inférieure. La phase supérieure a été récupérée par décantation à l'aide d'une ampoule à décanter. La phase organique obtenue se présentait sous la forme d'un extrait huileux de couleur orange foncé, caractéristique de la présence de caroténoïdes et avec un rendement de 1,91 % (Fig.18).

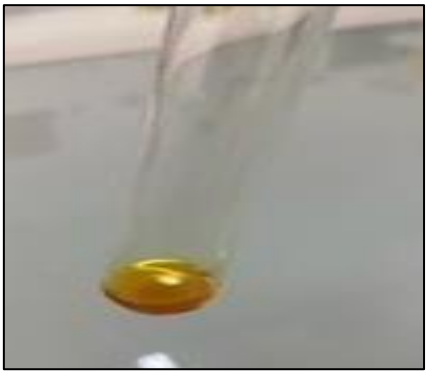


Figure 18:Séparation du pigment caroténoïde (β carotène)

Des résultats expérimentaux donnent les rendements d'extraction en caroténoïdes de 0,41% dans la carotte fraîche, 0,32% dans la mangue, 0,13% à partir des fruits de papaye et 0,10% dans la courge (**Andriniaina et *al.*, 2008).**

En effet, les matrices végétales et les paramètres d'extraction (par exemple, le solvant, la pression et la température) exercent une influence importante sur l'efficacité de l'extraction des caroténoïdes (**Nguyen, 2018).**

V.4.2. Vérification par spectrophotométrie

Après extraction du β-carotène, une vérification du pigment a été réalisée par spectrophotométrie UV-Visible. Une absorbance maximale supérieure à 1 a été observée à la longueur d'onde de 450 nm. À partir de cette valeur, l'absorbance commence à diminuer progressivement, jusqu'à devenir quasi nulle à partir de 700 nm (Fig.19).

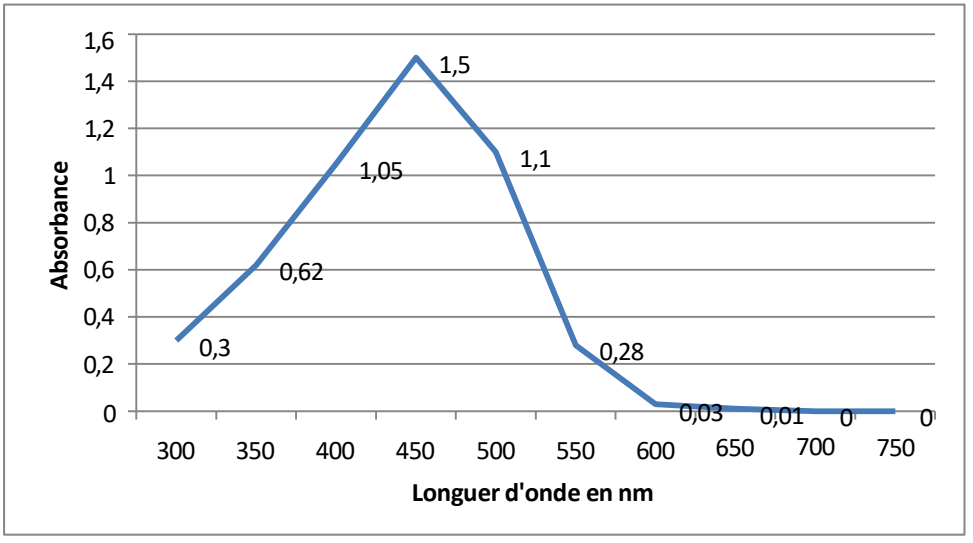


Figure 19: Calcul des absorbances de l'extrait pigmentaire en fonction de différentes longueurs d'onde

Nos résultats corroborent ceux déjà publiés, ou, les mesures du β-carotène ont été réalisées à une longueur d'onde de 450 nm. La teneur la plus élevée en β-carotène a été observée dans l'ananas, avec 123,36 microgrammes par millilitre, tandis que la teneur la plus faible a été observée dans le fruit du dragon, avec 2,253 microgrammes par millilitre **(Sari et Sari, 2022).**

Le spectre UV-Visible du β-carotène de la citrouille dans l'acétone a été enregistré entre 350 et 600 nm, et le maximum d'absorption a été obtenu à 453 nm **(Hagos et *al*., 2022).**

Le β-carotène présente une longueur d'onde d'absorption maximale (λmaxλ_{max}λmax) variant selon la nature et la polarité du solvant d'extraction, en raison des interactions entre le solvant et son système de doubles liaisons conjuguées. Dans les solvants apolaires comme l'hexane et le cyclohexane, le λmaxλ_{max}λmax est généralement observé à des valeurs légèrement plus élevées, tandis que dans des solvants plus polaires tels que le dichlorométhane et l'éthanol, de légers déplacements spectraux peuvent apparaître. Ces variations traduisent un effet solvatochromique influençant la stabilité électronique du β-carotène et doivent être prises en compte lors de son analyse spectrophotométrique **(Britton et al., 2004).**

V.5. Formulation de poudre effervescente

La formulation de la poudre effervescente combinée à l'extrait (bêta-carotène) a donné une poudre homogène d'une couleur orange clair séduisante servant d'indicateur visuel de la répartition uniforme de la substance active dans le mélange (Fig.20.a).

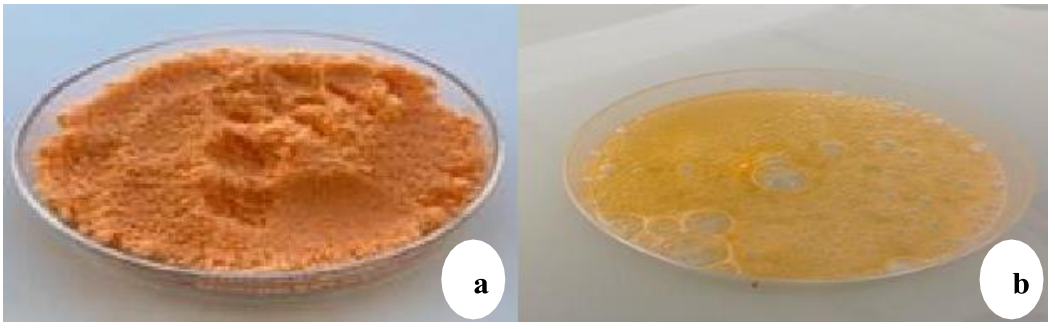


Figure 20. Poudre formulée. a: Aspect visuel, b : vérification de l'effet effervescent

Lors de la dissolution de la poudre dans l'eau, une solution claire effervescente et sans particules a été observée, ce qui témoigne de l'efficacité de la préparation et de la

consistance uniforme du mélange des ingrédients (Fig.20.b).

V.6. Stabilité de la formulation

V.6.1. Teneur en eau

Les résultats de l'évaluation de humidité dans la poudre préparé en indiquent 2,85 ± 0,5 % bien que ce chiffre soit en-dessous de la plage définie par le protocole (5,8 % - 8 %), il est jugé très encourageant dans une perspective pharmaceutique, ce rapport garantit la constance des éléments effervescents et prévient la dégradation du principe actif (caroténoïdes),

Une humidité trop importante peut favoriser la prolifération de bactéries ou de champignons, de sorte qu'un produit peut pourrir après une semaine ou deux dans les rayons, ce qui peut être catastrophique pour les médicaments transportés dans des zones reculées.
Lorsque l'humidité relative (HR) de l'air est élevée, elle peut augmenter l'humidité du médicament, surtout pour les formes pharmaceutiques hygroscopiques comme les poudres, granulés, comprimés et médicaments effervescents. L'humidité relative (HR) est un paramètre influençant la stabilité des médicaments. Cela est lié à l'activité de l'eau. Il a ainsi été montré que l'augmentation de la teneur en humidité dans un système de poudre augmentait la dégradation des principes actifs et/ou des excipients **(Van Maanen et *al*., 1999)**

En effet, une augmentation de l'HR conduit à une augmentation de la quantité d'oxygène dissout disponible pour participer à des réactions d'oxydation ainsi que la quantité d'eau à l'origine des phénomènes d'hydrolyse **(Hiatt et *al*., 2010).**

L'hydrolyse est un phénomène dans lequel l'eau conduit à la rupture d'une ou plusieurs liaisons chimiques d'un composé. C'est l'une des voies majeures de dégradation des médicaments. Les fonctions chimiques acides carboxyliques, les esters, les amides, les lactones, les lactames, les imides et les carbamates sont les principaux groupements fonctionnels qui confèrent au PA une sensibilité accrue à l'hydrolyse **(Waterman et *al*., 2002).**

V.6.2. Influence de la température

L'analyse statistique (ANOVA à deux facteurs) montre que la température de stockage, le temps de conservation, ainsi que leur interaction, influencent significativement la rétention du composé étudié ($p < 0,001$). À J0, aucune différence significative n'est observée entre les températures (toutes notées a), avec une rétention de 100 %, indiquant une stabilité initiale complète. À J15 et J30, des différences significatives apparaissent entre les groupes : la

conservation à 4°C maintient la meilleure stabilité (99 % puis 97 %), suivie de 25°C (97 % puis 94 %), tandis que 40°C entraîne la diminution la plus importante (92 % puis 85 %).

Ce test confirme qu'une augmentation de la température accélère significativement la dégradation du composé et que le stockage à basse température est le plus favorable à sa conservation.

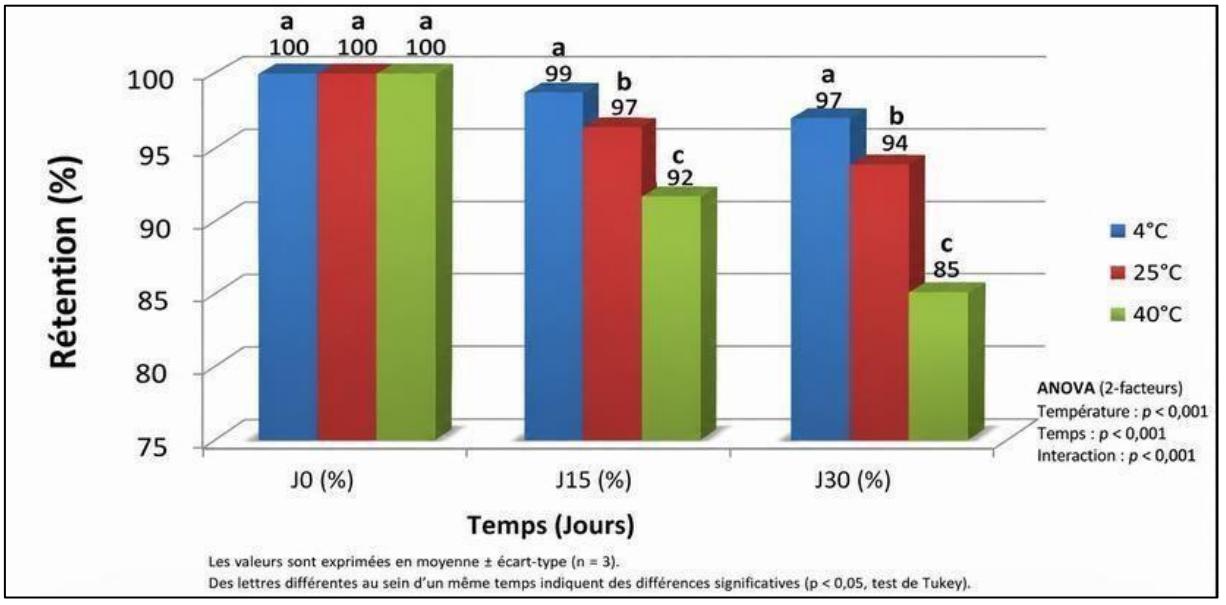


Figure 21. Pourcentage de rétention du Béta carotène dans la formulation en fonction du temps et des variations thermiques (Absence de différences significatives entre les groupes). Les lettres différentes (a, b, c) indiquent des différences statistiquement significatives entre températures au même temps de stockage (test de Tukey, $p < 0,05$),

Par rapport au lycopène, le β-carotène est moins sensible à la température. La qualité du β-carotène n'est presque pas changée à température inférieure à 60°C. Le traitement thermique du β-carotène all-trans à température comprise entre 80 et 100°C provoque les 13-cis- et 15-cis-isomérisations du β-carotène **(Kuki et *al*., 1991; Von Doering et *al*., 1995).**

Il est à noter que, l'augmentation de la température facilite donc la survenue des réactions chimiques à l'origine de la décomposition thermique des principes actifs (**Le Basle et *al*., 2020).**

V.6.3. Analyse microbiologique de la formulation

Après une incubation durant 48 heures à 25°C, le résultat de l'analyse microbiologique de la préparation révèle que le nombre total de la FTAM était de 7 x 10^3 UFC/g (Fig.22.a).

En mettant en parallèle cette mesure avec les critères microbiologiques précisés, il s'est avéré que le produit est conforme aux normes, étant donné que le résultat se situe largement en dessous du seuil maximal autorisé, 10^5 UFC/g **(JORA. N°35, 27-05-1998).**

La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) présent dans un produit ou sur une surface. L'unité de dénombrement est l'Unité Formant Colonie, car une colonie observable, sur la surface du milieu gélosé est le résultat d'un microorganisme vivant isolé à partir d'une spore ou encore d'une association de microorganismes **(ABLAD, 2010).**

En revanche, une absence totale des levures et des moisissures a été constatée après incubation des boites ensemencées par la formulation à différentes concentrations (Fig.22.b)**.** Nous constatons que le produit est « conforme » aux normes, étant donné que le résultat se situe largement en dessous du seuil maximal autorisé (10^3 UFC/g) **(JORA. N°35, 27-05-1998)**.



Figure 22. Analyse microbiologique. a : Dénombrement de la FTAM, b : Dénombrement des levures et des moisissures.

V.1. Durée de vie de la préparation

La simulation de la durée de vie de la formulation effervescente à base de caroténoïdes, basée sur un modèle cinétique du premier ordre et les résultats expérimentaux obtenus à 25

°C, permet d'estimer une durée de conservation d'environ 2 mois pour un seuil de rétention de 90 %. Cette durée est fortement influencée par la température de stockage, confirmant la sensibilité thermique des caroténoïdes malgré la présence d'acide ascorbique comme agent antioxydant.

En outre, plusieurs facteurs peuvent influencer la durée de vie d'un médicament, à savoir, l'emballage actif, il est défini comme un emballage dans lequel des composants sont inclus, à l'intérieur ou à la surface du matériau le constituant, pour améliorer ses performances. Un tel conditionnement améliore la durée de conservation de la substance contenue. Cette action peut être obtenue par l'ajout de piégeurs d'oxygène de régulateurs d'humidité ou d'agents antimicrobiens ou antioxydants **(Sanches-Silva et *al*., 2014).**

La stabilité d'un produit pharmaceutique doit finalement prendre en compte l'emballage, car celui-ci influence la durée de conservation du produit tel qu'il est utilisé. L'emballage joue plusieurs rôles, pouvant améliorer ou, dans certains cas, réduire la durée de conservation. Ces effets incluent la modification du transfert des substances volatiles ou gazeuses entre l'intérieur et l'extérieur de l'emballage et l'apport d'impuretés extractibles et relargables dans la forme pharmaceutique **(Huynh-Ba, 2009).**

Le marché des caroténoïdes est en pleine croissance. Ces composés sont utilisés dans certains compléments fonctionnels alimentaires, aussi bien pour les êtres humains que pour les animaux, dans des produits cosmétiques et également dans de nombreux colorants naturels destinés à l'agroalimentaire. Le lycopène et le β-carotène sont respectivement codés E 160d et E 160a par la Directive de l'Union Européenne pour les additifs alimentaires (89/398/CEE) qui a été complétée par un règlement ((CE) No 1333/2008).

Sous le nom de pro-vitamine A, le β-carotène est plus utilisé que le lycopène en agro-alimentaire. Le β-carotène est autorisé dans l'Union Européenne depuis plus de 10 ans en tant qu'additif alimentaire **(Aguilar et *al*., 2012).** D'après BCC Research, l'utilisation du β-carotène comme colorant ou complément de santé alimentaire pourrait faire croître ce marché jusqu'à 261 million d'euros en 2018 **(März 2011).**

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette étude a permis de mettre en valeur les écorces de *Citrus sinensis* en tant que source naturelle de caroténoïdes, en particulier le β-carotène, par le biais de leur extraction, de leur caractérisation et de leur intégration dans une poudre effervescente présentant un intérêt pharmaceutique. Cette étude s'inscrit dans une démarche visant à valoriser les sous-produits agroalimentaires et à explorer des alternatives naturelles aux colorants synthétiques.

Les diverses études physicochimiques effectuées sur les écorces ont révélé une composition biochimique notable, marquée par une abondance en substances organiques et en pigments naturels. L'extraction effectuée a conduit à l'obtention d'un extrait pigmentaire huileux de teinte orange distinctive. L'analyse chromatographique sur couche mince (CCM) a validé la détection de divers pigments caroténoïdes, en particulier le β-carotène, reconnu par les bandes colorées notées.

La composition de la poudre effervescente enrichie en caroténoïdes a démontré des propriétés satisfaisantes et une stabilité appréciable. Les examens microbiologiques effectués ont aussi démontré une qualité conforme aux normes en vigueur, attestant de la sécurité du produit obtenu.

Par conséquent, notre supposition est confirmée, car les pelures de *Citrus sinensis* constituent une source naturelle exploitable de caroténoïdes qui pourrait être appliquée dans les secteurs pharmaceutique, nutraceutique et agroalimentaire.

Finalement, cette recherche a facilité l'approfondissement de nos connaissances concernant la valorisation des déchets agroalimentaires, les méthodes d'extraction des pigments naturels, ainsi que les études physicochimiques et microbiologiques. Ce travail offre aussi des opportunités prometteuses pour l'élaboration de produits naturels à partir de caroténoïdes et la diminution de l'impact écologique des résidus organiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abano, E.E., Quayson, E.T., Bosompem, M., Quarm, M., 2020**. β- Carotene-fortified gari : Processing variables effect on nutritional and sensory qualities. Journal of Food Process Engineering 43. https://doi.org/10.1111/jfpe.13322
- **Abobatta W F.(2019).** Nutritional Benefits of Citrus Fruits. Am J Biomed Sci & Res. 2019 - 3(4). AJBSR.MS.ID.000681. DOI: 10.34297/AJBSR.2019.03.000681.
- **Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D. M., Gundert-Remy, U., König, J., Lambré, C., Leblanc, J.-C., et al. (2012).** Scientific Opinion on the reevaluation of mixed carotenes (E 160a (i)) and beta-carotene (E 160a (ii)) as a food additive. The EFSA Journal, 10, 3, 2593.
- **Assadpour, E., Dima, C., Jafari, S.M., 2020.** Fondamentaux de la nanotechnologie alimentaire, dans : Manuel de la nanotechnologie alimentaire. Elsevier, pp. 1 –35. https://doi.org/10.1016/B978-0-12- 815866-1.00001-7
- **Bagchi, T.B., Chattopadhyay, K., Sivashankari, M., Roy, S., Kumar, A., Biswas, T., Pal, S., 2021.** Effect of different processing technologies on phenolic acids, flavonoids and other antioxidants content in pigmented rice. Journal of Cereal Science 100, 103263. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103263
- **Bakan E, Akbulut ZT, Inanç AL.(2014).** Carotenoids in foods and their effects on human health. Akademik Gıda;12:61-68.
- **Boumenikhra K (2015).** Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles de trois espèces d'agrumes. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Département de biotechnologie. Universite de Blida 1. Algérie.
- **Burton GW et Ingold KU. (1984).** beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science 224:569–573.
- **Cakmakci, S., Tahmas-Kahyaoglu, D., Erkaya, T., Cebi, K., Hayaloglu, A .A., 2014.** β -Carotene Contents and Quality Properties of Set Type Yoghurt Supplemented with Carrot Juice and Sugar. Journal of Food Processing and Preservation 38, 1155
- **Cao-Hoang, L. et Waché, Y. (2009).** Carotene dispersion in liquid media In: beta-Carotene, Dietary Sources, Cancer, and Cognition. Hauppauge: Novapublishers.
- **Castro-Puyana M, Pérez-Sánchez A, Valdés A, Ibrahim OHM, Suarez-Álvarez S, Ferragut JA, Micol V, Cifuentes A, Ilbáñez E, García-Cañas V.(2016)** Pressurized liquid extraction of Neochloris oleoabundans for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity. Food Research International, in press. DOI:

Références bibliographiques

10.1016/j.foodres.2016.05.021.

- **Cavalcanti, R.N., Koshima, C.C., Forster-Carneiro, T., Gomes, M., Rostagno, M.A., Prado, J.M., Meireles, M.A.A., 2022.** Utilisations et applications d'extraits issus de sources naturelles
- **Curhan SG, Stankovic KM, Eavey RD, Wang M, Stampfer MJ, Curhan GC.(2015).** Carotenoids, vitamin A, vitamin C, vitamin E, and folate and risk of self-reported hearing loss in women. American Journal Clinical Nutrition;102:1167-1175.
- **Cvetkovic, Dragan J.; Nikolic, Goran S.(2017).** *Carotenoids || Biotechnological Production of Carotenoids and Their Applications in Food and Pharmaceutical Products. , 10.5772/65523(Chapter 8).*
- **Etebu E, Nwauzoma A B.(2014).**A review on sweet orange (Citrus Sinensis Osbeck): Health, diseases, and management. Am. J. Res. 2014, 2, 33–70.
- **European Pharmacopoeia Commission (2023).** *European Pharmacopoeia*, 11th Edition, chapitre **2.2.32. Loss on drying**, Strasbourg: Council of Europe.
- Favela-Hernández,J.González-Santiago,O,Mónica,A.Ramírez Cabrera,Patricia C.Esquivel-Ferriño,María del Rayo Camacho Corona.(2016) .Chemistry and Pharmacology of Citrus sinensis ,Molecules 2016, 21, 247; doi :10.3390 /molecules 21020247.
- **Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H. (2006).** Effects of salinity onbeta-carotene production by dunaliella tertiolecta DCCBC26 isolated fromthe urmia salt lake, north of Iran. Bioresource Technology, 97: 2453–2456.
- **Frengova, G., Simova, E., Beshkova, D. (2004).** Use of whey ultrafiltrate as asubstrate for production of carotenoids by the yeast rhodotorula rubra.Applied Biochemistry and Biotechnology, 112: 133–141.
- **Frengova, G., Simova, E., Beshkova, D. (2004).** Use of whey ultrafltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast rhodotorula rubra. Applied Biochemistry and Biotechnology, 112: 133–141.
- **Gallouin F, Tonelli N, François G, (2013).** Des fruits et des graines comestibles du monde entier, Ed Lavoisier, p 545Gattuso, G.; Barreca, D.; Gargiulli, C.; Leuzzi, U.; Caristi, C. Flavonoid composition of Citrus juices. Molecules 2007, 12, 1641–1673.
- **Garcia-Lor A, Curk F, Morillon R, Ancillo G, Luro F, Navarro L, Ollitrault P (2012)** Nuclear phylogeny within Citrus (Rutaceae) and four related genera Ann Bot

Références bibliographiques

- **Gattuso G, Barreca D, Gargiulli, C, Leuzzi, U,Caristi C.(2007)** Flavonoid composition of Citrus juices. Molecules 2007, 12, 1641–1673.
- **Goodwin TW. (1980).** —The Biochemistry of the Carotenoids.‖ Vol. 1: —Plants.‖ New York: Chapman and Hall, p 203.
- **Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A.C., Stahl, W., Tang, G., Thurnham, D., Yin, S., Biesalski, H.K., 2010.** β -Le carotène est un Source importante de vitamine A pour l'humain. Le Journal of Nutrition 140, 2268S-2285S. https://doi.org/10.3945/jn.109.119024
- **Hagos M, Redi-Abshiro M, Chandravanshi BS, Yaya EE.(2022).** Development of Analytical Methods for Determination of *β*-Carotene in Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Flesh, Peel, and Seed Powder Samples. Int J Anal Chem. 11; 9363692.
- **Hernández A, Herrera-Palau R, Madroñal JM, Albi T, López-Lluch G, Perez-Castiñeira JR, Navas P, Valverde F, Serrano A,(2016) .**
- **Hiatt AN, Taylor LS, Mauer LJ. (2010).** Influence of Simultaneous Variations in Temperature and Relative Humidity on Chemical Stability of Two Vitamin C Forms and Implications for Shelf Life Models. J Agric Food Chem. 58(6):3532-40.
- **Huet R. (1991)** Les huiles essentielles d9agrumes. D-Technologie d'extraction. Fruits, 46, 551-564.
- **Huynh-Ba, K. (2009).** Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development || Understanding and Predicting Pharmaceutical Product Shelf-Life. , 10.1007/978-0-387-85627-8(Chapter 6), 115–135.
- **Jati, I.R.A.P., Darmoatmodjo, L.M.Y.D., Suseno, T.I.P., Ristiarini, S., Wibowo, C., 2022.** Effect of Processing on Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, Physicochemical, and Sensory Properties of Orange Sweet Potato, Red Rice, and Their Application for Flake Products. Plants 11, 440. https://doi.org/10.3390/plants11030440
- **Jomova K, Valko M (2013).** Effets protecteurs des caroténoïdes pour la santéet leurs interactions avec d'autres antioxydants biologiques. Eur J MedChimie 70 : 102–110.
- **Jomova K, Valko M.(2013).** Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. European Journal of Medicinal Chemistry.;70:102- 110.
- **Joseph, S., Anandane, A. (2011).** Process for Production of High Purity Beta- Carotene and Lycopene Crystals From Fungal Biomass. Patent No. PCT/ IN2011/000343

Références bibliographiques

- **Kaiser P. (2009).** Entwicklung, Optimierung und Anwendung einer effizienten ana-lytischen Methode zur Bestimmung von carotineiden aus Bakterien undHefen. Dissertation. Dissertation. Freien Universität Berlin.
- Kaiser P. Entwicklung, Optimierung und Anwendung einer effzienten ana- lytischen Methode zur Bestimmung von carotineiden aus Bakterien und Hefen. Dissertation. Dissertation. Freien Universität Berlin, 2009
- **Khan Niazi M, Hassan F, ul Hassan Zaidi S, Z, Aslam1 A, Ain Shahid1Q, Arooj W, Talha N, Ghaffar S, Afzal Sahi1 A , Naeem1 N.(2023)** Nutritional Potential of Citrus Sinensis and its Pharmacological Action: A Concise Review PAKISTAN JOURNAL OF HEALTH SCIENCES.
- **Kobylewski, S., Jacobson, M.F., 2012**. Toxicologie des colorants alimentaires. Revue internationale de Santé au travail et environnementale 18, 220–246. https://doi.org/10.1179/1077352512Z.0000000003
- **Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V.(2020).** Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. J Pharm Sci. 109(1):169-90.
- **Lessin W.J, Catigani G.I, Schwartz S.J. (1997).** Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. J Agric Food Chem 45:3728–3732.
- **Loubar Katia et Mebarki Yasmina (2020).** Intérêt des sous-produits d'agrumes, Génie Alimentaire, Université A. MIRA de Bejaia. Algérie.
- **Loubar, Katia; Mebarki, Yasmina; Belkhiri-Beder, W ; promotrice (université A/Mira Bejaia, 2020)** l'intérêt des sous-produits d'agrumes, en mettant l'accent sur leurs antioxydants et les méthodes d'extraction.
- **Marchal, L., Mojaat-Guemir, M., Foucault, A., Pruvost, J. (2013).** Centrifugalpartition extraction of β-carotene from dunaliella salina for efficient andbiocompatible recovery of metabolites. Bioresource Technology, 134:396–400.
- **Marchal, L., Mojaat-Guemir, M., Foucault, A., Pruvost, J. (2013).** Centrifugal partition extraction of β-carotene from dunaliella salina for effcient and biocompatible recovery of metabolites. Bioresource Technology, 134: 396–400.
- **März, U. (2011).** The Global Market for Carotenoids. Food And Beverage. Wellesley, USA.
- **Mogedas, B., Casal, C., Forján, E., Vílchez, C. (2009).** Beta-carotene produc-tion enhancement by UV-A radiation in dunaliella bardawil cultivated inlaboratory

reactors. Journal of Bioscience and Bioengineering, 108: 47–5.

- **Mogedas, B., Casal, C., Forján, E., Vílchez, C. (2009).** Beta-carotene produc-tion enhancement by UV-A radiation in dunaliella bardawil cultivated in laboratory reactors. Journal of Bioscience and Bioengineering, 108: 47–51
- **Mueller, L., Boehm, V., 2011.** Antioxidant Activity of β -Carotene Compounds in Different in Vitro Assays. Molecules 16, 1055 –1069. https://doi.org/10.3390/molecules16021055
- **Mykolaiovych, R. O., Volodymyrovyc, T. Y., Ivanovyvh, C. S., Hryhorovyc, T. V., Viktorovych, D. S., Pavlivna, K. V. (2008).** Device for Concentration of Carotene-Containing Biomass of Micro-Alga Dunaliella salina. Patent No. UA20070008450U 20070723.
- **Nicol, N., Mary Abraham, L., Padma Ishwarya, S., Nisha, P., 2021.** Spray- dried microcapsules of red palm olein- flaxseed oil blend: Development, physicochemical characterization, and evaluation of its potential applications as a fat replacer and β- carotene fortificant in cupcakes. Journal of Food Processing and Preservation 45. https://doi.org/10.1111/jfpp.15663
- **Nicol M, Maudet M.(2000).** Caroténoïdes et vitamine A. Actualités. Oléagineux, Corps Gras, Lipides. 7(3), 266-270.
- **Nicolosi E., Deng Z.N., Gentile A., La Malfa S., Continella G. and Tribulato E. 2000.** Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theor. Appl. Genet. 100: 1155-1166.
- **Niranjana R, Gayathri R, Nimish Mol S, Sugawara T, Hirata T,Miyashita K et al. (2015).** Les caroténoïdes modulent les caractéristiques decellules cancéreuses. J Funct Foods 18 : 968–985
- **Niranjana R, Gayathri R, Stephen NM, Sugawara T, Hirata T, Myashita K, Ganesan P. (2015).** Carotenoids modulate the hallmarks of cancer cells. Journal of Functional Foods.;18:968-985.
- **Nishino H, Murakoshi M, Tokuda H, Satomi Y.(2009).** Cancer prevention by carotenoids. Archives of Biochemistry and Biophysics;483:165-168.
- **Ollitrault P., Jacquemond C., Dubois C., Luro F., 1999.** Citrus. In: Genetic diversity of cultivated tropical plants. Edited by Hamon P., Seguin M., Perrier X., Glaszmann J.C. Enfield, Science Publishers. Montpellier, pp. 89-111
- **Papanikolaou, S., et al. (2008).** Biotechnological valorization of raw

Références bibliographiques

glyceroldischarged after biodiesel (fatty acid methyl esters) manufacturing pro-cess: production of 1,3 propanediol, citric acid and single cell oil. Biomassand Bioenergy, 32: 60–71.

- **Papanikolaou, S., et al. (2008).** Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after biodiesel (fatty acid methyl esters) manufacturing pro- cess: production of 1,3 propanediol, citric acid and single cell oil. Biomass and Bioenergy, 32: 60–71.
- **Perez, C. J., et al. (2001).** Method for the Production of Beta-Carotene. Patent No. PCT/ES2001/000284.
- **Pisal, D. S., Lele, S. S. (2005).** Carotenoid production from microalga Dunaliella salina. Indian Journal of Biotechnology, 4: 476–483.
- **Rivera, S., Canela, R., 2012.** Influence of Sample Processing on the Analysis of Carotenoids in Maize. Molecules 17, 11255 –11268. https://doi.org/10.3390/molecules170911255
- **Saenge, C., Cheirsilp, B. Suksaroge, T. T., Bourtoom, T. (2011).** Potentialuse of oleaginous red yeast Rhodotorula glutinis for the bioconversionof crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. ProcessBiochemistry, 46: 210–218.
- **Saenge, C., Cheirsilp, B. Suksaroge, T. T., Bourtoom, T. (2011).** Potential use of oleaginous red yeast Rhodotorula glutinis for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochemistry, 46: 210–218.
- **Sanches-Silva A, Costa D, Albuquerque TG, Buonocore GG, Ramos F, Castilho MC, et al.(2014).** Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review. Food Addit Contam Part -Chem Anal Control Expo Risk Assess.31(3):374-95.
- **Sari E.M, Sari A.E. (2022).** Chemical analyze of beta-carotene in Indonesia local fruit. Sainstek: Jurnal Sains dan Teknologi 14 (1), ISSN: 2085-8019
- **Shahidi F, Ambigaipalan P. (2015).** Novel functional food ingredients from marine sources. Current Opinion in Food Science;2:123-129.
- Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. J. Funct. Foods 2015, 18, 820–897.
- **Sidana J, Saini V, Dahiya S, Nain P, Bala S (2013).** A review on citrus 'the boon of nature. Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 18: 20-27 .
- **Simova, E. D., Frengova, G. I., Beshkova, D. M. (2004).** Synthesis of carot-enoids by Rhodotorula mucilaginosa GED8 co-cultured with yogurtstarter cultures in whey

Références bibliographiques

ultrafiltrate. Journal of Industrial Microbiologyand Biotechnology, 31: 115–121.

- **Simova, E. D., Frengova, G. I., Beshkova, D. M. (2004).** Synthesis of carot- enoids by Rhodotorula mucilaginosa GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafltrate. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31: 115–121.
- **Sinisa, P., Marova, I., Haronikova, A., Kostovova, I., Breierova, E. (2013).** Production of biomass, carotenoids and other metabolites by several redyeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a com-parative screening study. Annual Microbiology, 63: 1537–1551.
- **Sinisa, P., Marova, I., Haronikova, A., Kostovova, I., Breierova, E. (2013).** Production of biomass, carotenoids and other metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a com- parative screening study. Annual Microbiology, 63: 1537–1551.
- **Syamila, M., Gedi, M. A., Briars, R., Ayed, C., & Gray, D. A. (2019).** Effect of temperature, oxygen and light on the degradation of β-carotene, lutein and α-tocopherol in spray-dried spinach juice powder during storage. Food Chemistry, 284, 188–197.
- **Tang, G., Hu, Y., Yin, S., Wang, Y., Dallal, G.E., Grusak, M.A., Russell, R.M., 2012.** Retracted: β -Carotene in Golden Rice is as good as β-carotene in oil at providing vitamin A to children. The American Journal of Clinical Nutrition 96, 658
- **Thakur, M., Azmi, W. (2013).** Extraction and purifcation of β-carotene from flamentous fungus Mucor azygosporus. Annals of Phytomedicine, 2: 79–84.
- **Thakur, M., Azmi, W. (2013).** Extraction and purification of β -carotene fromfilamentous fungus Mucor azygosporus. Annals of Phytomedicine, 2: 79–84.
- **Trono, D., 2019.** Carotenoids in Cereal Food Crops: Composition and Retention throughout Grain Storage and Food Processing. Plants 8, 551. https://doi.org/10.3390/plants8120551
- USDA Foreign Agricultural Service - Citrus: World Markets and Trade (USDA Foreign Agricultural Service) (USDA Foreign Agricultural Service.
- **Van Maanen MJ, Brandt AC, Damen JMA, Beijnen JH.(1999).** Degradation study of thiotepa in aqueous solutions. Int J Pharm.179(1):55-64.
- **Venil, C. K., Zakaria, Z. A., Ahmad, W. A. (2013).** Bacterial pigments and theirapplications. Process Biochemistry, 48: 1065–1079.

Références bibliographiques

- **Venil, C. K., Zakaria, Z. A., Ahmad, W. A. (2013).** Bacterial pigments and their applications. Process Biochemistry, 48: 1065–1079.
- **Von Lintig, J., 2020.** Caroténoïdes, dans : Présent Connaissances en nutrition. Elsevier, pp. 531 –549. https://doi.org/10.1016/B978-0-323- 66162-1.00032-9
- **Von Lintig, J., Hessel, S., Isken, A., Kiefer, C., Lampert, J.M., Voolstra, O., Vogt, K., 2005.** Vers une meilleure compréhension des caroténoïdes Métabolisme chez les animaux. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Base moléculaire de Maladie 1740, 122–131.
- **Waterman KC, Adami RC, Alsante KM, Antipas AS, Arenson DR, Carrier R, et al.(2002).** Hydrolysis in Pharmaceutical Formulations. Pharm Dev Technol.7(2):113-46.
- **Xinde, X., Mingqing, J., Dong, S., Bin, S., Leming, Y. (2012).** Method of Producing Natural β-Carotene By Fermentation And Use Thereof. Patent application PCT/CN2012/000655
- **Yahia, E. M. et Ornelas-Paz, J. d. J. (2009).** Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. Fruit and Vegetable Phytochemicals. L. A. d. l. Rosa, E. Alvarez-Parrillaet G. A. González-Aguilar, Wiley-Blackwell 177-222.
- **Zhang X, Zhao W, Hu L, Zhao L, Huang J.(2011).** Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPARc) in K562 cancer cells. Archives of Biochemistry and Biophysics.;512:96-106.
- **Zhen, Li., Hiaogin, Ma., Aifen, Li., Chengwu, Zhang. (2012).** A novel poten-tial source of β-carotene: eustigmatos cf. polyphem (Eustigmatophyceae)and pilot β-carotene production in bubble column and flat panel photo-bioreactors. Bioresource Technology, 117: 257–226.
- **Zhen, Li., Hiaogin, Ma., Aifen, Li., Chengwu, Zhang. (2012).** A novel poten- tial source of β-carotene: eustigmatos cf. polyphem (Eustigmatophyceae) and pilot β-carotene production in bubble column and fat panel photo- bioreactors. Bioresource Technology, 117: 257–226
- **Zhenxin, Gu., Chen, Deming., Han, Yongbin., Chen, Zhigang., Gu, Feirong.(2008).** Optimization of carotenoids extraction from Rhodobactersphaeroides. Food Science and Technology, 41: 1082–1088.

Références bibliographiques

- **Zhenxin, Gu., Chen, Deming., Han, Yongbin., Chen, Zhigang., Gu, Feirong. (2008).** Optimization of carotenoids extraction from Rhodobacter sphaeroides. Food Science and Technology, 41: 1082–1088.

Annexes

Annexes

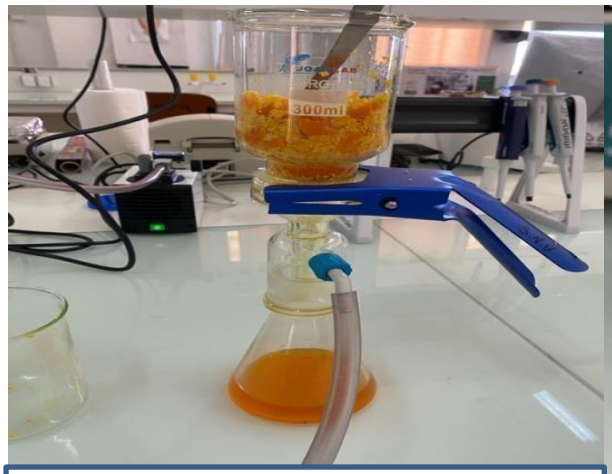
Annexe 1 : Etapes d'extraction des caroténoïdes



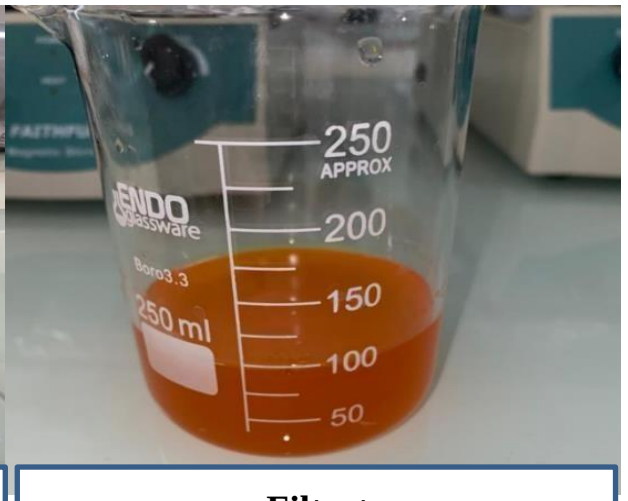
Broyage



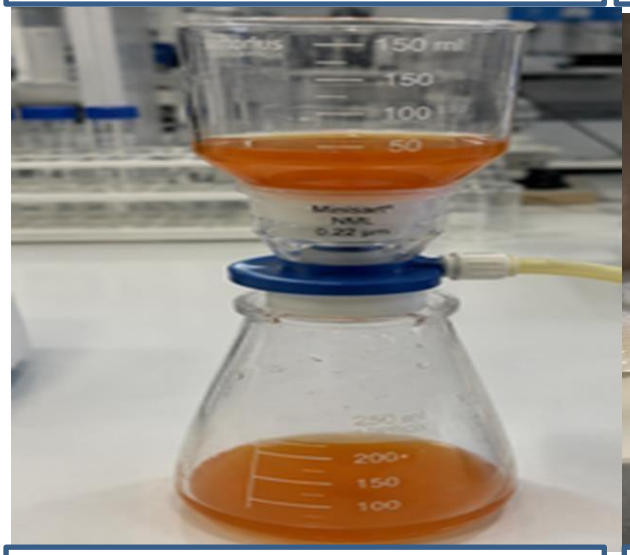
Macération



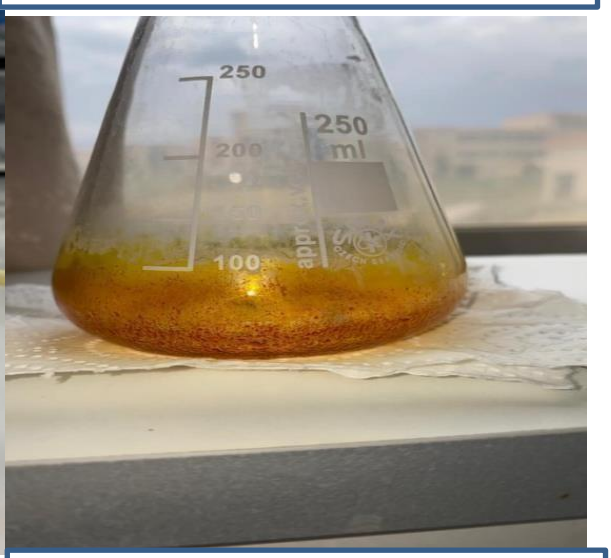
Filtration



Filtrat



Stérilisation filtrante



Extrait brut après évaporation

Annexes

Annexe 2 Milieux de culture

1. Eau physiologique stérile

-Chlorure de sodium (NaCl) : 9 g

-Eau purifiée (ou eau stérile) : q.s.p. (quantité suffisante pour) 1 litre

-Autoclavage 120°C pendant 20 min

2. Milieu PCA

-Peptone de caséine 5,00 g

- Extrait de levure 2,50 g

- Glucose 1,00 g

-Agar 15,00 g

-pH final à 25°C : 7,0 □ 0,2

-Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes

3. Milieu PDA

-Extrait de pomme de terre 4,00 g

-Glucose 20,00 g

- Agar 15,00 g

-pH final à 25°C : 5,6 □ 0,2

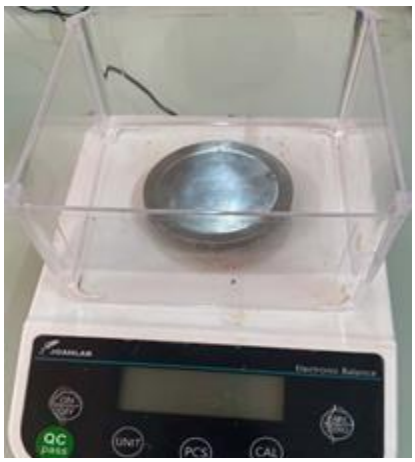
-Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Annexes

Annexe 3 : Appareils et verrerie



Incubateur



Balance



Dessiccateur



Agitateur magnétique



Mortier



Bec Bunsen



Bain marie



Vortex