

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université 20 Août -1955-Skikda



Faculté des Sciences

Département des sciences de la nature et de la vie



# Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

# Master

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

**EFFET DE LA MICROENCAPSULATION PAR DES  
CELLULES DE LEVURE SUR LA TENEUR EN COMPOSES  
PHENOLIQUES ET L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DE  
L'ECORCE D'ORANGE (*Citrus sinensis*)**

**Présentée par :**

Khemici Rahma

Fourah Yousra

Ramdane Rayane

Guerfi Hibatarrhmane

**Devant le jury composé de :**

Pr. Zaidi Nedjouda

Présidente

Professeur

Univ. Skikda

Dr. Aggoun Asma

Examinatrice

MCB

Univ. Skikda

Dr. Laib Imen

Promotrice

MCA

Univ. Skikda

**Année Universitaire : 2024 - 2025**





# Remerciements

*Nous remercions tout d'abord Allah, Le Tout-Puissant, qui nous a facilité le chemin pour l'accomplissement de ce mémoire Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Madame Dr. Laib Imen, enseignante au département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université du 20 Août 1955, pour avoir accepté de diriger notre travail, pour ses conseils précieux, sa disponibilité et son encadrement .tout au long de ce projet*

*Nos remerciements s'adressent également à Madame Zaidi Nedjoua pour avoir accepté de présider le jury de notre projet de fin d'études, ainsi qu'à Madame Aggoun Asma pour l'honneur qu'il nous a fait en .examinant notre travail*

*Nous adressons un grand merci à Madame Brahimi Houda ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire du hall technologique de l'Université du 20 Août 1955 à Skikda, pour leur disponibilité, leurs conseils, leur confiance et leur précieuse aide tout au long de notre travail expérimental*

*Nos vifs remerciements vont également à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation, pour les connaissances transmises, leur dévouement et leurs efforts, en particulier à Monsieur Boujelab Zain Eddine, chef du département.*





# *Dédicace*

*À moi-même,*

*Pour ma persévérance et ma force malgré les épreuves... Ce diplôme est la preuve que j'ai tenu bon.*

*À ma mère Warda,*

*Ma lumière, mon refuge. Ton amour et ton soutien ont été ma plus grande force. Merci pour tout.*

*À mon père Lakhdar,*

*Pour tes encouragements constants et ta présence rassurante. Que Dieu te protège.*

*,À ma sœur Ikram*

*Malgré la distance, tu as toujours été proche par ton écoute et ton exemple. Merci d'être une source  
.d'inspiration*

*,À ma sœur Imane et mes frères Abdelrahman et Zaki*

*.Merci d'être mes piliers et ma sécurité*

*,À tous ceux qui m'ont tendu la main avec amour*

*.Votre présence m'a donné la force d'avancer*



**Rahma**



# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire avec tout mon amour, mon respect et  
ma profonde reconnaissance :*

*À mon père, Kamel*

*Pour son cœur généreux, ses sacrifices silencieux et son  
soutien indéfectible qui m'ont permis d'avancer avec  
dignité et sérénité.*

*À ma mère Soraya*

*Douce lumière de ma vie, pour son amour, ses prières, ses  
paroles apaisantes et sa confiance en moi, même dans mes  
moments de doute.*

*À mes sœurs, Khaoula, Imen et Djihed*

*Pour leur tendresse, leur complicité et leurs  
encouragements, qui m'ont souvent redonné courage.*

*À mon frère, Ammar*

*Pour sa présence calme et rassurante, toujours là même en  
silence.*

*À chacun de vous, merci du fond du cœur. Ce mémoire  
porte un peu de chacun de vous*



*Yousra*

# Dédicace

*À la source inépuisable de tendresse, à celle qui a bercé mes nuits d'inquiétude par la douceur de ses prières, à celle qui a tissé ma joie avec les fils précieux de son cœur, à la signification de l'amour pur, du sacrifice silencieux et du dévouement infini, à ma chère mère — que Dieu la protège et la comble de Sa miséricorde.*

*À celui dont les mains n'ont jamais compté les efforts, à celui qui m'a appris la patience, la dignité, et la valeur du travail bien fait,*

*À mon cher père — que Dieu lui accorde santé, sagesse et longue vie.*

*À mes frères, Amine et Abd'El Rahim, compagnons fidèles de mes pas, frères de sang et d'âme, merci pour votre présence forte et rassurante, pour vos encouragements silencieux mais profonds.*

*À ma seule et précieuse sœur, Loubna, lumière de douceur et de complicité, Ton affection m'a portée dans les moments de doute, et ton sourire a souvent allégé mes silences.*

*À toutes les personnes qui m'ont aimée, qui ont cru en moi, qui ont souhaité, parfois plus que moi-même, que j'aille jusqu'au bout, et qui m'ont soutenue, encouragée, inspirée — recevez par cette humble réalisation une part de ma gratitude et de ma réussite.*

*Et à moi-même, pour avoir cru, même quand tout semblait flou, pour chaque larme retenue, chaque pas franchi, chaque page tournée.*

*Ce mémoire est aussi le fruit de ma persévérance, de mes luttes et de ma foi.*



**Rayane**



# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Ma chère mère Nawal et mon père Djemal*

*Pour leur amour, leur patience, leurs sacrifices et leur soutien inestimable tout au long de mon parcours. Rien de tout cela n'aurait été possible sans eux.*

*À ma belle-sœur Nour Elhouda*

*Pour sa gentillesse et son soutien constant.*

*À mes frères Taha Alamine, Mohamed Islam et Ahmed*

*Qui m'ont toujours encouragée et inspirée.*

*À mes collègues de route Yousra, Rayane et Rahma*

*Pour leur collaboration, leur aide précieuse et les moments partagés.*

*À mes amies Sana et Raja*

*Pour leur présence sincère, leur bienveillance et leur amitié fidèle.*

*À toutes celles et ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenue de près ou de loin : je vous en remercie du fond du cœur.*



**Hiba**

---

## SOMMAIRE

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des figures

Liste des tables

Introduction Générale ..... 01

### Partie bibliographique

#### Chapitre 1 : Les polyphénols

1.Généralités..... 04

2.Classification des polyphénols..... 04

3.Propriétés chimiques des composés phénoliques chez *Citrus sinensis*..... 06

3.1. Nucléophilie ..... 06

3.2 Chélation des ions métalliques ..... 06

3.3. Propriétés réductrices ..... 06

3.4 Polarisabilité..... 07

4. Localisation des polyphénols chez <i>Citrus sinensis</i> .....	07
5. Biosynthèse des composés phénoliques chez <i>Citrus sinensi</i> .....	08
5.1 La voie de l'acide malonique .....	08
5.2 La voie du shikimate .....	08
5.3. La voie des phénylpropanoïdes .....	09
6. Activité biologique des polyphénols .....	10
6.1. Activité antioxydante .....	10
6.1.1. Piégeage des radicaux libres .....	10
6.1.2. Chélation des ions métalliques.....	11
6.1.3 Inhibition enzymatique .....	12
6.2. Autres activités biologiques des polyphénols .....	13
7.Facteurs influençant la teneur en polyphénols.....	13

## **Chapitre 2 : La microencapsulation**

1.Généralités.....	14
2. Encapsulation par levure : Intérêt commercial et medical.....	14
3. Les cellules de levure et leurs structures barrière .....	15

3.1. Paroi cellulaire.....	16
3.2. Membrane plasmique.....	17
3.3. Ultrastructure intracellulaire.....	17
4. Types des microcapsules à base de levures .....	17
4.1. Cellules intactes (sans prétraitement) .....	18
4.2. Cellules perméabilisées.....	19
a) Par plasmolyse (traitement osmotique).....	19
b) Par solvants organiques.....	19
c) Par digestion enzymatique partielle.....	19
d) Solvants utilisés pendant l'encapsulation .....	19
e) Autres traitements .....	20
5. Les variables contrôlant l'encapsulation passive.....	20
a) Rapport massique levure/composé hydrophobe.....	21
b) Température.....	21
c) Méthodes physiques (pression, PEF, vide).....	22

d) Teneur en eau.....	21
e) Taille moléculaire du composé.....	21
f) Polarité et logP.....	22
g) Entropie de solubilization.....	22
h) Mécanisme de transport.....	23
6. Encapsulation des substances hydrophobes .....	23

## **Matériel et méthodes**

1. Lieu de l'étude .....	26
2. Matériel végétal.....	26
3. Préparation des échantillons.....	26
4.Méthodologie.....	26
4.1. Extraction des composés phénoliques.....	26
4.2. Microencapsulation des composés phénoliques.....	27
4.2.1. Préparation de la souche de levure.....	27

4.2.2. Plasmolyse des souches de levures.....	27
4.2.3. Microencapsulation des composés phénoliques.....	27
4.2.4. Analyse microscopique des extraits encapsulés.....	27
4.2.5. Efficacité d'encapsulation.....	28
4.3. Dosage des composés phénoliques.....	28
4.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	28
4.3.2. Dosage des flavonoids.....	29
4.4. Analyse FTIR.....	29
4.5. Effet de la microencapsulation sur l'activité antioxydante.....	29
4.5.1. Méthode ABTS.....	30
4.5.2. Évaluation de l'activité réductrice par la méthode à la phénanthroline.....	30
4.6. Analyse statistique.....	31

## **Résultats et discussion**

1. Observation microscopique des capsules intactes et plasmolysées obtenues à partir d'écorces d'orange encapsulées par des cellules de levure.....	32
---	----

2. Teneur en composés phénoliques des écorces de <i>Citrus sinensis</i> .....	34
2.1. Les courbes d'étalonnage.....	34
2.2. L'effet de l'encapsulation sur la teneur en composés phénoliques.....	35
2.3. Analyse FTIR des extraits avant et après encapsulation.....	38
3. Effet de la microencapsulation sur l'activité antioxydante.....	39
Conclusion Générale.....	42
Référence bibliographique.....	43

## Résumé

Cette étude vise à valoriser les écorces d'orange (*Citrus sinensis*), sous-produit agroalimentaire riche en composés phénoliques bioactifs, en évaluant leur potentiel antioxydant et en améliorant leur stabilité par encapsulation dans des cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), intactes et plasmolysées. L'objectif principal est d'analyser la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes, ainsi que l'impact de l'encapsulation sur leur stabilité et leur activité antioxydante.

Les extraits phénoliques ont été obtenus à partir d'écorces d'orange séchées, broyées et extraites par macération dans un solvant hydro-éthanolique. Ces extraits ont ensuite été encapsulés dans des cellules de levure préalablement préparées selon deux traitements : levures intactes et levures plasmolysées (par traitement au NaCl). L'encapsulation a été suivie par microscopie optique, et l'évaluation des polyphénols, flavonoïdes et de l'activité antioxydante a été réalisée par des méthodes spectrophotométriques standard (Folin-Ciocalteu,  $AlCl_3$ , FTIR).

Les résultats ont montré une diminution des teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes après encapsulation, traduisant une rétention partielle lors du processus. Toutefois, les levures plasmolysées ont permis une meilleure préservation de ces composés par rapport aux levures intactes. De manière remarquable, l'activité antioxydante des extraits encapsulés, notamment dans les levures plasmolysées, s'est révélée supérieure à celle des extraits non encapsulés, suggérant un effet protecteur contre l'oxydation.

Dans l'ensemble, cette étude confirme le rôle essentiel des composés phénoliques dans l'activité antioxydante et met en évidence le potentiel des écorces d'orange comme source naturelle d'antioxydants. Elle souligne également l'efficacité des cellules de levure plasmolysées comme vecteurs d'encapsulation. Pour approfondir ces résultats, des recherches futures pourraient explorer les interactions moléculaires entre les polyphénols et les matrices cellulaires, comparer différentes techniques d'encapsulation, et évaluer la biodisponibilité des extraits encapsulés dans diverses applications industrielles (agroalimentaire, nutraceutique, cosmétique).

**Mots-clés :** écorces d'orange, composés phénoliques, antioxydants, encapsulation, levure, cellules plasmolysées.

## Abstract

This study aims to valorize orange peels (*Citrus sinensis*), an agri-food by-product rich in bioactive phenolic compounds, by assessing their antioxidant potential and improving their stability through encapsulation in yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*), both intact and plasmolyzed. The main objective is to analyze the total polyphenol and flavonoid content, as well as the impact of encapsulation on their stability and antioxidant activity.

Phenolic extracts were obtained from dried, ground orange peels using maceration in a hydroethanolic solvent. These extracts were then encapsulated in yeast cells previously prepared with two treatments: intact yeast and plasmolyzed yeast (treated with NaCl). Encapsulation was monitored by optical microscopy, and the evaluation of polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity was performed using standard spectrophotometric methods (Folin-Ciocalteu, AlCl<sub>3</sub>, , FTIR).

The results showed a decrease in phenolic and flavonoid content after encapsulation, indicating partial retention during the process. However, plasmolyzed yeast allowed better preservation of these compounds compared to intact yeast. Notably, the antioxidant activity of encapsulated extracts, especially in plasmolyzed yeast, was higher than that of non-encapsulated extracts, suggesting a protective effect against oxidation.

Overall, this study confirms the essential role of phenolic compounds in antioxidant activity and highlights the potential of orange peels as a natural source of antioxidants. It also underscores the effectiveness of plasmolyzed yeast cells as encapsulation carriers. To further these results, future research could explore molecular interactions between polyphenols and cellular matrices, compare different encapsulation techniques, and assess the bioavailability of encapsulated extracts in various industrial applications (agri-food, nutraceutical, cosmetic).

**Keywords:** orange peels, phenolic compounds, antioxidants, encapsulation, yeast, plasmolyzed cells.

## الملخص:

هدفت هذه الدراسة إلى تعزيز قيمة قشر البرتقال (*Citrus sinensis*)، وهو منتج ثانوي زراعي غذائي غني بالمركبات الفينولية النشطة بيولوجيًا، من خلال تقييم إمكاناته كمضاد للأكسدة وتحسين ثباته من خلال تغليفه في خلايا الخميرة السليمة والمتحللة بالبلازما (*Saccharomyces cerevisiae*). كان الهدف الرئيسي هو تحليل محتوى البوليفينول والفلافونويد الكلي، بالإضافة إلى تأثير التغليف على ثباتهما ونشاطهما المضاد للأكسدة.

تم الحصول على مستخلصات فينولية من قشور برتقال مجففة ومطحونة، مستخلصة عن طريق النقع في مذيب هيدروإيثانولي. ثم تم تغليف هذه المستخلصات في خلايا خميرة مُحضرة مسبقًا باستخدام معالجتين: الخميرة السليمة والخميرة المتحللة بالبلازما (باستخدام معالجة كلوريد الصوديوم). رُصد التغليف بالمجهر الضوئي، وقِيمَت البوليفينولات والفلافونويدات ونشاط مضادات الأكسدة باستخدام طرق قياس الطيف الضوئي القياسية (FTIR،  $AlCl_3$ ، Folin-Ciocalteu).

أظهرت النتائج انخفاضًا في مستويات الفينول والفلافونويد بعد التغليف، مما يعكس احتباسًا جزئيًا أثناء العملية. ومع ذلك، سمحت الخميرة المُحللة بالبلازما بحفظ هذه المركبات بشكل أفضل مقارنةً بالخميرة السليمة. ومن اللافت للنظر أن النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المُغلّفة، وخاصةً في الخميرة المُحللة بالبلازما، كان أعلى من نشاط المستخلصات غير المُغلّفة، مما يشير إلى تأثير وقائي ضد الأكسدة.

بشكل عام، تؤكد هذه الدراسة الدور الأساسي للمركبات الفينولية في النشاط المضاد للأكسدة، وتُسلط الضوء على إمكانات قشور البرتقال كمصدر طبيعي لمضادات الأكسدة. كما تُسلط الضوء على فعالية خلايا الخميرة المُحللة بالبلازما كموائل للتغليف. ولمزيد من استكشاف هذه النتائج، يُمكن للأبحاث المستقبلية استكشاف التفاعلات الجزيئية بين البوليفينولات والمصفوفات الخلوية، ومقارنة تقنيات التغليف المختلفة، وتقييم التوافر البيولوجي للمستخلصات المُغلّفة في تطبيقات صناعية مُختلفة (الصناعات الزراعية والغذائية، والمُغذّيات، ومستحضرات التجميل).

**الكلمات المفتاحية:** قشر البرتقال، المركبات الفينولية، مضادات الأكسدة، التغليف، الخميرة، الخلايا المتحللة بالبلازما

**ABTS:** 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6sulphonic acid)

**ANOVA :** Analyse de la variance

**ATR :** réflexion totale atténuée

**ATR-FTIR :** Spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier avec réflexion totale atténuée

**EAG :** Equivalent acide gallique

**EE (%) :** Efficacité d'encapsulation

**ES :** Système endocrinien

**EQ :** Equivalent quercétine

**FTIR :** Spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier

**IC50 :** A concentration d'échantillon nécessaire pour réduire de moitié la quantité initiale

**K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> :** Dioxyde de soufre

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> :** carbonate de sodium

**NaCl :** chlorure de sodium

**H<sup>+</sup> :** Ion hydrogène

**PIKE :** accessoire de transmission infrarouge

**TPE :** Concentration totale de polyphénols, flavonoïds encapsulés

**TPT :** La concentration des composés phénoliques (polyphénols, flavonoïds) de l'extrait non encapsulé

**UV-1800 :** Spectrophotomètre ultraviolet -visible

<b>Figure 1:</b>	La classification des polyphénols .....	05
<b>Figure 2:</b>	Localisation des composés phénoliques au niveau de la cellule .....	07
<b>Figure 3:</b>	Voies de biosynthèse des polyphénols .....	09
<b>Figure 4:</b>	Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques .....	11
<b>Figure 5:</b>	Les flavonoïdes et leurs sites proposés pour la Chélation des ions métalliques .....	12
<b>Figure 6:</b>	Structure post-bourgeonnement d'une cellule de levure : zoom sur les barrières à l'encapsulation (paroi et membrane cellulaires).....	15
<b>Figure 7:</b>	Classes de microcapsules à base de levure (YBMCs) selon leur mode de production.....	18
<b>Figure 8 :</b>	Modifications ultrastructurales induites par l'encapsulation d'hydrophobes dans des cellules de levure intactes observations en microscopie électronique en transmission.....	21
<b>Figure 9:</b>	Mécanismes d'encapsulation et de perméation des composés hydrophobes chez les levures .....	23
<b>Figure 10 :</b>	Observation microscopique à $\times 100$ des capsules à base d'écorces d'orange encapsulées par des levures .....	32
<b>Figure 11 :</b>	Courbes d'étalonnage.....	34
<b>Figure 12 :</b>	Teneurs en composés phénoliques .....	35
<b>Figure 13 :</b>	Spectre FTIR des extraits avant et après encapsulation.....	38

<b>Tableau 1</b>	Efficacité de l'encapsulation.....	37
<b>Tableau 2</b>	Activité antioxydant par les méthodes ABTS et phénanthroline.....	39

# **Introduction Générale**

Les écorces d'orange (*Citrus sinensis*), sous-produits générés en grande quantité par l'industrie agroalimentaire lors de la transformation des agrumes, sont longtemps restées sous-exploitées malgré leur richesse en composés bioactifs. Généralement considérées comme des déchets, leur accumulation pose des problèmes environnementaux liés à leur gestion inadéquate, pouvant entraîner des nuisances telles que les fermentations, les émissions de gaz ou la contamination des sols et des eaux. Dans cette optique, la valorisation de ces résidus constitue une stratégie prometteuse pour allier gestion durable des déchets et production de molécules d'intérêt. L'extraction et l'utilisation des composés bioactifs présents dans les écorces, notamment les polyphénols, offrent de nombreuses applications potentielles dans les secteurs de l'alimentation fonctionnelle, de la cosmétique et de la pharmaceutique (Elsayed *et al.*, 2024).

Ces écorces sont particulièrement riches en polyphénols, notamment en flavonoïdes (hespéridine, narirutine), en acides phénoliques (acide férulique, acide caféique, acide ellagique), ainsi qu'en flavones polyméthoxylés (Li *et al.*, 2006 ; Manthey & Grohmann, 2001 ; Giampieri *et al.*, 2012 ; Capocasa *et al.*, 2016). Ces composés sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anticancérigènes, contribuant ainsi à la prévention de nombreuses pathologies chroniques, notamment les maladies cardiovasculaires, certains cancers, le diabète et le vieillissement cellulaire (González-Molina *et al.*, 2010 ; Yanni *et al.*, 2022 ; Małgorzata & Justyna, 2022 ; Charunivedha *et al.*, 2024 ; Gomez-Urios *et al.*, 2025).

Cependant, l'exploitation de ces composés est souvent entravée par leur instabilité face à l'oxygène, à la lumière, à la chaleur et aux variations de pH. Ces conditions peuvent entraîner une dégradation rapide par oxydation, réduisant ainsi considérablement leur efficacité biologique (Shahidi & Ambigaipalan, 2015 ; Ouedraogo *et al.*, 2021). Leur faible solubilité dans l'eau et leur biodisponibilité limitée constituent également des obstacles majeurs à leur incorporation dans des produits alimentaires, nutraceutiques ou pharmaceutiques (Salem *et al.*, 2021).

Pour pallier ces limitations, diverses stratégies de protection ont été développées, parmi lesquelles la microencapsulation s'est révélée particulièrement efficace. Cette technologie consiste à enfermer les composés actifs dans une matrice protectrice, assurant leur stabilité, une libération contrôlée et une meilleure absorption par l'organisme (Desai & Park, 2005 ; Costa *et al.*, 2021 ; Aktaş *et al.*, 2024 ; Zheng *et al.*, 2025). L'encapsulation peut prendre plusieurs formes (nanoparticules, liposomes, microcapsules), et permet notamment de prolonger la durée de vie des polyphénols tout en préservant leurs propriétés fonctionnelles (Chen *et al.*, 2024 ; Zahedi *et al.*, 2024 ; Dinh *et al.*, 2024)

Parmi les méthodes émergentes, la microencapsulation à l'aide de cellules de levure, en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, offre une solution économique, durable et biocompatible. Cette approche exploite la paroi cellulaire de la levure comme matrice naturelle capable de protéger les composés bioactifs contre l'oxydation et les dégradations thermiques (Karaman, 2020 ; Coradello & Tirelli, 2021 ; Günal-Köroğlu *et al.* 2024 ; Aktürk Gümüştay *et al.*, 2025). Les levures possèdent également la capacité de solubiliser les composés peu hydrosolubles et d'assurer une libération progressive dans des conditions physiologiques ciblées (Round & Nelson, 2006 ; Labuschagne, 2018 ; Dadkhodazadeh *et al.*, 2021). De plus, ce procédé ne nécessite aucun additif chimique, garantissant ainsi une sécurité optimale pour une application dans l'industrie alimentaire (Joye & McClements, 2014 ; Khamench *et al.*, 2021 ; Oliveira *et al.*, 2022, Günal-Köroğlu *et al.*, 2024; Zhu *et al.*, 2024)

À titre d'exemple, l'acide chlorogénique encapsulé dans des cellules de levure a démontré une grande stabilité face à des conditions environnementales défavorables (Lået *al.*, 2022). Ce type d'encapsulation favorise ainsi la valorisation des sous-produits agroalimentaires, tels que les écorces d'orange, dans une optique d'économie circulaire (Zhao *et al.*, 2020 ; Bocco *et al.*, 1998).

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'impact de la microencapsulation des composés phénoliques extraits des écorces d'orange (*Citrus sinensis*) à l'aide de cellules de levure intactes et plasmolysées, en mettant l'accent sur leur stabilité et leur potentiel antioxydant. Elle s'inscrit dans une démarche de valorisation d'un déchet agroalimentaire abondant, en transformant ces écorces, traditionnellement considérées comme des résidus, en source de composés bioactifs à haute valeur ajoutée. L'efficacité de l'encapsulation est estimée par la quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes, suivie de l'évaluation de l'activité antiradicalaire à l'aide des tests ABTS et de la méthode à la phénanthroline.

Ce travail est structuré en deux parties principales :

La première partie, intitulée *Synthèse bibliographique*, présente une revue approfondie des connaissances actuelles en matière d'encapsulation, en mettant particulièrement l'accent sur les systèmes utilisant les cellules de levure. Cette section explore les principes, les mécanismes et les différentes applications des méthodes d'encapsulation par levures, qu'elles soient intactes ou rendues plus perméables par divers traitements préalables. L'efficacité de ces approches est analysée en termes de protection et de libération contrôlée des composés bioactifs. Un aperçu détaillé des traitements appliqués aux cellules de levure est également présenté, dans le but d'optimiser leur capacité d'encapsulation. Une attention particulière est portée à cette approche

biotechnologique innovante, qui exploite les propriétés naturelles des cellules de levure en tant que microcapsules biologiques, mettant en évidence son fort potentiel dans la valorisation des extraits végétaux, notamment pour la stabilisation des composés phénoliques.

La seconde partie est consacrée à l'étude expérimentale. Elle décrit les matériaux et méthodes employés pour l'extraction et l'encapsulation, ainsi que les protocoles analytiques utilisés pour la quantification des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante. Les résultats obtenus sont ensuite présentés, discutés et comparés aux données de la littérature.

## **Partie bibliographique**

# **Chapitre I : Les polyphénols**

## 1. Généralités

La remarquable capacité des écorces de *Citrus sinensis* (oranger doux) à produire une grande diversité de substances naturelles, telles que des alcaloïdes, des terpénoïdes et des composés phénoliques, est une caractéristique marquante qui les distingue. Bien que les fonctions physiologiques précises de nombreux métabolites secondaires présents dans les écorces d'orange restent partiellement comprises, ces composés constituent une précieuse ressource pour des applications variées, notamment en pharmacologie et dans l'industrie agroalimentaire.

Les écorces de *Citrus sinensis* présentent des niveaux d'accumulation de ces métabolites secondaires qui varient tant sur le plan qualitatif que quantitatif, leur conférant des propriétés bioactives et aromatiques distinctes. Parmi ces métabolites, les composés phénoliques, ou polyphénols, se distinguent comme un groupe important de molécules bioactives (Macheix *et al.*, 2005).

## 2. Classification des polyphénols

Les composés phénoliques présents dans les écorces de *Citrus sinensis* regroupent une grande variété de structures, comprenant à la fois des molécules à squelette polyphénolique (plusieurs groupes hydroxyle sur des cycles aromatiques) et des composés plus simples, tels que les acides phénoliques et les alcools phénoliques.

Ces polyphénols se classent en fonction du nombre de cycles phénoliques et des unités structurales qui les relient. Les principaux groupes identifiés (figure 1) sont : les flavonoïdes, les acides phénoliques, les tanins (hydrolysables et condensés), les stilbènes et les lignanes (D'Archivio *et al.*, 2007).

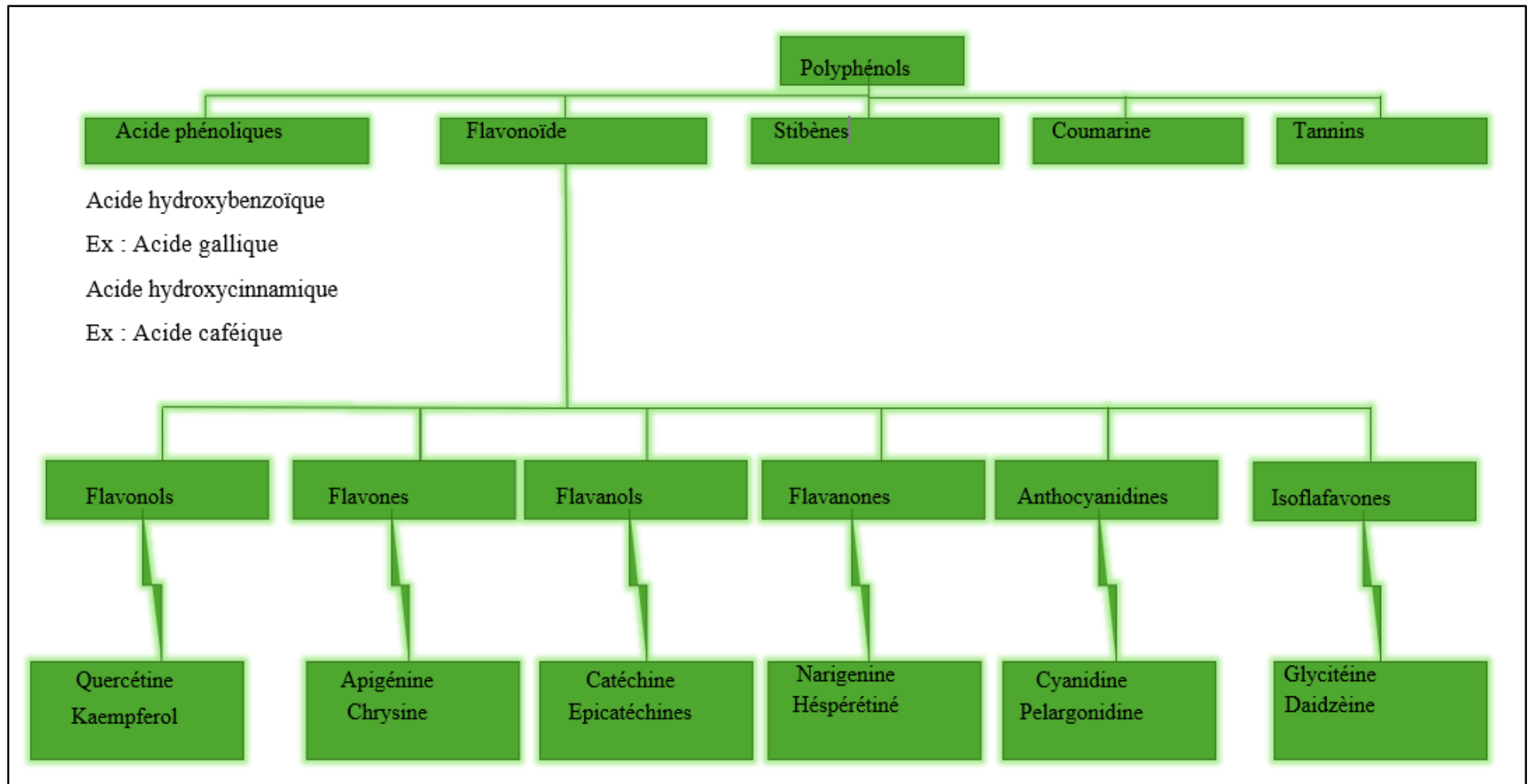


Figure 1 : La classification des polyphénols (Kumatrlat ,2019)

### 3. Propriétés chimiques des composés phénoliques chez *Citrus sinensis*

La compréhension des propriétés chimiques des composés phénoliques présents dans *Citrus sinensis* est essentielle pour en interpréter les effets biologiques. Ces propriétés servent également à identifier et à quantifier ces substances dans les études des produits naturels (Ribéreau-Gayon, 1968) et à évaluer leur impact sur la santé humaine. Les principales caractéristiques chimiques de ces composés sont décrites ci-dessous :

#### 3.1 Nucléophilie

Les composés phénoliques de *Citrus sinensis* présentent une nucléophilie portée par l'atome d'oxygène et les atomes de carbone situés en position ortho et para par rapport au groupe OH. Cette propriété leur permet de participer à des réactions de substitution électrophile aromatique (Nkhili, 2009). Cette nucléophilie représente un axe prometteur pour l'étude des effets des polyphénols de l'orange douce sur la santé, notamment par une possible régulation de l'expression des gènes ou des interactions directes avec des récepteurs et des facteurs nucléaires (Dangles, 2006).

#### 3.2 Chélation des ions métalliques

Certains polyphénols abondants dans *Citrus sinensis* et son alimentation présentent une capacité marquée à chélater les ions métalliques. Cette propriété est cruciale pour prévenir la formation de radicaux libres pouvant endommager les biomolécules (Nkhili, 2009). Les polyphénols qui comportent des groupements 1,2-dihydroxy,  $\alpha$ -hydroxycéto ou  $\beta$ -hydroxycéto sont capables de former des complexes de chélation avec des ions métalliques comme  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Al}^{3+}$  (Dangles, 2006).

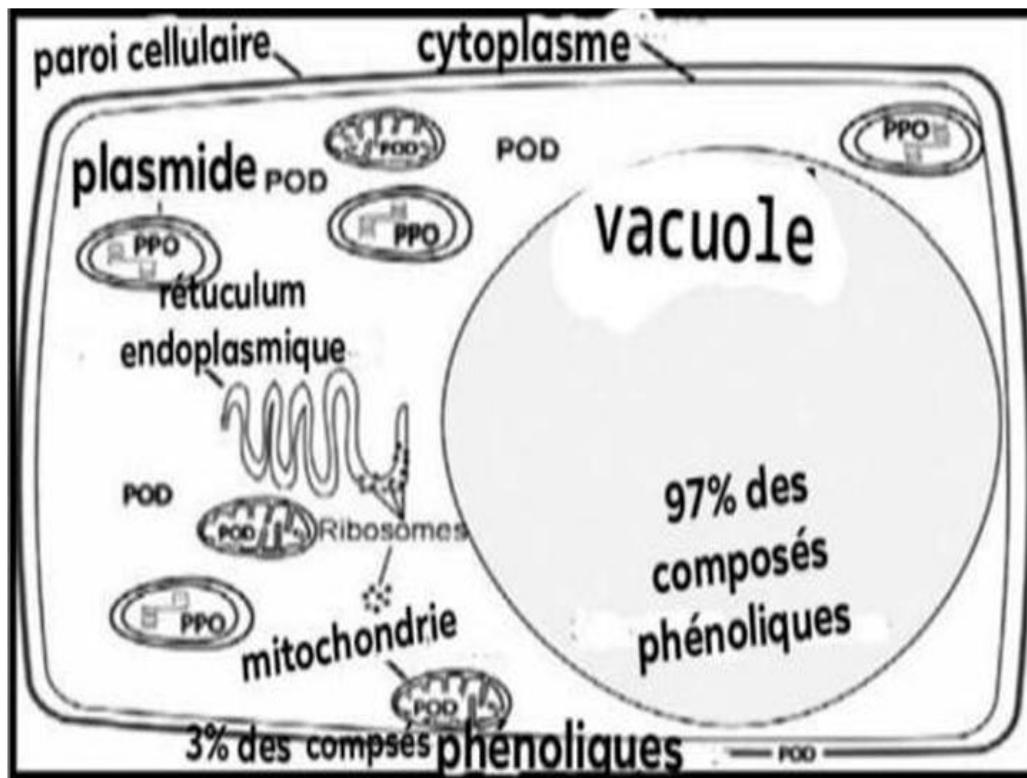
#### 3.3 Propriétés réductrices

Les groupements donneurs d'électrons présents sur les cycles aromatiques des composés phénoliques de *Citrus sinensis* confèrent à ces derniers un caractère réducteur élevé. Cette caractéristique permet des oxydations mono-électroniques générant des radicaux phénoxyles. Les polyphénols de l'orange douce, en particulier les flavonoïdes, possèdent un faible potentiel redox qui leur permet de neutraliser efficacement des radicaux tels que les superoxydes, peroxydes ( $\text{ROO}\cdot$ ), alkoxydes ( $\text{RO}\cdot$ ) et hydroxydes par transfert d'hydrogène (Nkhili, 2009). En devenant eux-

mêmes des radicaux après ce don d'électron, ils nécessitent un rééquilibrage pour maintenir l'équilibre antioxydant.

### 3.4 Polarisabilité

La forte polarisabilité des phénols de *Citrus sinensis* leur permet de former des interactions de dispersion marquées avec d'autres composés polarisables, favorisant ainsi la complexation moléculaire en milieu aqueux. Cet effet hydrophobe amplifie les interactions entre les cycles benzéniques apolaires et d'autres cycles aromatiques (Nkhili, 2009 ; Boubekri, 2014).



**Figure 2** : Localisation des composés phénoliques au niveau de la cellule (Toivonen et Brummell, 2004)

### 4 Localisation des polyphénols chez *Citrus sinensis*

Chez *Citrus sinensis*, les composés phénoliques sont principalement localisés dans les vacuoles et la paroi cellulaire. Dans les vacuoles, ils se trouvent sous forme conjuguée avec des sucres ou des acides organiques, ce qui accroît leur solubilité et diminue leur toxicité. Quant à la paroi cellulaire, elle renferme de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. La synthèse de ces polyphénols se déroule dans le cytosol ; certaines enzymes impliquées dans la voie

des phénylpropanoïdes sont associées aux membranes du réticulum endoplasmique, formant des complexes enzymatiques appelés métabolons (Bènard, 2009).

La répartition des polyphénols dans les tissus de l'orange douce est étroitement liée à leurs fonctions biologiques et peut être très spécifique. Par exemple, dans les feuilles de *Citrus sinensis*, les anthocyanes et les flavonoïdes se concentrent principalement dans l'épiderme. À l'échelle de la plante entière, certains polyphénols s'accumulent dans des organes précis. Bien que l'exemple de la pomme soit souvent cité pour la coloration de la peau (Bènard, 2009), chez l'orange douce, ces composés contribuent à la pigmentation des zestes et à la protection contre les agressions environnementales.

Les composés phénoliques jouent un rôle majeur dans le métabolisme de *Citrus sinensis*. Ils participent aux interactions avec l'environnement biologique (bactéries, champignons, insectes) et à la défense contre les rayons UV. Toutes les classes de polyphénols interviennent dans les mécanismes de résistance (Dicko, 2006) et remplissent une fonction essentielle dans la communication cellulaire, que ce soit entre cellules de la plante ou entre la plante et d'autres organismes (Robert, 2000).

## 5. Biosynthèse des composés phénoliques chez *Citrus sinensis*

Les polyphénols de *Citrus sinensis* sont synthétisés par différentes voies métaboliques clés :

### 5.1 La voie de l'acide malonique

Cette voie métabolique, bien que limitée à la production d'acides phénoliques spécifiques, est basée sur l'activation de l'acétyl-CoA. Cet intermédiaire, dérivé de la glycolyse et de la  $\beta$ -oxydation, se condense avec le malonate. Cette étape conduit à la cyclisation des chaînes polycétoniques formées par la répétition de la condensation d'unités d'« acétate ». L'enzyme clé de cette réaction est l'acétyl-CoA carboxylase, qui catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA (Merlin, 2015).

### 5.2 La voie du shikimate

La voie du shikimate constitue la principale source de polyphénols dans *Citrus sinensis* (Colinet-Crouzet, 2011). Dans des conditions normales, environ 20 % du carbone assimilé par la plante est orienté vers cette voie. Elle relie les glucides aux métabolites aromatiques et permet la

formation du squelette aromatique de base. À travers une succession de sept réactions métaboliques (Figure 3), le phosphoénolpyruvate (issu de la glycolyse) et l'érythro-4-phosphate (provenant de la voie des pentoses phosphates) sont convertis en chorismate. Ce chorismate constitue le précurseur des acides aminés aromatiques, à l'origine de nombreux polyphénols (C6-C1), tels que les tanins hydrolysables et la chalcone — molécule de base de tous les flavonoïdes et tanins condensés (Dewick, 1995).

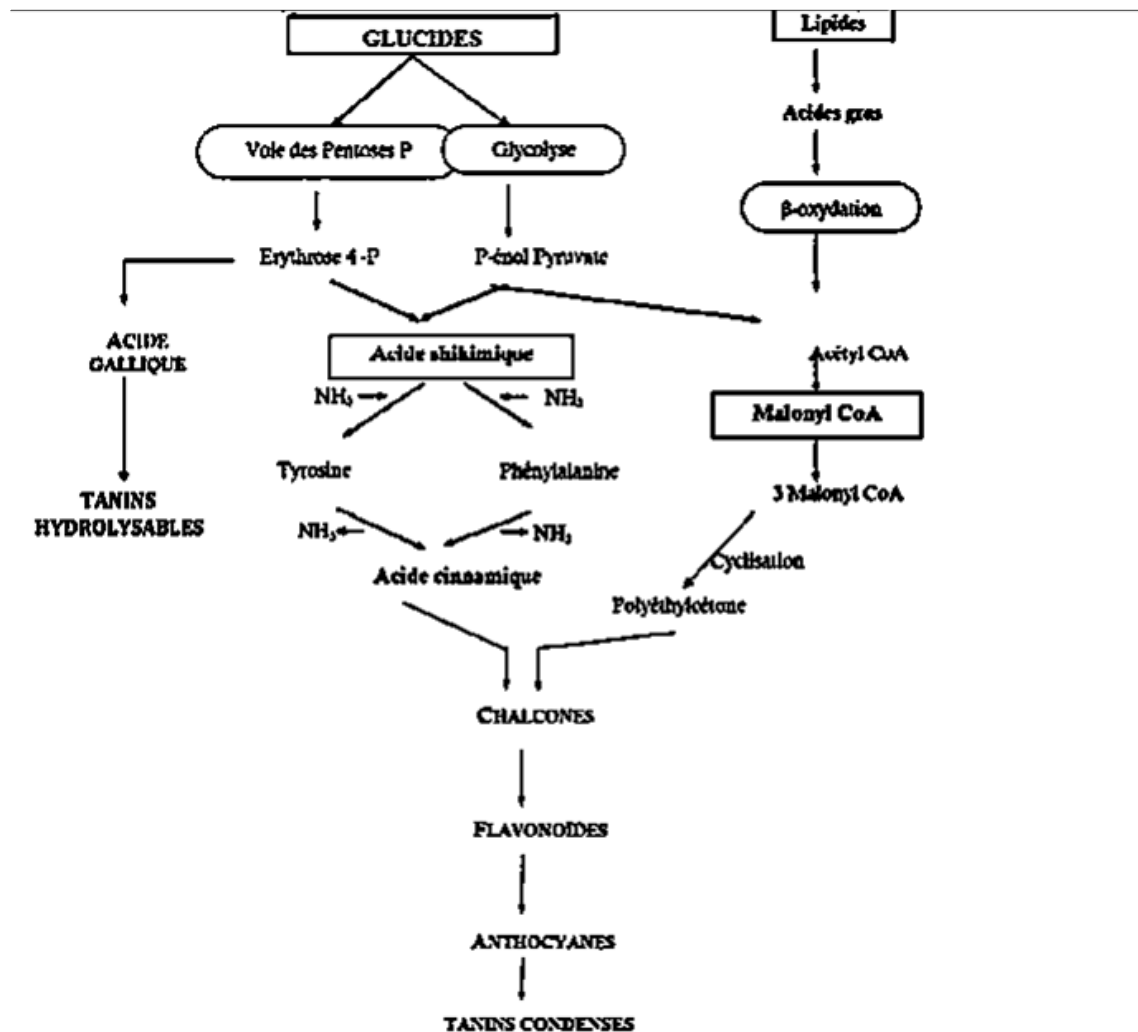


Figure 3 : Voies de biosynthèse des polyphénols (Chaouch ,2014)

### 5.3 La voie des phénylpropanoïdes

Chez *Citrus sinensis*, comme pour d'autres plantes, la voie des phénylpropanoïdes débute par la désamination de la phénylalanine. Cette étape essentielle produit l'acide cinnamique, qui n'est pas directement phénolique, mais sert de précurseur à la biosynthèse des composés

phénoliques. À partir de ce noyau, la voie des phénylpropanoïdes assure la conversion des produits du shikimate en phénylpropanoïdes secondaires, notamment les acides hydroxycinnamiques (acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique) (Bruneton, 2009).

## 6 Activité biologique des polyphénols

### 6.1 Activité antioxydante

Les polyphénols possèdent une remarquable capacité antioxydante, qui résulte de leur aptitude à neutraliser les radicaux libres. Cette propriété est notamment liée à leur faculté à céder un électron ou un atome d'hydrogène, en grande partie grâce aux groupes hydroxyle de leur structure. Ces groupes hydroxyle constituent d'excellents donateurs d'atomes d'hydrogène, ce qui permet aux polyphénols de réagir efficacement avec les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, interrompant ainsi le cycle de production de radicaux libres (Boubekri, 2014).

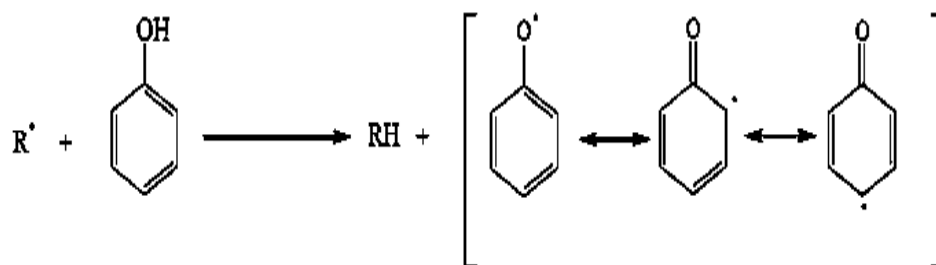
En outre, les composés phénoliques sont capables de chélater les ions métalliques qui catalysent la formation de radicaux libres, renforçant ainsi leur potentiel antioxydant. Toutefois, il est important de souligner que ces mêmes polyphénols peuvent également adopter un comportement pro-oxydant dans certains contextes (Pereira, 2009 ; Tsao, 2010).

Les mécanismes d'action des polyphénols en tant qu'antioxydants sont multiples, incluant :

- La capture des radicaux libres
- La chélation des ions métalliques
- L'inhibition enzymatique

#### 6.1.1. Piégeage des radicaux libres

L'activité antioxydante des polyphénols est en grande partie due à leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, par un mécanisme radicalaire (Sökmen et al., 2012). Ils empêchent l'oxydation des lipides et d'autres biomolécules en transférant rapidement un atome d'hydrogène aux radicaux libres. Ce mécanisme, décrit dès 1976 par Sherwin, implique le transfert formel d'un radical hydrogène, qui peut ensuite subir un transfert d'électrons et éventuellement un transfert de proton, aboutissant à la formation d'un radical intermédiaire stabilisé (Portes, 2008).



**Figure 4 :** Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques (Boubekri,2014)

Les radicaux intermédiaires phénoxy ( $\text{PO}\cdot$ ) sont particulièrement stables en raison de leur résonance, ce qui limite leur participation à de nouvelles réactions en chaîne (Dai et Mumper, 2010). De plus, ces radicaux intermédiaires sont capables de réagir avec d'autres radicaux libres, renforçant ainsi l'effet antioxydant global.

Les composés phénoliques se distinguent par leur capacité remarquable à piéger les radicaux libres, une propriété attribuable à leur structure chimique. Celle-ci comprend des groupes hydroxyles phénoliques capables de céder un atome d'hydrogène ou un électron aux radicaux libres, ainsi qu'un système aromatique stabilisé par résonance (Dai et Mumper, 2010).

Parmi les polyphénols, les flavonoïdes, et plus particulièrement les flavan-3-ols, se révèlent être des piègeurs de radicaux libres particulièrement efficaces (Fraga, 2007). Cette efficacité est due à la présence de groupes 3',4'-dihydroxy et de groupes o-dihydroxy sur le cycle aromatique B, conférant à ces molécules une grande capacité à donner des électrons. De plus, la présence d'un groupe 3-OH sur le cycle C contribue à renforcer cette activité antioxydante. Enfin, la double liaison C2-C3 conjuguée au groupe 4-céto permet une délocalisation accrue des électrons du cycle B, ce qui améliore encore leur capacité à piéger les radicaux (Amic, 2003 ; Khazai *et al.*, 2011).

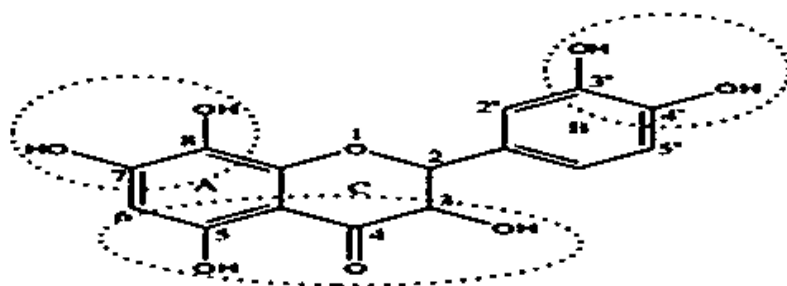
### 6.1.2 Chélation des ions métalliques

Les composés phénoliques ne se contentent pas de neutraliser les radicaux libres ; ils sont également capables de chélater ou de réduire les ions métalliques tels que le cuivre ( $\text{Cu}^+$ ) et le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ), qui peuvent catalyser la formation de radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ) à partir de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), selon la réaction de Fenton (Craft *et al.*, 2012) :



Des études ont mis en évidence que les flavonoïdes peuvent interagir avec les ions métalliques, et que l'efficacité de cette chélation dépend notamment du pH du milieu et du nombre de groupes hydroxyles présents. Trois principaux sites de coordination ont été identifiés (Olszowy *et al.*, 2019) :

- Le cycle A, qui contient un groupe 5-OH et un groupe carbonyle en position 4 du cycle C
- Le cycle C, qui possède des groupes 3-OH et 4-carbonyl
- Le cycle B, qui présente les groupes hydroxyles en positions 3' et 4'



**Figure 5** : Les flavonoïdes et leurs sites proposés pour la Chélation des ions métalliques  
(Khazai,2011)

### 6.1.3 Inhibition enzymatique

Grâce à leurs nombreuses fonctions phénoliques, les polyphénols de *Citrus sinensis* interagissent fortement avec les protéines, ce qui peut conduire à la précipitation des complexes polyphénol-protéine. Cette propriété est notamment exploitée dans le tannage du cuir (Handique et Baruah, 2002). Les interactions entre polyphénols et protéines ont été largement étudiées *in vitro*, en particulier chez les flavonoïdes (Rolo-Naranjo 2009 ; Świeca 2011). Pour approfondir le mécanisme d'action inhibitrice des flavonoïdes, des recherches ont examiné l'effet de la quercétine sur l'oxydation de l'acide linoléique par la lipoxygénase. Elles ont montré que l'inhibition des lipoxygénases par la quercétine ne résulte pas d'une complexation ou d'une oxydation des ions  $Fe^{2+}$ , mais plutôt d'une inhibition irréversible, induite par la formation de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy) (Chebil, 2006).

## 6.2 Autres activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols présents dans *Citrus sinensis* exercent divers effets bénéfiques pour la santé. Ils agissent comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation, réduisant les marqueurs inflammatoires et participant ainsi à la prévention des douleurs musculaires (Lenoir 2011 ; Van-long Woo 2022). De plus, ils sont utilisés pour la prévention et le traitement de certains cancers, en ciblant les mécanismes cellulaires impliqués dans la cancérogenèse et en favorisant la mort des cellules tumorales (Zhou 2016 ; Link 2010 ; Melki 2022). Par ailleurs, ils contribuent à la protection cardiovasculaire en améliorant la fonction des lipoprotéines et en prévenant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL). Certains polyphénols spécifiques, tels que l'acide ellagique et le resvératrol, jouent un rôle clé dans la prévention de l'athérosclérose en renforçant la fonction de la barrière endothéliale (Zhang et al., 2022).

## 7. Facteurs influençant la teneur en polyphénols

La concentration en polyphénols dans les fruits de *Citrus sinensis*, ainsi que dans leurs extraits, peut être influencée par de nombreux facteurs. Les conditions environnementales (lumière, température, teneur en oxygène), ainsi que les méthodes de traitement et de stockage (chauffage, acidification, exposition à la lumière et à l'air) jouent un rôle majeur dans la stabilité des polyphénols. De plus, lors de la digestion, le pH acide, l'action des enzymes digestives et la présence d'autres nutriments peuvent également réduire la quantité de polyphénols biodisponibles (Moral *et al.*, 2018). Ces facteurs limitent la disponibilité de ces composés pour une absorption optimale chez l'humain

## **Chapitre II : La microencapsulation**

## 1. Généralités

Les levures sont des champignons unicellulaires, principalement ascomycètes ou basidiomycètes, définis comme des organismes se reproduisant par bourgeonnement ou fission sans former de corps fructifère sexué (Kurtzman et al., 2011). Elles se distinguent par leur capacité à croître dans des environnements aérobies ou anaérobies (Dashko et al., 2014), et par leur aptitude à résister à des agents tels que le bisulfite (Nadai et al., 2016) ou des antifongiques (Prasad et al., 2002 ; Whaley et al., 2017), voire à survivre en saumure saturée (Breuer & Harms, 2006).

Sur le plan industriel, les levures sont essentielles pour leur métabolisme diversifié. *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* sont couramment utilisées en panification et fermentation alcoolique (Benito et al., 2019). D'autres espèces, comme *Candida kefyr* et *Cyberlindnera jadinii*, sont valorisées pour la production de composés aromatiques, d'enzymes ou de biocarburants (Güneşer et al., 2015 ; Löser et al., 2015 ; Kieliszek et al., 2017). Certaines levures sont pathogènes, comme *Candida albicans* (Dermawan et al., 2018) ou *Cryptococcus neoformans* (Shribman et al., 2018 ; Poley et al., 2019).

Par ailleurs, les cellules de levure peuvent servir de **microcapsules naturelles**. Leurs dimensions (ex. : 5–10 µm pour *S. cerevisiae* ; jusqu'à 40 µm pour *Blastomyces dermatitidis* (Walker et al., 2002) et leur paroi robuste en font des systèmes efficaces d'encapsulation de composés hydrophobes (Shank, 1976). Elles permettent d'améliorer la solubilité et la stabilité thermique et oxydative de molécules actives (Shi et al., 2007 ; da Silva Lima et al., 2017 ; Kogan et al., 2005, 2008 ; Iassonova et al., 2008 ; Wu et al., 2015). Leur efficacité dépasse souvent celle d'encapsulants classiques (Sultana et al., 2018 ; Beikzadeh et al., 2019 ; Paramera et al., 2011).

## 2. Encapsulation par levure Intérêt commercial et médical

Depuis le premier brevet en 1976 concernant l'encapsulation de composés lipophiles dans les cellules de levure (Shank, 1976), de nombreuses applications industrielles ont émergé : papier autocopiant (Pannell, 1986), assouplissants textiles (Behan & Perring, 1992), parfums (Nelson, 2002), nicotine pour le sevrage tabagique (McNeight, 2003), administration muqueuse de médicaments (Gordon et al., 2000), extraits végétaux (Siegel et al., 2008), ou encore arômes alimentaires (Barra et al., 2012).

Sur le plan médical, les microcapsules à Base de levure présentent des effets bénéfiques potentiels sur la santé, bien que les mécanismes sous-jacents restent partiellement élucidés. Certaines études montrent une activité anti-mutagénique, possiblement synergique avec la chimiothérapie

(Chorvatovičová *et al.*, 1999). Cette activité pourrait être liée à l'activation de cellules immunitaires reconnaissant, phagocytant et réagissant aux cellules de levure (Fuller *et al.*, 2007 ; Ciamponi *et al.*, 2012).

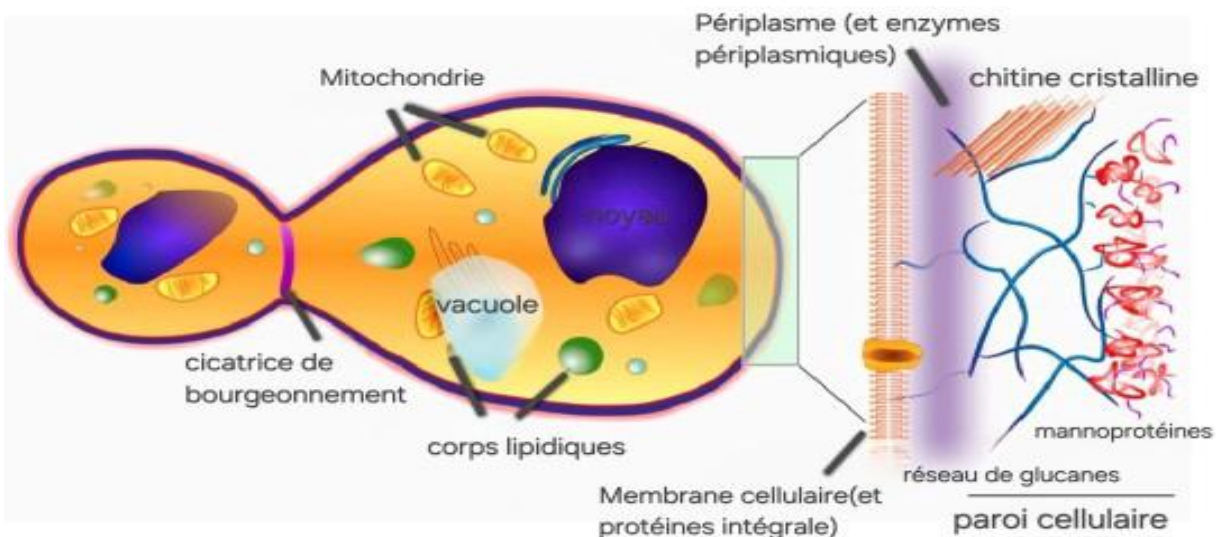
Des observations suggèrent également que les levures peuvent moduler la perméabilité des barrières épithéliales, en ouvrant les jonctions serrées (Fuller *et al.*, 2007), ce qui est prometteur pour la délivrance ciblée de substances via la barrière intestinale. Toutefois, cet effet peut aussi être une conséquence d'une réaction inflammatoire, comme celle induite par *Candida albicans* lors de l'invasion des tissus (Upadhyay *et al.*, 2017 ; Stubbs *et al.*, 2001).

D'un point de vue immunologique, les microcapsules à Base de levure peuvent induire une réponse immunitaire complexe. Utilisées pour transporter des antigènes (Huang *et al.*, 2010 ; Pan *et al.*, 2015 ; De Smet *et al.*, 2013), ou des nanoparticules (Soto *et al.*, 2012), elles ont montré une activité immunosuppressive in vivo, même en absence de traitements spécifiques (Gao *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2017).

Ces effets semblent reposer sur des mécanismes pro-apoptotiques et immunomodulateurs combinés (Ghoneum *et al.*, 2008)

### 3. Les cellules de levure et leurs structures barrière

Les cellules de levure possèdent une paroi cellulaire externe et une membrane interne entourant leur environnement intracellulaire, comme illustré dans la Figure 6.



**Figure 6** : Structure post-bourgeonnement d'une cellule de levure : zoom sur les barrières à l'encapsulation (paroi et membrane cellulaires) (Coradello & Tirelli, 2021)

### 3.1. Paroi cellulaire

Chez les levures, la paroi cellulaire représente environ 15 à 20 % de la masse sèche de la cellule. Son épaisseur est très variable (de 70 à 200 nm), car elle augmente en réponse aux forces de compression ou aux contraintes osmotiques (Nelson et al., 2006). Structurellement, il s'agit d'une matrice hautement polaire à double couche, assimilable à un hydrogel.

La couche interne est principalement composée de glucanes  $\beta$ -(1,3) et  $\beta$ -(1,6) ramifiés, représentant environ 50 % de l'ensemble de la paroi (Klis *et al.*, 2002). Ces glucanes sont liés par des liaisons hydrogène à 3 à 4 % de chitine, majoritairement cristalline (McLellan *et al.*, 1970). Cette couche interne constitue probablement le principal élément responsable de la résistance mécanique globale de la paroi cellulaire (Aguilar-Uscanga & François, 2003).

La couche externe, quant à elle, est essentiellement constituée de mannoprotéines, des protéines chargées négativement, fortement N- ou O-glycosylées avec des résidus de mannose ou de phosphate de mannosyle. Ces résidus sont liés entre eux par des liaisons  $\alpha$ -1,2 ;  $\alpha$ -1,3 ;  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6, ces dernières formant principalement des chaînes courtes appelées mannanes (Lesage & Bussey, 2006).

Les mannoprotéines sont les principaux contributeurs aux propriétés de surface de la paroi cellulaire. Par exemple, les résidus anioniques de phosphate de mannosyle déterminent la charge de surface des cellules de levure (Friis & Ottolenghi, 1970), et leur diminution augmente l'hydrophobicité de la cellule (Singleton et al., 2005). De plus, par leur liaison covalente à la couche de  $\beta$ -glucane, les mannoprotéines participent à la porosité externe de la paroi (Zlotnik et al., 1984) et, surtout, à l'adhésion des levures. Par exemple, les adhésines de *Candida albicans*, qui assurent sa fixation aux cellules épithéliales buccales, sont toutes des mannoprotéines (Cannon & Chaffin, 1999).

Il est à noter que la composition générale de la paroi cellulaire est relativement constante entre les différentes espèces de levures (Gow *et al.*, 2017). Celle de *Saccharomyces cerevisiae* est d'ailleurs considérée comme représentative de la plupart des Ascomycètes (Kapteyn *et al.*, 1999). Toutefois, bien que les composants principaux soient conservés, la composition détaillée est loin d'être simple : environ 1 200 gènes sont impliqués dans des fonctions liées à la paroi cellulaire (de Groot *et al.*, 2001).

### 3.2. Membrane plasmique

La membrane plasmique est constituée en proportions équivalentes de lipides (essentiellement des glycérophospholipides et des acides gras), ainsi que d'une moindre quantité de stérols, tels que l'ergostérol, et de sphingolipides. Elle contient également une part importante de protéines. Cette membrane est connectée à la paroi cellulaire par l'intermédiaire de glycoprotéines et de glycolipides. Une zone appelée périplasma, discontinue et riche en enzymes, la sépare de la paroi. Son rôle principal est d'assurer la régulation des échanges entre le milieu intracellulaire et l'environnement externe (Grillitsch *et al.*, 2014).

La composition lipidique varie selon les feuillettes de la membrane : la couche externe est principalement composée de phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, acide phosphatidique et sphingolipides, tandis que la couche interne contient surtout des phospholipides à charge négative tels que la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol (Aguilar-Uscanga & François, 2003).

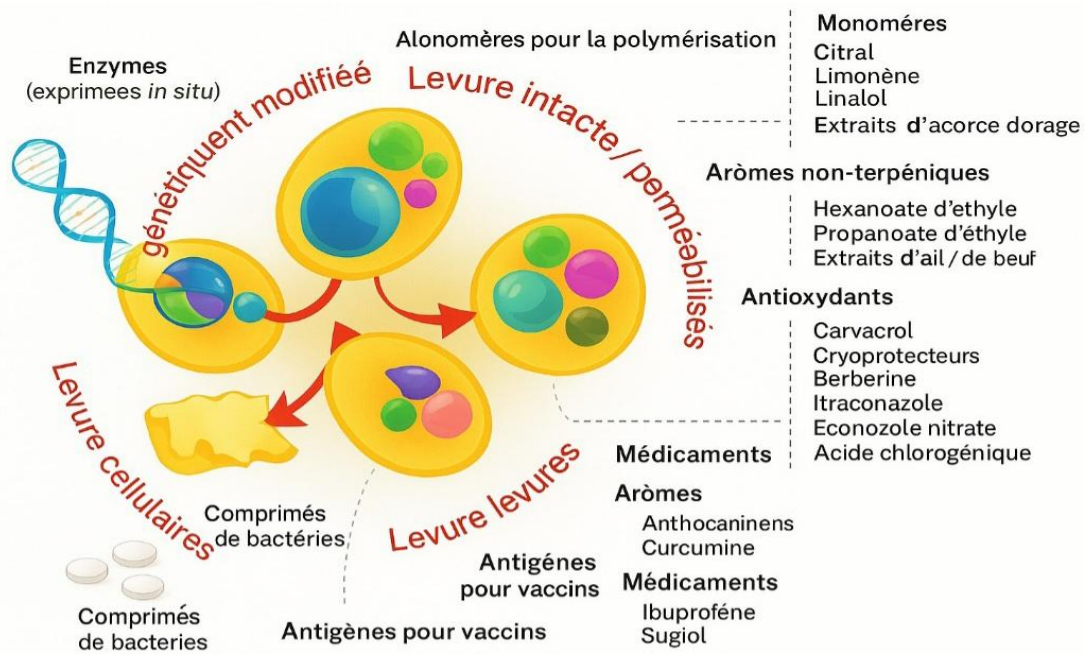
À l'image des cellules de mammifères, la membrane plasmique présente également des radeaux lipidiques, structures spécialisées impliquées dans la ségrégation et l'ancrage des protéines membranaires (Bagnat *et al.*, 2000). Ces microdomaines influencent des processus clés tels que la croissance, la mort cellulaire (Mollinedo, 2012), l'accouplement et la division (Bagnat & Simons, 2002).

### 3.3. Ultrastructure intracellulaire

L'intérieur de la levure est compartimenté en plusieurs organites : un noyau, une ou, plus fréquemment, plusieurs vacuoles, des mitochondries, le réticulum endoplasmique, ainsi qu'un ensemble de structures vésiculaires incluant les peroxyosomes et les oxisomes. Il convient de noter que les vacuoles sont de grande taille — parfois comparables à celle du noyau —, faiblement acides (pH 6–6,5), et assurent à la fois des fonctions de stockage, de digestion et de réponse au stress. Sur le plan fonctionnel, elles s'apparentent aux lysosomes ou aux autophagosomes des cellules de mammifères (Thumm, 2000 ; Li & Kane, 2009).

## 4. Types des microcapsules à base de levures

Quatre approches principales sont utilisées pour produire des matériaux qui, bien que morphologiquement et fonctionnellement différents, peuvent être regroupés sous le terme de YBMCs (microcapsules à base de levures), comme résumé dans la Figure 7.



**Figure 7** : Classes de microcapsules à base de levure (YBMCs) selon leur mode de production (Coradello & Tirelli, 2021)

Les microcapsules à base de levures se classent en quatre grandes catégories selon qu'elles utilisent des cellules de levure intactes, perméabilisées, des fragments de paroi cellulaire, ou des levures génétiquement modifiées. Ces systèmes permettent l'encapsulation passive ou la production intracellulaire de composés actifs.

#### 4.1. Cellules intactes (sans prétraitement)

Des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* non traitées ont été utilisées pour encapsuler divers composés hydrophobes, principalement à des fins alimentaires. On retrouve parmi eux des terpènes comme le limonène, le linalol et la carvone (Ciamponi *et al.*, 2012), des parfums (Behan & Perring, 1992), des cryoprotecteurs (Blanquet-Diot *et al.*, 2005), des médicaments hydrophobes comme l'itraconazole et le fénofibrate (Sangwai & Vavia, 2011), le nitrate d'éconazole (Nelson *et al.*, 2006), des huiles essentielles (Bishop *et al.*, 1998 ; Workman *et al.*, 2020) et de l' $\alpha$ -tocophérol (Czerniak & Jankowski, 2013).

Cependant, l'efficacité d'encapsulation est souvent inférieure à celle obtenue avec des cellules prétraitées, comme observé pour l'huile de graines de pourpier (Kavosi *et al.*, 2017), la vitamine

D3 (Dadkhodazade *et al.*, 2018), la berbérine (Salari *et al.*, 2013) ou la curcumine (Paramera *et al.*, 2011 ; Ruphuy *et al.*, 2020). Il est aussi souligné que des levures dites « intactes » peuvent déjà être partiellement autolysées selon leur origine (Errenst *et al.*, 2021 ; Ciamponi *et al.*, 2012).

#### 4.2. Cellules perméabilisées

##### a) Par plasmolyse (traitement osmotique)

La plasmolyse, souvent induite par NaCl à 5–10 % à 54–55 °C, permet l'encapsulation de composés hydrosolubles comme l'acide chlorogénique (Shi *et al.*, 2007), l'huile de krill (Fu *et al.*, 2021), la curcumine (Paramera *et al.*, 2011 ; Young & Nitin, 2019), la vitamine D3 (Dadkhodazade *et al.*, 2018), le limonène, ou des extraits d'ail et de bœuf (Ciamponi *et al.*, 2012 ; Dardelle *et al.*, 2007), ainsi que le resvératrol (Shi *et al.*, 2008 ; Semouma *et al.*, 2024).

##### b) Par solvants organiques

Des solvants comme l'acétate d'éthyle, l'éthanol ou le toluène sont aussi utilisés pour perméabiliser les cellules (Czerniak *et al.*, 2015 ; Takaloo *et al.*, 2020 ; Champagne *et al.*, 1999). Certains auteurs réservent le terme « plasmolyse » à ces procédés, qualifiant les traitements au NaCl d'autolyse accélérée (Takaloo *et al.*, 2020). L'autolyse thermique, favorisée autour de 50–55 °C, est également efficace (Tangler & Erten, 2008), surtout lorsqu'elle est combinée à des conditions contrôlées (Czerniak *et al.*, 2015).

##### c) Par digestion enzymatique partielle

L'encapsulation de macromolécules nécessite souvent une dégradation partielle de la paroi cellulaire. Par exemple, l'albumine bovine ne peut pénétrer que si la membrane est perméabilisée avec du Tween-80 ou du SDS (Tangler & Erten, 2008). L'ajout de zymolyase ou de cocktails enzymatiques (ex. Glucanex R200) améliore l'encapsulation (Czerniak *et al.*, 2015). Contrairement à ce qui a été rapporté par erreur (Chow & Palecek, 2004), les protéases ont un effet positif. Des cellules appauvries en  $\beta$ -glucanes ont permis d'encapsuler des composés comme le citral, des esters aromatiques (hexanoate, propionate d'éthyle) (Sultana *et al.*, 2013), ou le carvacrol (da Silva Lima *et al.*, 2017).

##### d) Solvants utilisés pendant l'encapsulation

Des solvants peuvent aussi être incorporés directement lors de l'encapsulation. L'alcool benzylique (30 %) a permis d'encapsuler l'itraconazole (Sangwai & Vavia, 2011), alors que l'éthanol à 50 % était inefficace pour le resvératrol et la curcumine (Shi *et al.*, 2008 ; Paramera *et*

*al.*, 2011). L'éthanol pur a été utilisé pour des monomères polymérisables (Pham-Hoang *et al.*, 2016), et le DMSO pur a montré une grande efficacité pour les polymères hydrophobes (Ma *et al.*, 2016).

#### e) Autres traitements

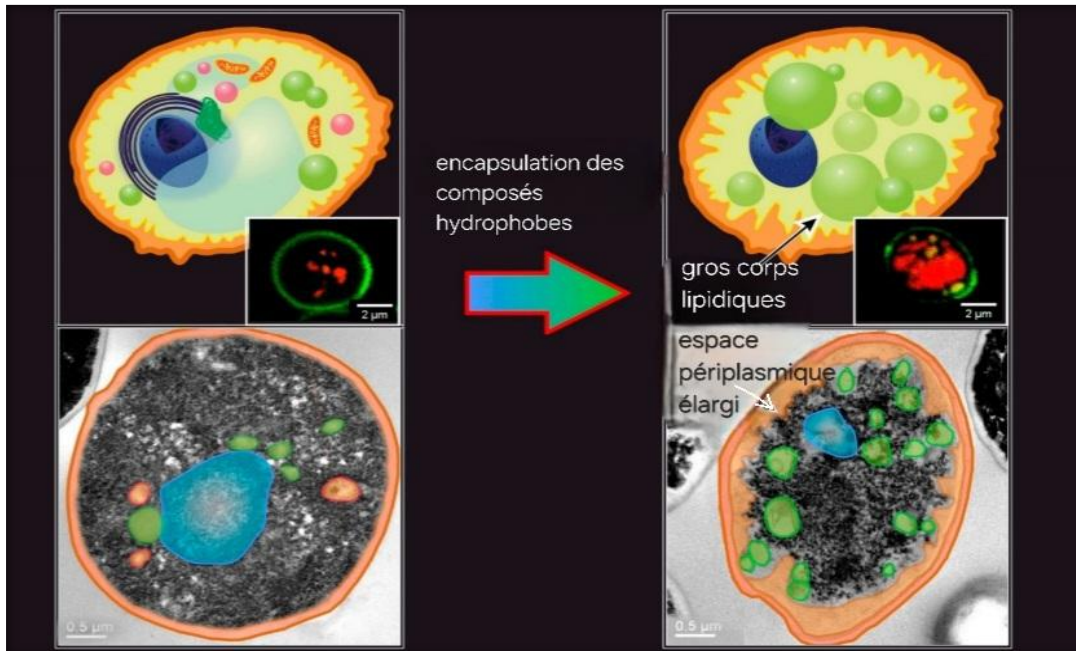
Certaines méthodes comme l'**autoclavage** (121 °C pendant 20 minutes) (Bishop *et al.*, 1998) et le **blanchiment** au peroxyde d'hydrogène (1 % à pH 13 pendant 4 h) (Sangwai et Vavia, 2011) améliorent l'encapsulation de composés hydrophobes. Ces traitements, qui affectent l'ensemble des composants cellulaires, sont à considérer comme intermédiaires entre une simple perméabilisation et des procédés plus extrêmes aboutissant à l'obtention de parois cellulaires isolées.

La **réduction des mannoprotéines** (liées par des ponts disulfures) avec des agents comme le  $\beta$ -mercaptoéthanol (Tanguler et Erten, 2008 ; Chow et Palecek, 2004) ou le dithioérythritol (Ma *et al.*, 2016) a montré peu d'effet sur l'encapsulation, malgré des résultats parfois contradictoires dans la littérature.

La **lyophilisation** est aussi susceptible d'affecter la perméabilité des membranes. Son usage est fréquent (souvent préféré aux cellules « humides »), et elle pourrait améliorer la perméabilité (Sangwai et Vavia, 2011), bien que cela reste peu étudié, notamment à cause de la variabilité des procédés et des cryoprotecteurs utilisés. Ainsi, la lyophilisation n'est généralement pas considérée comme un traitement de perméabilisation à part entière

### 5. Les variables contrôlant l'encapsulation passive

L'encapsulation passive dans les microcapsules à base de levures intactes (catégorie 1) repose sur un mécanisme de diffusion ne nécessitant pas d'énergie, permettant la pénétration de molécules actives, notamment hydrophobes. Ce processus conduit à une modification marquée de l'ultrastructure cellulaire : accumulation de corps lipidiques, désorganisation cytoplasmique, et expansion de l'espace périplasmique (zone entre la paroi cellulaire et le contenu intracellulaire résiduel), comme observé en microscopie électronique et confocale Federico Catalano, IIT( Figure 8)



**Figure 8 :** Modifications ultrastructurales induites par l'encapsulation d'hydrophobes dans des cellules de levure intactes observations en microscopie électronique en transmission (Coradello & Tirelli, 2021)

#### a) Rapport massique levure/composé hydrophobe

Le rapport entre la masse de levure sèche et celle du composé à encapsuler est un paramètre fondamental qui influence l'efficacité (EE%) et le rendement (EY%) de l'encapsulation. Une augmentation de la quantité de composé hydrophobe par rapport à la levure peut améliorer le rendement, comme l'ont montré Paramera (2011) avec la curcumine, jusqu'à atteindre un plateau à un rapport de 3,3. Pour normaliser les résultats entre différentes études, Paramera *et al.* (2014) ont introduit le paramètre ESY%, basé uniquement sur la masse de levure sèche.

#### b) Température

La température affecte directement la fluidité de la membrane plasmique. À des températures modérées (30–37 °C), la fluidité des membranes s'accroît, facilitant la diffusion des molécules hydrophobes. Des températures plus élevées (jusqu'à 60 °C) peuvent être utilisées temporairement pour améliorer l'encapsulation, notamment dans les cellules non viables, sans dégrader les composés encapsulés (Simonin *et al.*, 2008 ; Bishop *et al.*, 1998).

**c) Méthodes physiques (pression, PEF, vide)**

Des traitements physiques peuvent accroître la perméabilité membranaire. Les champs électriques pulsés (PEF) créent des pores transitoires dans les membranes, permettant l'entrée de grosses molécules (Ganeva *et al.*, 1995 ; Stirke *et al.*, 2019). L'application d'un vide, quant à elle, favorise la pénétration de composés hydrophobes modérément solubles en réduisant la pression interne, facilitant ainsi leur diffusion (Young *et al.*, 2017).

**d) Teneur en eau**

L'eau est indispensable pour maintenir la flexibilité de la paroi cellulaire et la fluidité membranaire. Une humidité relative d'au moins 20 % est nécessaire pour permettre l'encapsulation (Dardelle *et al.*, 2007), et l'activité de l'eau doit dépasser 0,7 pour que le processus soit efficace (Dimopoulos *et al.*, 2021). En son absence, l'encapsulation est totalement inhibée (Sultana *et al.*, 2017). Un traitement hyperosmotique préalable peut également améliorer la perméabilité cellulaire (Pedrini *et al.*, 2013).

**e) Taille moléculaire du composé**

La taille du composé était historiquement considérée comme un facteur limitant. Scherrer *et al.* (1974) ont proposé un seuil de 700 Da. Toutefois, cette limite est discutable : Bishop *et al.* (1998) ont montré que des composés de masse similaire peuvent avoir des taux d'encapsulation très différents. Zhang *et al.* (2017) ont même observé le passage de nanoparticules de 15 nm à travers la paroi.

**f) Polarité et logP**

La polarité des composés encapsulés est un facteur déterminant. Le coefficient de partage octanol/eau (logP) est utilisé pour estimer la lipophilie : un logP > 1 est nécessaire pour l'encapsulation, et un logP > 2 permet souvent un taux d'encapsulation supérieur à 50 % (Dardelle *et al.*, 2007). Cependant, la solubilité dans la phase aqueuse est également essentielle pour que le composé traverse la paroi avant d'atteindre la membrane plasmique. Un déséquilibre entre ces deux propriétés limite l'encapsulation (Ciamponi *et al.*, 2012).

**g) Entropie de solubilization**

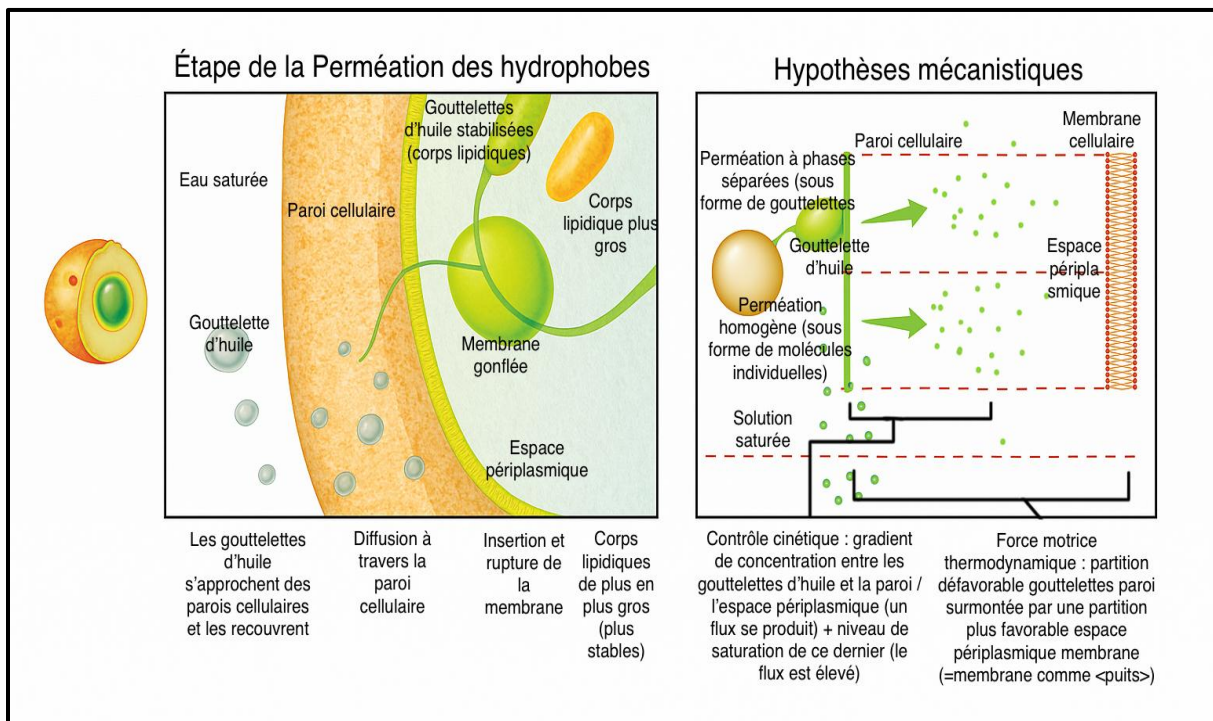
Ma *et al.* (2016) ont proposé une approche basée sur l'entropie. Les petites molécules provoquent un gain entropique plus élevé lors de leur insertion dans les membranes, ce qui favorise leur diffusion. En revanche, les grandes molécules présentent un gain entropique moindre, limitant ainsi leur capacité à pénétrer la cellule.

**h) Mécanisme de transport**

Étape limitante du processus d'encapsulation (Stirke *et al.*, 2019), en raison de l'absence de protéines de transport (De Nobel et Barnett, 1991), la diffusion passive domine: (i) diffusion de molécules individuelles, (ii) diffusion sous forme de solutions saturées, et (iii) diffusion de gouttelettes d'huile. Cette dernière semble peu probable compte tenu de la taille des pores nécessaires. La diffusion passive à travers la paroi est généralement considérée comme l'étape limitante du processus (Stirke *et al.*, 2019).

**6. Encapsulation des substances hydrophobes**

Le processus d'encapsulation s'articule en quatre phases successives (figure 9)



**Figure 9** : Mécanismes d'encapsulation et de perméation des composés hydrophobes chez les levures : (A) Processus d'encapsulation diffusionnelle (B) Hypothèses sur la perméation des hydrophobes à travers la paroi cellulaire (Coradello & Tirelli, 2021)

Le processus d'encapsulation des composés hydrophobes dans les cellules de levure intactes peut être décrit comme une séquence d'étapes : adsorption des gouttelettes des molécules hydrophobes à la surface de la cellule, perméation à travers la paroi cellulaire et l'espace périplasmique, pénétration dans la membrane plasmique, puis désorganisation membranaire et

distribution intracellulaire des hydrophobes sous forme de corps lipidiques (Ciamponi *et al.*, 2012).

La **première étape**, l'**adsorption**, repose sur la tendance naturelle des gouttelettes des substances hydrophobes à adhérer à la surface des cellules. Ce phénomène, observé par Kim *et al.* (2000) chez *Yarrowia lipolytica*, est favorisé par l'absence de tensioactifs dans la majorité des procédés, ce qui permet de réduire l'énergie de surface des gouttelettes. Paramera *et al.* (2011) ont aussi observé des amas cellulaires, probablement dus à des couches huileuses interfaciales. L'adsorption est un processus exothermique, avec une efficacité maximale supposée en dessous de 35 °C (Aksu et Tezer, 2000). Bien que bien caractérisée pour les polluants solubles (métaux, colorants, etc.) (Göksungur *et al.*, 2005 ; Guler et Sarioglu, 2014 ; Bell et Tsezos, 1987 ; Aksu et Dönmez, 2003 ; Aksu, 2005), l'adsorption des composés hydrophobes reste difficile à modéliser à cause des phénomènes fluidiques et cinétiques hors équilibre.

La **deuxième étape**, la **perméation à travers la paroi cellulaire**, est souvent considérée comme limitante (Stirke *et al.*, 2019). Aucun transporteur n'étant présent dans la paroi (De Nobel et Barnett, 1991), la diffusion passive de molécules individuelles est supposée. Trois voies sont théoriquement possibles : diffusion depuis des gouttelettes adsorbées, depuis une solution saturée ou via des gouttelettes entières. Les données excluent cette dernière hypothèse, car les hydrophobes doivent être sous forme moléculaire pour perméabiliser la paroi. En particulier, l'étude de Ciamponi *et al.* (2012) démontre que les mélanges limonène/polysulfure encapsulent selon les propriétés individuelles des composants, suggérant une diffusion moléculaire indépendante de la viscosité des gouttelettes. Le gradient de concentration est maximal entre les gouttelettes adsorbées et l'espace périplasmique, rendant cette voie la plus efficace.

La **troisième étape**, la **traversée de la membrane cellulaire**, intervient après la sortie des molécules de la paroi. Les composés avec un logP entre 2 et 3 s'accumulent dans la membrane lipidique, la transformant en un « puits » thermodynamique. Cependant, l'accumulation excessive conduit à la rupture de la membrane plasmique, un phénomène observé dans les levures encapsulées (Ciamponi *et al.*, 2012). La perte d'intégrité membranaire permet la redistribution des hydrophobes dans d'autres structures lipidiques intracellulaires. La disparition de la membrane plasmique peut ralentir la diffusion, car les hydrophobes doivent traverser un espace périplasmique élargi pour atteindre d'autres membranes.

Enfin, une cinétique biphasique a été observée : une première phase rapide (moins de 10 minutes), suivie d'une seconde plus lente (plusieurs heures). Cela a été interprété comme une phase initiale de gonflement et de rupture de la membrane, suivie d'une phase de redistribution des hydrophobes dans les corps lipidiques intracellulaires (Ciamponi *et al.*, 2012).

## **Matériel et méthodes**

### 1. Lieu de l'étude

L'étude a été conduite au sein du laboratoire de biochimie et microbiologie du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, ainsi qu'au laboratoire de chimie des sols du Département des Sciences Agronomiques de l'Université du 20 Août 1955 de Skikda, en Algérie. Son principal objectif est d'évaluer l'effet de l'encapsulation dans des cellules de levure sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des écorces de *Citrus sinensis*

### 2. Matériel végétal

Les oranges (*Citrus sinensis*) ont été récoltées en février 2025 dans la région d'El Hadeik (Skikda), dans le cadre d'un projet de valorisation domestique des déchets d'agrumes. Après la récolte, les écorces ont été séparées, conditionnées dans des sacs plastiques, puis rapidement transportées au laboratoire pour traitement.

### 3. Préparation des échantillons

Après leur collecte, les écorces ont été soigneusement lavées à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières, les microorganismes et d'éventuels résidus de pesticides. Elles ont ensuite été découpées manuellement en petits fragments d'environ 1 à 2 cm<sup>2</sup> pour favoriser un séchage homogène et optimiser la surface d'extraction. Enfin, les fragments obtenus ont été séchés dans une étuve ventilée à 38 °C pendant deux heures.

### 4. Méthodologie

#### 4.1. Extraction des composés phénoliques

Un échantillon de 500 g d'écorces de *Citrus sinensis* a été découpé en petits morceaux, puis placé dans un mortier contenant une quantité appropriée d'éthanol. Le mélange a été soigneusement broyé jusqu'à l'obtention d'une consistance homogène. Le broyat obtenu a ensuite été transféré dans un bécher, et 500 mL d'éthanol y ont été ajoutés afin de recouvrir complètement les fragments. Le bécher a été couvert à l'aide de papier aluminium et maintenu dans un environnement propre, à l'abri de la lumière, pendant 24 heures. Après la macération, la solution a été filtrée pour récupérer l'extrait, puis le solvant a été éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 60 °C. Les extraits obtenus ont été ensuite séchés dans une étuve à 40 °C (Sasidharan *et al.*, 2011).

### 4.2. Microencapsulation des composés phénoliques

#### 4.2.1. Préparation de la souche de levure

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* utilisée dans cette étude a été cultivée sur milieu sabouraud en boîte de Pétri à 27 °C pendant 48 heures. À l'issue de l'incubation, les cellules ont été prélevées et utilisées pour inoculer un milieu liquide de bouillon nutritif, ajusté à une densité optique de 0,2 mesurée à 600 nm. Les cultures ont été incubées à 27 °C sous agitation continue à 140 tr/min. Après incubation, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4000 tr/min pendant 10 minutes (Nguyen *et al.*, 2018).

#### 4.2.2. Plasmolyse des souches de levures

Quarante grammes de levure ont été suspendus dans 500 mL d'une solution de NaCl à 10 %. La suspension a été placée sur un agitateur magnétique et soumise à une plasmolyse pendant 24 heures à 55 °C. Après traitement, les cellules ont été centrifugées à 2000 g pendant 10 minutes. Le culot obtenu a été lavé avec de l'eau distillée, puis agité à température ambiante pendant une heure afin d'éliminer les résidus de NaCl. Ce processus de lavage a été répété deux fois supplémentaires, avec centrifugation après chaque étape. Enfin, les cellules ont été lyophilisées (Kurek *et al.*, 2023 ; Semouma *et al.*, 2024).

#### 4.2.3. Microencapsulation des composés phénoliques

L'encapsulation des extraits phénoliques a été réalisée à l'aide de cellules de levure intactes ainsi que de cellules plasmolysées. Le procédé a été conduit en milieu aqueux, en maintenant un rapport massique de 5:1 entre la biomasse levurienne et l'extrait, avec un hydromodule de 1:100. L'encapsulation a été effectuée dans un agitateur thermostatique, à 200 tr/min et à une température constante de 37 °C pendant 24 heures (Kalinina *et al.*, 2022).

#### 4.2.4. Analyse microscopique des extraits encapsulés

Une analyse microscopique a été menée afin d'examiner la répartition des extraits phénoliques encapsulés et leur interaction avec les cellules de levure utilisées comme matrices. Deux configurations d'encapsulation ont été étudiées : l'une utilisant des levures intactes, l'autre des levures ayant subi une plasmolyse. Pour l'observation, une goutte de chaque suspension a été déposée sur une lame porte-objet, puis recouverte d'une lamelle couvre-objet. Les examens ont été réalisés à l'aide d'un microscope optique avec un grossissement de 100x. Cette approche a permis d'observer la localisation des extraits, soit à la surface des cellules, soit à leur intérieur,

ainsi que d'identifier les différences morphologiques entre les levures intactes et plasmolysées, en lien avec leur efficacité d'encapsulation.

### 4.2.5. Efficacité d'encapsulation

L'évaluation de l'efficacité d'encapsulation vise à mesurer la capacité des levures, intactes et plasmolysées, à piéger les polyphénols. Elle s'effectue en déterminant le pourcentage de polyphénols encapsulés par rapport à leur concentration initiale avant encapsulation. Pour extraire les polyphénols totaux encapsulés, 0,2 g de poudre ont été mélangés avec 2 mL d'un solvant constitué d'éthanol, d'acide acétique et d'eau dans un rapport 50 :8 :42 (v/v/v). Ce mélange a été agité pendant 30 minutes afin d'optimiser l'extraction, puis centrifugé à 3000 tours par minute pendant 10 minutes pour séparer les particules solides. Les concentrations en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins ont ensuite été déterminées par des méthodes spectrophotométriques selon Robert et al. (2010).

L'efficacité d'encapsulation des composés phénoliques est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$EE (\%) = \frac{TPE}{TPT} \times 100$$

Où

- **TPE** : représente la concentration totale des polyphénols ou flavonoïdes encapsulés,
- **TPT** : correspond à la concentration des composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes) dans l'extrait non encapsulé (Cegledi *et al.*, 2022).

### 4.3. Dosage des composés phénoliques

#### 4.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La quantification des polyphénols totaux a été réalisée selon la méthode au réactif Folin-Ciocalteu, fondée sur l'oxydation des groupements phénoliques. Ce réactif, composé de sels d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique, se réduit en présence de polyphénols pour former des complexes bleus (oxydes de tungstène et de molybdène), dont l'absorbance maximale se situe entre 725 et 750 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en polyphénols. Le protocole expérimental (Waterhouse, 1999) consiste à préparer le mélange réactionnel en combinant 2 mL d'extrait à analyser, 0,2 mL de réactif Folin-Ciocalteu et 1,4 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7,5 % (m/v). Après homogénéisation, le mélange est incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 2 heures. L'absorbance est ensuite mesurée à 760 nm à l'aide d'un

spectrophotomètre UV-1800 (Shimadzu). Les concentrations sont déterminées par comparaison à une courbe d'étalonnage en acide gallique (gamme de 0 à 1 mg/mL, 6 points de calibration), et les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique (EAG) par gramme d'extrait sec. Cette méthode a été utilisée pour doser les polyphénols dans les extraits d'orange avant et après microencapsulation, afin d'évaluer l'efficacité du procédé.

### 4.3.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été réalisée selon une méthode décrite par Chang *et al.* (2002), avec quelques ajustements. Cette méthode repose sur la formation d'un complexe stable entre les groupes hydroxyles en position 4 et 5 des flavonoïdes et le chlorure d'aluminium, entraînant l'apparition d'une coloration jaune mesurable à 415 nm dans le spectre visible.

Pour déterminer la teneur en flavonoïdes dans les extraits des oranges, qu'ils soient encapsulés ou non, 0,2 ml de chaque échantillon sont mélangés avec 1,72 ml d'éthanol à 96 %, 0,4 ml de chlorure d'aluminium à 10 %, et 1 ml d'acétate de sodium 1 M. Le mélange est ensuite agité, puis incubé à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 415 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-1800 (Shimadzu). Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent quercétine par gramme d'extrait sec, en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine.

### 4.4. Analyse FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) a été utilisée pour analyser les extraits d'écorces d'orange avant et après encapsulation. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre FTIR Cary 600, équipé de l'accessoire MIRacle™ ATR à réflexion unique avec cristal de diamant (PIKE Technologies). Les échantillons analysés comprenaient les extraits phénoliques non encapsulés, les cellules de levure intactes, ainsi que les extraits encapsulés dans des cellules de levure intactes et plasmolysées. Les spectres ont été acquis en moyennant 32 scans, dans une gamme spectrale de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ , avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ , conformément à la méthode décrite par Sala *et al.* (2020).

### 4.5. Effet de la microencapsulation sur l'activité antioxydante

L'impact de la microencapsulation sur l'activité antioxydante des extraits d'écorces d'orange a été évalué en comparant les extraits avant et après encapsulation. L'analyse a été

réalisée à l'aide de la méthode ABTS (2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) et la méthode de réduction

### 4.5.1. Méthode ABTS

La méthode ABTS repose sur la capacité des composés antioxydants à neutraliser le radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$ , entraînant ainsi une diminution de l'intensité de sa coloration bleu-vert. Le radical  $ABTS^{\bullet+}$  est un dérivé ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline) -6-sulfonique, généré par oxydation de l'ABTS initialement incolore.

La formation du radical s'effectue en deux étapes : d'abord, le persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ) oxyde l'ABTS en lui arrachant un électron, produisant ainsi le radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$ . Ensuite, en présence d'un antioxydant capable de donner un proton ( $H^+$ ), ce radical est réduit en  $ABTSH^+$ , ce qui provoque une décoloration progressive de la solution (Re et al., 1999).

Pour la préparation de la solution mère d' $ABTS^{\bullet+}$ , 19,2 mg d'ABTS sont dissous dans 5 mL d'eau distillée, puis 3,3 mg de  $K_2S_2O_8$  sont ajoutés. Le mélange est ensuite incubé à l'abri de la lumière pendant 16 heures afin de permettre la formation complète du radical.

Our le test, 1 mL de la solution d'ABTS a été ajouté à chaque tube contenant différentes dilutions des extraits de plante (concentrations comprises entre 0 et 1 mg/mL). Les mélanges ont été incubés à l'obscurité pendant 30 minutes, puis l'absorbance a été mesurée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'activité antioxydante a été calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Inhibition \%}(I) = \frac{(A_0 - A_e)}{A_0} \times 100.$$

- **A<sub>0</sub>** : Absorbance du contrôle
- **A<sub>e</sub>** : Absorbance d'échantillon

Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS ont été tracés en fonction des concentrations des extraits, permettant la détermination de l'indice  $IC_{50}$ , qui correspond à la concentration nécessaire pour réduire de 50 % l'activité radicalaire. Un  $IC_{50}$  faible est le reflet d'une forte activité antioxydante.

### 4.5.2. Évaluation de l'activité réductrice par la méthode à la phénanthroline

L'activité réductrice des extraits des écorces d'orange a été évaluée selon la méthode à la phénanthroline décrite par Szydłowska-Czerniak (2008). Pour cela, 1 mL d'extrait, à différentes concentrations (de 0 à 1 mg/mL), a été mélangé avec 5 mL de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) à 0,2 %,

3 mL de phénanthroline à 0,5 % et 11 mL de méthanol. Le mélange a été incubé à température ambiante, à l'obscurité, pendant 20 minutes. Après incubation, l'absorbance de la solution, de couleur orange-rouge, a été mesurée à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards de référence. Les résultats ont été exprimés en  $A_{0.5}$  (mg/mL), correspondant à la concentration d'extrait nécessaire pour atteindre une absorbance de 0,50.

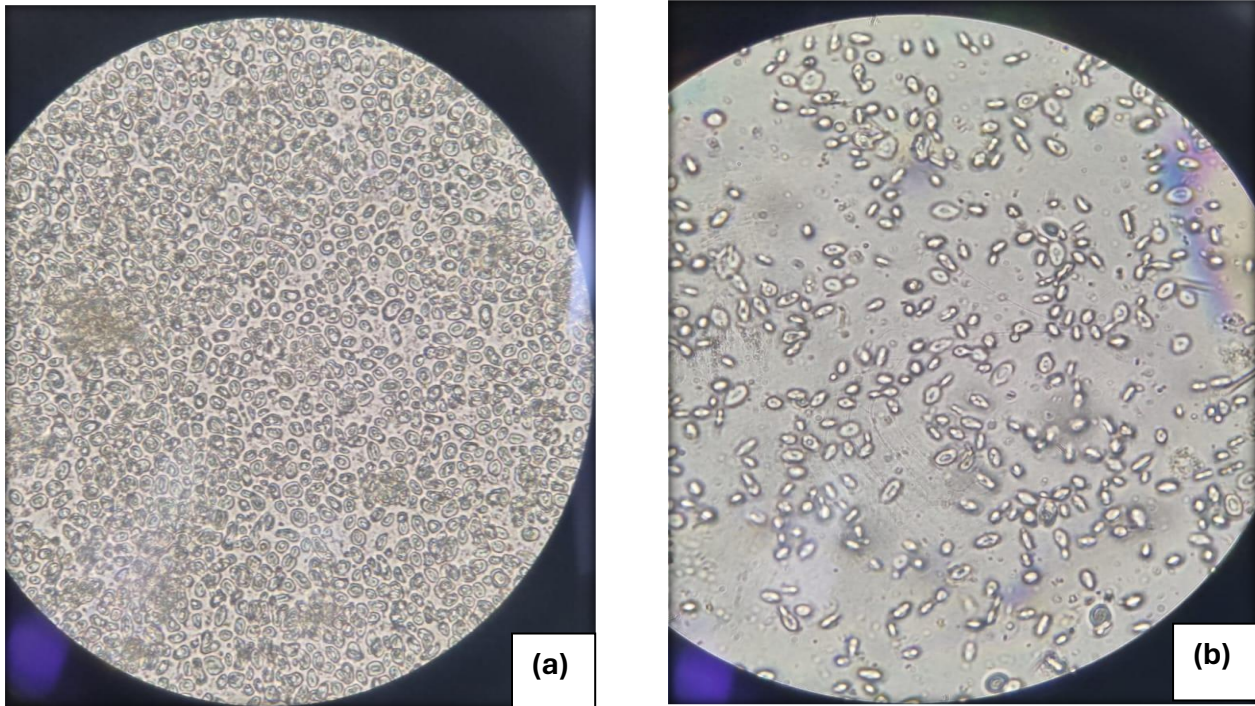
### 4.6. Analyse statistique

Les moyennes et les écarts-types issus de trois répétitions ont été calculés à l'aide du logiciel Excel 2013 (Microsoft Excel, version 3.0, Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA à un facteur, suivie du test post hoc de Tukey, à l'aide du logiciel Minitab® (version 19.1.1.0, Minitab, LLC, State College, PA, USA), afin de comparer les moyennes. Les lettres en exposant (a, b, c, d) signalent des différences significatives au seuil de 5 % ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, les spectres FTIR ont été tracés à l'aide du logiciel OriginPro 2019 SR1 (version 9.61.0000, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

## **Résultats et discussion**

### 1. Observation microscopique des capsules intactes et plasmolysées obtenues à partir d'écorces d'orange encapsulées par des cellules de levure

La figure 1 présente les observations microscopiques des microcapsules intactes et des microcapsules plasmolysées, observées à un grossissement de  $\times 100$ .



**Figure 10** : Observation microscopique à  $\times 100$  des capsules à base d'écorces d'orange encapsulées par des levures : (a) capsules plasmolysées, (b) capsules intactes.

L'image montre une observation au microscope optique à un grossissement de  $\times 100$  (Figure 10a), mettant en évidence une population dense de cellules de levure plasmolysées encapsulant un extrait ou une fraction d'écorces d'orange (Rodriguez *et al.*, 2019).

Les cellules observées sont de forme ovoïde, caractéristiques des levures du genre *Saccharomyces* (Gibbs *et al.*, 2000). Elles sont organisées de manière homogène dans le champ, et présentent des structures internes rétractées par rapport à la paroi cellulaire : un signe typique de plasmolyse (Nasseri *et al.*, 2011). Ce phénomène résulte probablement d'un traitement dans un milieu hypertonique, ou d'un stress osmotique causé par l'environnement extracellulaire (éventuellement influencé par les composés des écorces d'orange, tels que les flavonoïdes) (Moldes *et al.*, 2017). L'extrait est localisé soit au niveau de la vacuole, soit dans l'espace compris

entre la paroi cellulaire et la vacuole. Il se manifeste sous forme de zones colorées observables au microscope.

L'observation microscopique des microcapsules intactes à un grossissement de  $\times 100$  (Figure 10) révèle des cellules de levures de forme ovale, renfermant l'extrait, visible sous forme de halos colorés à l'intérieur des cellules (vacuoles). Cette structure de capsule joue un rôle crucial dans la protection cellulaire contre les agressions extérieures.

Le procédé de localisation des polyphénols dans les capsules de levures repose sur une série d'étapes physico-chimiques contrôlées par les propriétés des composés à encapsuler, l'état structural des levures et les conditions du procédé. Lors de l'encapsulation, les polyphénols présents dans un extrait végétal sont généralement peu solubles dans l'eau et tendent à s'organiser en micelles qui interagissent avec la surface des cellules de levures. Cette première étape implique une adsorption des polyphénols sur la paroi cellulaire, en particulier au niveau des mannoprotéines, riches en résidus glycosylés, et des glucanes (Coradello et Tirelli, 2021).

Ensuite, selon le traitement appliqué aux levures, deux mécanismes distincts peuvent être observés. Dans le cas des levures intactes, les polyphénols hydrophobes ou de petite taille peuvent franchir la paroi et la membrane plasmique par diffusion passive, bien que cette barrière limite fortement leur entrée, conduisant à une localisation majoritairement pariétale. En revanche, dans les levures plasmolysées, où la membrane et les organites internes sont altérés, les polyphénols diffusent plus librement à travers la paroi cellulaire pour atteindre la cavité intracellulaire. Ce transfert est facilité par la perte de l'intégrité membranaire et l'augmentation du volume périplasmique, servant de zone tampon avant le dépôt du composé dans le cytoplasme ou sous forme de corps lipidiques (Shi *et al.*, 2007 ; Ciamponi *et al.*, 2021). Le gradient de concentration entre l'environnement externe saturé et l'intérieur vide de la cellule constitue la principale force motrice de la diffusion, permettant aux polyphénols de migrer sous forme moléculaire individuelle depuis les gouttelettes adsorbées à la surface jusqu'à l'intérieur de la cellule. La stabilité thermodynamique obtenue par l'accumulation des polyphénols dans les membranes ou les lipides intracellulaires est un facteur clé de leur rétention (Ciamponi *et al.*, 2021 ; Coradello et Tirelli, 2021). Ce processus aboutit à une distribution structurée des polyphénols, soit à la surface cellulaire (mode adsorptif), soit dans l'espace intracellulaire (mode encapsulant), selon la perméabilité et l'état des cellules de levure utilisées.

## 2. Teneur en composés phénoliques des écorces de *Citrus sinensis*

### 2.1. Les courbes d'étalonnage:

Les teneurs en composés phénoliques des écorces de *Citrus sinensis* ont été évaluées à partir de courbes d'étalonnage spécifiques. L'acide gallique a été utilisé comme étalon pour la quantification des polyphénols totaux, tandis que la quercétine a servi de référence pour celle des flavonoïdes. Les résultats obtenus sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES) pour les polyphénols totaux, et en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g ES) pour les flavonoïdes (Figure 11).

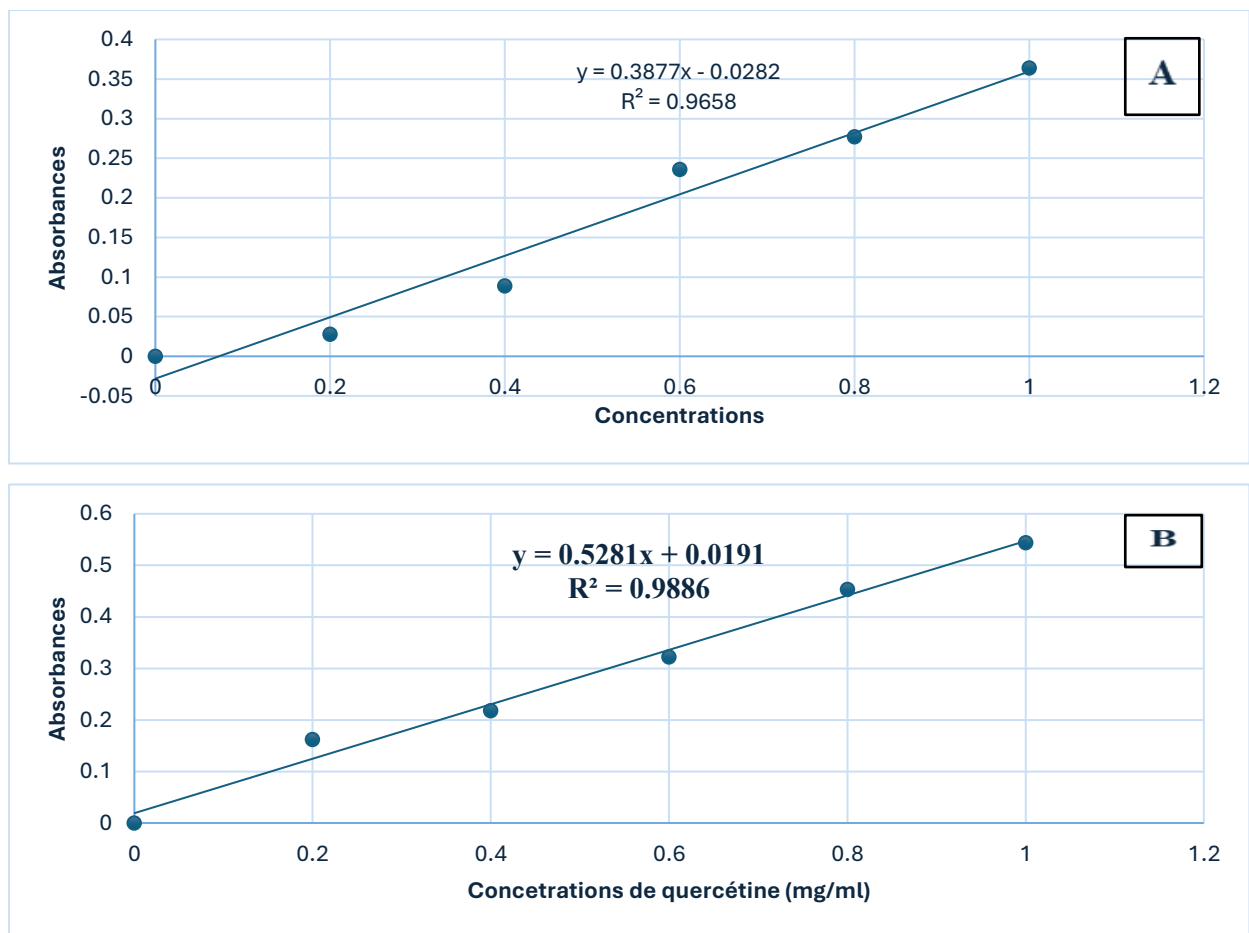


Figure 11 : Courbes d'étalonnage : A : Acide gallique, B : Quercétine

### 2.2.L'effet de l'encapsulation sur la teneur en composés phénoliques

Les teneurs en composés phénoliques, à savoir les polyphénols totaux et les flavonoïdes, mesurées avant et après l'encapsulation, sont représentées dans la figure 12.

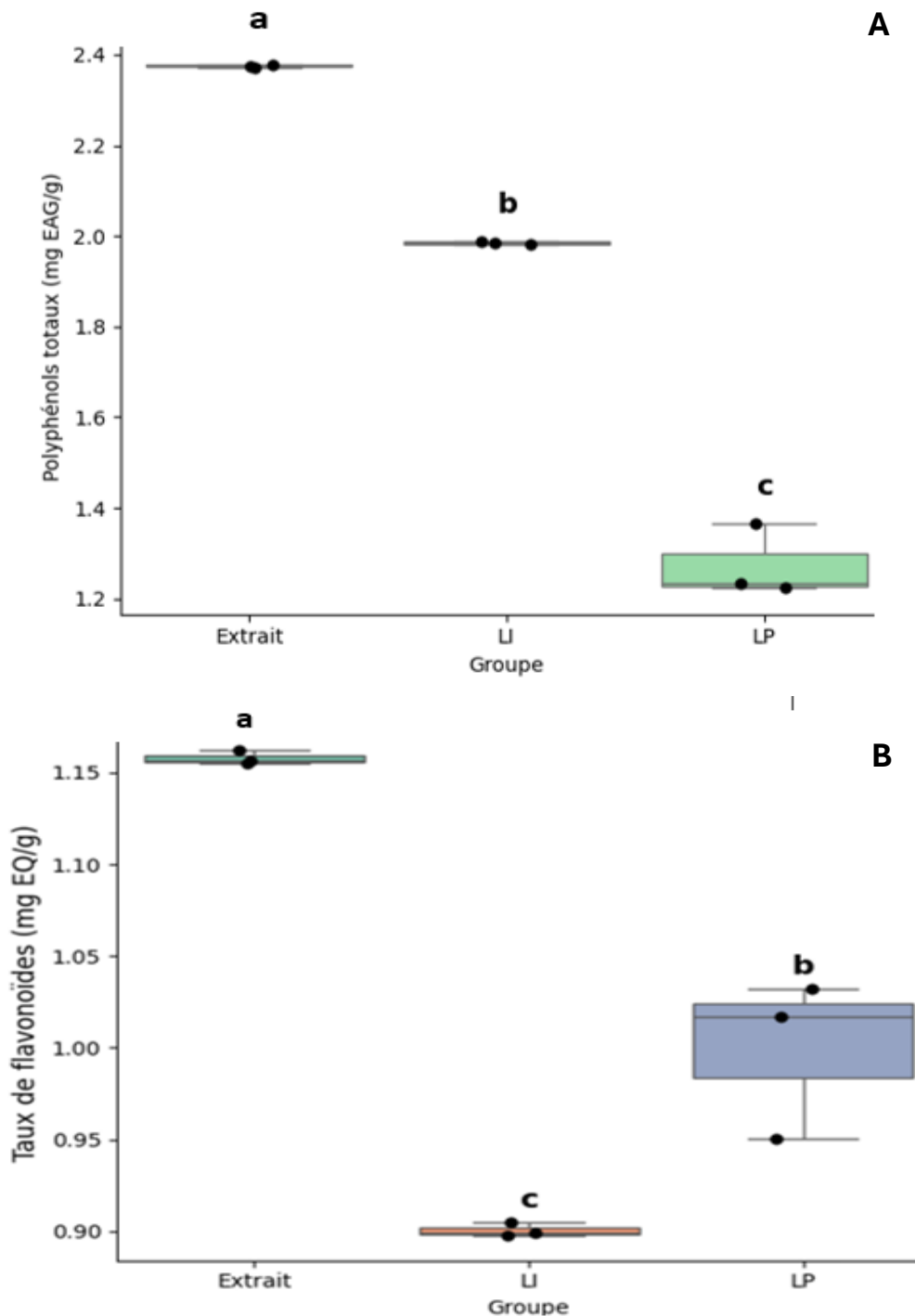


Figure 12 : Teneurs en composés phénoliques (A : polyphénols totaux, B : flavonoïdes).

L'analyse phytochimique de l'extrait d'écorces d'orange a révélé une teneur en polyphénols totaux de  $2,37 \pm 0,003$  mg EAG/g ES et en flavonoïdes de  $1,15 \pm 0,003$  mg EQ/g ES. Cette richesse en composés phénoliques est cohérente avec les valeurs rapportées dans la littérature. En effet, Li et al. (2006) ont rapporté, pour les écorces d'orange douce (*Citrus sinensis*), des teneurs en polyphénols totaux allant de 1,5 à 2,8 mg EAG/g ES, et en flavonoïdes de 0,8 à 1,5 mg EQ/g ES. De même, Ghasemi et al. (2009) ont indiqué un rapport polyphénols/flavonoïdes compris entre 1,8 et 2,1 dans les écorces de citron, ce qui confirme la richesse antioxydante de ces matrices végétales.

Les teneurs en polyphénols totaux varient de manière significative en fonction du type d'encapsulation utilisé (Figure12). L'extrait, non encapsulé, affiche la concentration la plus élevée en composés phénoliques ( $2,3759 \pm 0,0039$  mg EAG/g ES). En revanche, l'encapsulation dans des levures intactes entraîne une réduction notable de cette teneur ( $1,9849 \pm 0,0039$  mg EAG/g ES), tandis que les levures plasmolysées présentent une rétention encore plus faible ( $1,2738 \pm 0,0743$  mg EAG/g ES). Les différences observées entre les trois échantillons sont statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ), Cela démontre l'impact du système d'encapsulation sur la libération des composés phénoliques. La plus faible teneur mesurée avec les levures plasmolysées suggère que la désorganisation de la membrane cellulaire peut limiter la capacité de rétention ou favoriser la libération des polyphénols, comparativement aux levures intactes. Ainsi, l'intégrité cellulaire semble jouer un rôle déterminant dans la stabilité des métabolites encapsulés Coradello et Tirelli . (2021).

Les teneurs en flavonoïdes totaux varient significativement selon le type de traitement appliqué, comme le montre la comparaison entre les différents groupes expérimentaux Figure12. L'extrait non encapsulé présente la concentration la plus élevée en flavonoïdes ( $1,1587 \pm 0,0039$  mg EQ/g ES), ce qui reflète une disponibilité maximale des composés flavonoïdes en l'absence de système de rétention. L'encapsulation dans des levures plasmolysées entraîne une réduction modérée de la teneur en flavonoïdes ( $1,0003 \pm 0,0414$  mg EQ/g ES), tandis que l'encapsulation dans des levures intactes conduit à la plus faible concentration observée ( $0,9005 \pm 0,0032$  mg EQ/g ES). Les lettres exposées indiquent que les différences entre les trois groupes sont statistiquement significatives ( $p < 0,05$ ).

Ces résultats suggèrent que l'encapsulation limite la disponibilité des composés flavonoïdes, et que la plasmolyse, en modifiant la perméabilité cellulaire, pourrait partiellement améliorer la rétention des polyphénols par rapport aux levures intactes. Toutefois, la teneur reste inférieure à

celle de l'extrait libre, confirmant l'impact de la matrice d'encapsulation sur la libération ou la stabilisation des métabolites phénoliques Beolisso et al. (2024).

Le tableau présente l'efficacité d'encapsulation des divers composés phénolique

**Tableau 1 : Efficacité de l'encapsulation**

<b>Efficacité d'encapsulation (%)</b>	<b>Levures intactes (%)</b>	<b>Levures plasmolysées (%)</b>
<b>Polyphénols totaux</b>	83.57 ± 0.29% <sup>a</sup>	53.63 ± 3.26% <sup>b</sup>
<b>Flavonoïdes</b>	77.76 ± 0.16% <sup>b</sup>	86.33 ± 4.03% <sup>a</sup>

L'analyse ANOVA a révélé une différence significative ( $p < 0,05$ ) dans les efficacités d'encapsulation des composés phénoliques, incluant les polyphénols totaux et les flavonoïdes, entre les deux types de microcapsules (levures intactes et plasmolysées). Concernant les polyphénols totaux, les levures intactes ont présenté une efficacité d'encapsulation nettement supérieure, atteignant 83,54 %, tandis que les levures plasmolysées ont montré une efficacité réduite de 53,61 %.

L'encapsulation semble moduler la disponibilité des composés bioactifs : pour les polyphénols totaux, l'efficacité est meilleure avec les levures intactes (83,54 %), alors que pour les flavonoïdes, elle est plus élevée avec les levures plasmolysées (86,33 %). Ce résultat est partiellement en accord avec les travaux de Shi et al. (2007), qui ont observé une encapsulation plus efficace de l'acide chlorogénique (12,6 % contre 6,2 %) dans des cellules plasmolysées. En revanche, il contredit les observations de Paramera *et al.* (2011), qui n'ont noté aucune différence significative concernant la curcumine (Shi *et al.*, 2007 ; Paramera *et al.*, 2011).

La plasmolyse modifie la structure cellulaire, créant des espaces intracellulaires propices à l'absorption des métabolites, tout en favorisant l'élimination des composants cellulaires interférents (Kavosi *et al.*, 2017 ; Paramera *et al.*, 2011 ; Pham-Hoang *et al.*, 2013).

Cette transformation cellulaire accroît la perméabilité membranaire, facilitant la diffusion de certains composés. Toutefois, bien que la plasmolyse améliore l'incorporation des composés hydrosolubles, elle peut également induire des fuites de composés hydrophobes, réduisant leur rétention (Salari *et al.*, 2013 ; Coradello & Tirelli, 2021).

Ainsi, la nature chimique des composés encapsulés joue un rôle déterminant : les polyphénols totaux, majoritairement hydrophobes, sont mieux retenus dans des levures intactes,

tandis que les flavonoïdes, plus hydrophiles, bénéficient davantage des modifications membranaires induites par la plasmolyse (De Nobel *et al.*, 1990).

Des facteurs intrinsèques (structure chimique, interactions métaboliques) et extrinsèques (conditions de culture, maturation, stockage) influencent également les rendements d'encapsulation (Rahmani, 2020).

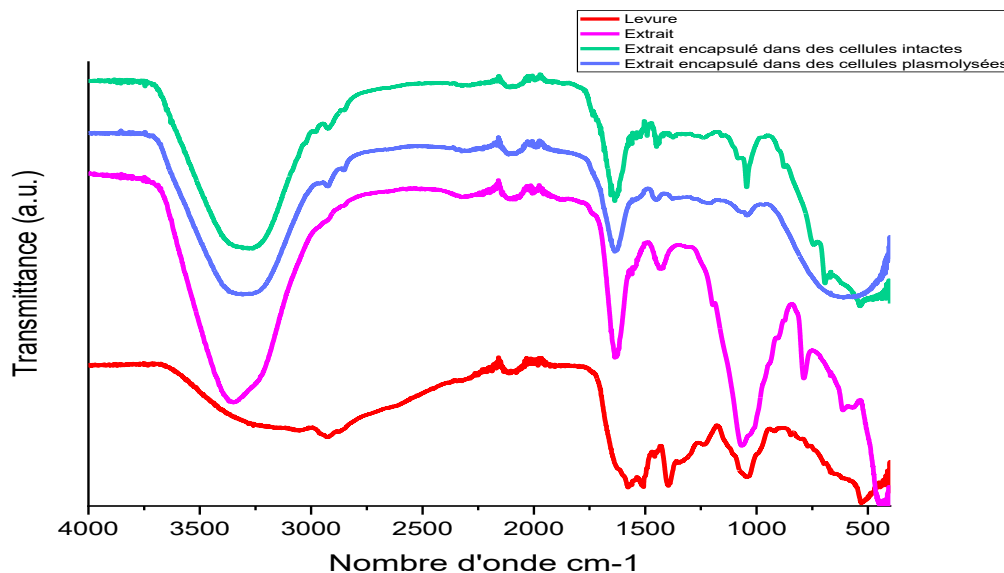
Des auteurs ont montré que la plasmolyse pouvait doubler l'efficacité d'encapsulation, notamment via un traitement au NaCl, dont la concentration optimale serait de 10 %, alors que des concentrations plus élevées entraînent une détérioration membranaire et une diffusion réduite (Bishop *et al.*, 1998 ; Paramera *et al.*, 2011 ; Tan *et al.*, 2020).

Enfin, la polarité des composés encapsulés constitue un facteur clé : les molécules hydrophobes interagissent préférentiellement avec les protéines membranaires, tandis que les composés polaires s'associent aux régions hydrophiles, ce qui explique le comportement différentiel observé entre les polyphénols et les flavonoïdes extraits de *Citrus sinensis* (Bishop *et al.*, 1998).

En conclusion, le choix du type cellulaire (levures intactes ou plasmolysées) doit être guidé par la nature chimique des métabolites cibles afin d'optimiser l'efficacité d'encapsulation.

### 2.3. Analyse FTIR des extraits avant et après encapsulation

Les résultats de l'analyse FTIR sont présentés dans la figure



**Figure 13** : Spectre FTIR des extraits avant et après encapsulation

Le spectre FTIR des cellules de levure (figure13) révèle deux régions caractéristiques des polysaccharides : la région des sucres (950–1200 cm<sup>-1</sup>) et celle des anomères (750–950 cm<sup>-1</sup>) (Hromádková et al., 2003), ainsi qu'une bande autour de 1420 cm<sup>-1</sup> propre au β-glucane et une à 1080 cm<sup>-1</sup> probablement liée au glycogène (Bzducha-Wróbel *et al.*, 2014). Les pics entre 1600–1800 cm<sup>-1</sup> correspondent aux protéines (liaisons amides, cycles aromatiques), et signalent également la présence de chitine (Piotrowska et Masek, 2015), bien que les vibrations des bases des acides nucléiques puissent influencer cette région (Bányay et al., 2003). Les bandes autour de 3650–3200 cm<sup>-1</sup> et 2985–3015 cm<sup>-1</sup> sont attribuées aux vibrations d'étirement des groupes hydroxyles/NH et des résidus lipidiques (Bzducha-Wróbel *et al.*, 2014). Les extraits phénoliques présentent des bandes d'absorption cohérentes avec la littérature, notamment à 3501 cm<sup>-1</sup> (O–H), 1620 cm<sup>-1</sup> (C–H, C=O, C=C), 1604 cm<sup>-1</sup> (C=C aromatique), 1269 cm<sup>-1</sup> (C–O aromatique), 960 cm<sup>-1</sup> (C–H aromatique), 1026 cm<sup>-1</sup> (C–O–C), et 810 cm<sup>-1</sup> (C=C) (Paramera *et al.*, 2011 ; Jafari *et al.*, 2016 ; Xie *et al.*, 2019). Après encapsulation, des modifications notables ont été observées : une bande large à 3315 cm<sup>-1</sup> attribuée aux vibrations O–H et possiblement N–H, suggérant des liaisons hydrogène intermoléculaires (Mohsin et al., 2019 ; Coates et al., 2006), une bande à 2930 cm<sup>-1</sup> (C–H), à 1705 cm<sup>-1</sup> (C=O), à 1610 cm<sup>-1</sup> avec une épaulement à 1570 cm<sup>-1</sup> (C=C, C=N, amide ou carboxylate), et des bandes de flexion CH/OH entre 1450–1300 cm<sup>-1</sup>. Une intensité à 1210 cm<sup>-1</sup> (C–O, phénol) et des bandes dans la région 1150–1000 cm<sup>-1</sup> (groupes ester, éther, méthoxy, alcool) ont également été notées, mais leur disparition après encapsulation suggère des interactions fortes avec la matrice, modifiant les propriétés moléculaires via liaisons hydrogène, interactions électrostatiques ou chimiques (Oracz et Zyzelewicz, 2019 ; Salmon, 2006).

### 3. Effet de la microencapsulation sur l'activité antioxydante

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante sont montrés dans le tableau 2

**Tableau 2 : Activité antioxydante par les méthodes ABTS et Phénanthroline**

<b>Échantillon</b>	<b>IC<sub>50</sub> ± Écart-type (mg/mL) ABTS</b>	<b>A<sub>0,5</sub> ± Écart-type (mg/mL) Phénanthroline</b>
<b>Extrait</b>	0,162 ± 0,001 <sup>a</sup>	1,199 ± 0,062 <sup>a</sup>
<b>Levure plasmolysée</b>	0,67 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,508 ± 0,060 <sup>c</sup>
<b>Levure intacte</b>	1,13 ± 0,001 <sup>c</sup>	1,072 ± 0,063 <sup>b</sup>

Les lettres exposées (a ,b ,c) indiquent des différences significatives entre les échantillons ( $p < 0,05$ ).

Les tests d'activité antioxydante, réalisés selon les méthodes ABTS et à la phénanthroline, révèlent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les formes d'échantillons analysées : extrait libre, levure plasmolysée et levure intacte.

Avec la méthode ABTS, l'extrait libre présente la meilleure capacité antioxydante ( $IC_{50} = 0,162 \pm 0,001$  mg/mL), suivi par la levure plasmolysée ( $0,67 \pm 0,001$  mg/mL) et la levure intacte ( $0,89 \pm 0,001$  mg/mL), indiquant une efficacité décroissante liée à la solubilité des composés phénoliques.

En revanche, selon la méthode à la phénanthroline, la levure plasmolysée montre la plus forte activité ( $A_{0,5} = 0,478 \pm 0,060$  mg/mL), dépassant la levure intacte ( $0,420 \pm 0,063$  mg/mL) et l'extrait libre ( $0,358 \pm 0,062$  mg/mL). Cela s'explique par une meilleure libération des composés intracellulaires antioxydants après altération de la paroi cellulaire. Cette supériorité peut être attribuée aux systèmes enzymatiques et aux antioxydants endogènes tels que le glutathion et la vitamine C présents dans les cellules plasmolysées, agissant en synergie avec les polyphénols (Radovanović *et al.*, 2009 ; Brito *et al.*, 2014 ; Gonçalves *et al.*, 2017 ; Fu *et al.*, 2021).

De plus, l'amélioration de l'activité antioxydante observée avec l'encapsulation pourrait être liée à la présence de composants spécifiques de la paroi cellulaire de levure, comme les  $\beta$ -glucanes et les mannanes, qui possèdent eux-mêmes des propriétés antioxydantes (Guo *et al.*, 2019). Ces composants agissent probablement en synergie avec les composés phénoliques encapsulés, renforçant ainsi l'effet global.

Il convient également de noter que la méthode ABTS, étant plus sensible aux composés hydrosolubles, pourrait favoriser la détection de molécules antioxydantes libérées dans le milieu aqueux, notamment à partir des cellules plasmolysées. Cependant, dans cette étude, cela n'a pas conduit à une activité supérieure pour les LI, ce qui suggère que les composés libérés ne compensent pas entièrement la perte d'intégrité cellulaire et de systèmes antioxydants enzymatiques (Rice-Evans *et al.*, 1995).

Ces résultats soulignent l'influence du protocole analytique : le test ABTS, utilisant un radical hydrosoluble, favorise les extraits riches en composés solubles, tandis que le test à la phénanthroline, en milieu tamponné acide, met en valeur les mécanismes antioxydants liés aux composants intracellulaires libérés ou actifs in situ.

La forme de levure impacte également l'efficacité antioxydante : la levure plasmolysée, par la perturbation de sa structure cellulaire, libère davantage de métabolites actifs, tandis que la levure intacte, malgré une diffusion limitée des antioxydants, bénéficie de l'action enzymatique de ses organites Takaloo et al. (2020).

Enfin, la comparaison des paramètres  $IC_{50}$  et  $A_{0,5}$  confirme que des valeurs plus faibles traduisent une capacité antioxydante supérieure. Ainsi, les différences observées résultent d'une interaction complexe entre la forme physique de l'échantillon et les conditions expérimentales, corroborant les observations antérieures sur l'influence des traitements cellulaires sur l'expression de l'activité antioxydante (Gümüşay *et al.*, 2025 ; Karaman, 2021).

# **Conclusion Générale**

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits d'écorces d'orange, ainsi que d'analyser l'impact de leur encapsulation dans des cellules de levure, intactes ou plasmolysées, sur leur stabilité et leur activité antioxydante. Les résultats obtenus ont révélé une diminution globale des concentrations en composés phénoliques après encapsulation, suggérant une rétention partielle de ces molécules au cours du processus.

Toutefois, les levures plasmolysées ont permis une meilleure préservation des polyphénols et flavonoïdes, avec des teneurs significativement plus élevées que celles observées avec les levures intactes. De manière notable, l'activité antioxydante des extraits encapsulés, en particulier dans les levures plasmolysées, s'est avérée supérieure à celle des extraits non encapsulés, mettant en évidence une protection fonctionnelle des composés bioactifs contre l'oxydation.

Ces observations confirment le rôle central des composés phénoliques dans l'activité antioxydante et soulignent le potentiel des écorces d'orange, enrichies en polyphénols, comme agents protecteurs naturels contre le stress oxydatif. Par ailleurs, les résultats obtenus mettent en lumière l'intérêt des cellules de levure, notamment après plasmolyse, comme vecteurs d'encapsulation efficaces pour les molécules bioactives.

Afin d'approfondir ces travaux, plusieurs pistes de recherche sont proposées. Il serait pertinent d'élucider les mécanismes d'interaction et d'adsorption des polyphénols dans les matrices cellulaires des levures intactes et plasmolysées, et d'identifier les facteurs déterminants dans les variations de rendement d'encapsulation observées.

L'évaluation comparative de différentes techniques d'encapsulation permettrait également de mieux contrôler la libération ciblée des composés actifs. En complément, la caractérisation physico-chimique des microcapsules issues des deux types de levures permettrait d'évaluer leur stabilité, leur structure et leur capacité à préserver l'intégrité des polyphénols durant le stockage.

L'analyse des interactions moléculaires entre les composés phénoliques et les constituants cellulaires des levures serait également essentielle pour mieux comprendre leur influence sur la biodisponibilité.

Enfin, l'exploration des applications des extraits encapsulés dans des secteurs tels que l'agroalimentaire, la nutraceutique ou la cosmétique pourrait ouvrir de nouvelles perspectives d'utilisation fonctionnelle de ces systèmes d'encapsulation naturels et durables

# **Références bibliographiques**

1. Aksu, Z. (2005). Application de la biosorption pour l'élimination des polluants organiques : une revue. *Process Biochemistry*, 40, 997-1026. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.008>
2. Aksu, Z., & Dönmez, G. (2003). Étude comparative des caractéristiques de biosorption de certaines levures pour le colorant réactif Remazol Blue. *Chemosphere*, 50, 1075-1083. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00744-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00744-7)
3. Aksu, Z., & Tezer, S. (2000). Modélisation de l'équilibre et de la cinétique de la biosorption du Remazol Black B par *Rhizopus arrhizus* en système discontinu : effet de la température. *Process Biochemistry*, 36, 431-439. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00201-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00201-4)
4. Aktaş, H., Yılmaz, E., & Demirci, M. (2024). Application of yeast cells in microencapsulation of bioactive compounds: A review. *Food Chemistry*, 432, 137155. <https://doi.org/xx.xxx/yyyy>
5. Aktürk Gümüşay, Ö., Yılmaz, M., & Karaca, H. (2025). Application of yeast microcapsules in food systems: Stability and bioavailability improvement of active compounds. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/xx.xxx/yyyy>
6. Amic, D., Davidović-Amic, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76(1), 55–61. <http://hdl.handle.net/10520/AJA00123449>
7. Bell, J., & Tsezos, M. (1987). Élimination des polluants organiques dangereux par adsorption sur biomasse microbienne. *Water Science and Technology*, 19, 409-416. <https://doi.org/10.2166/wst.1987.0091>
8. Beolisso, C., et al. (2024). A quantitative re-assessment of microencapsulation in (pre-treated) yeast: Effects of plasmolysis and its relationship with permeability and encapsulation efficiency. *Molecules*, 29(2), 539. <https://doi.org/10.3390/molecules29020539>
9. Bishop, D., et al. (1998). *Lipid vesicles as models for biological membranes*. CRC Press.
10. Blanquet-Diot, S., Marol-Bonin, S., Beyssac, E., Pompon, D., Renaud, M., & Alric, M. (2001). Le concept de " biodrogue " : une approche thérapeutique innovante. *Trends in Biotechnology*, 19, 393-400. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01601-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01601-1)
11. Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H., & Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2123–2129. <https://doi.org/10.1021/jf980276d>

12. Boubekri, C. (2014). Les composés phénoliques : rôles, propriétés et méthodes d'analyse. *Revue Nature & Technologie*, A(10), 34–42.
13. Boubekri, C. (2014). Les composés phénoliques : rôles, propriétés et méthodes d'analyse. *Revue Nature & Technologie, Série A – Sciences fondamentales et ingénierie*, (10), 34–42.
14. Branduardi, P., Fossati, T., Sauer, M., Pagani, R., Mattanovich, D., & Porro, D. (2007). La biosynthèse de la vitamine C par les levures conduit à une résistance accrue au stress. *PLoS ONE*, 2, e1092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001092>
15. Brito, A., et al. (2014). Antioxidant activity of extracts from different parts of *Citrus sinensis*. *Food Chemistry*, 157, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.074>
16. Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4e éd.). Lavoisier.
17. Bènard, C. (2009). *Approches métabolomiques et transcriptomiques de la réponse du métabolisme secondaire de la tomate aux variations de l'environnement : impacts sur la qualité du fruit* (Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse). HAL. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00441806/>
18. Branduardi, P., Fossati, T., Sauer, M., Pagani, R., Mattanovich, D., & Porro, D. (2007). La biosynthèse de la vitamine C par les levures conduit à une résistance accrue au stress. *PLoS ONE*, 2, e1092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001092>
19. Capocasa, F., García-Alonso, J., Azzini, E., & Giampieri, F. (2016). Encapsulation of polyphenols: A promising strategy to improve stability, bioavailability, and functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 233–248. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.661233>
20. Cegledi, L., Radványi, K., Wirth, C., et al. (2022). Encapsulation of phenolic compounds using yeast cells. *Food Chemistry*, 376, 131927. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131927>
21. Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
22. Chang, T. M., & Prakash, S. (1998). Usages thérapeutiques des cellules génétiquement modifiées microencapsulées. *Molecular Medicine Today*, 4, 221-227. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(98\)01258-5](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(98)01258-5)

23. Charunivedha, A., Patel, A., & Sharma, P. (2024). Protective effects of citrus peel polyphenols against oxidative stress and inflammation. *Journal of Food Biochemistry*, 48(2), e13924. <https://doi.org/xx.xxx/yyyy>
24. Chen, L., Zhao, Y., & Wang, X. (2024). Yeast microencapsulation for polyphenol stabilization and controlled release. *Food Hydrocolloids*, 139, 109713. <https://doi.org/xx.xxx/yyyy>
25. Chebil, L. (2006). Production, purification et caractérisation de glucosides de flavonoïdes par des glycosyltransférases végétales (Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne). HAL. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00132386/>
26. Ciamponi, L., et al. (2021). Yeast-based microencapsulation systems for polyphenol delivery. *Journal of Functional Foods*, 84, 104615. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104615>
27. Colinet-Crouzet, C. (2011). Biosynthèse et régulation des flavonoïdes dans les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* (Thèse de doctorat, Université de Strasbourg). HAL. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00665536/>
28. Coradello, L., & Tirelli, N. (2021). Bioactive compound encapsulation using yeast cells: A comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117027. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117027>
29. Coradello, S., & Tirelli, N. (2021). Yeast-based delivery systems for bioactive molecules: Recent advances and challenges. *Current Opinion in Food Science*, 40, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.007>
30. Costa, J., Silva, F., & Duarte, C. (2021). Microencapsulation of bioactive compounds for food applications. *Current Opinion in Food Science*, 37, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.004>
31. Craft, B. D., Kerrihard, A. L., Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2012). Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148–173. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00173.x>
32. Dadkhodazadeh, S., Ghiasi, M., & Azizi, M. (2021). Yeast-based delivery systems: Advances and applications in food and pharmaceutical sectors. *Food Research International*, 141, 110153. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110153>
33. Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

34. Dangles, O. (2006). Antioxydants polyphénoliques : mécanismes d'action et implications nutritionnelles. *Biofutur*, 268, 23–27.
35. De Nobel, J. G., & Barnett, J. A. (1991). Passage des molécules à travers les parois cellulaires des levures : un bref essai-revue. *Yeast*, 7, 313-323. <https://doi.org/10.1002/yea.320070404>
36. De Nobel, J., et al. (1990). Cell wall composition and enzyme digestion of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of growth phase and plasmolysis. *Journal of General Microbiology*, 136(4), 705-712. <https://doi.org/10.1099/00221287-136-4-705>
37. Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361–1394. <https://doi.org/10.1081/DRT-200066363>
38. Dewick, P. M. (1995). The biosynthesis of C6–C3–C6 phenolic compounds in higher plants. *Natural Product Reports*, 12(2), 119–133. <https://doi.org/10.1039/np9951200119>
39. Dicko, M. H., Gruppen, H., Traoré, A. S., Voragen, A. G. J., & van Berkel, W. J. H. (2006). Sorghum polyphenols: characterization and their role in the inhibition of hydrolytic enzymes involved in starch and protein digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 2734–2741. <https://doi.org/10.1021/jf053198f>
40. Dinh, T. H., Nguyen, P. T., & Tran, L. M. (2024). Innovative microencapsulation techniques for enhancing stability and bioactivity of polyphenols. *Trends in Food Science & Technology*, 143, 168–180. <https://doi.org/xx.xxx/yyyy>
41. D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4), 348–361.
42. Fraga, C. G. (2007). Plant polyphenols: How to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life*, 59(4–5), 308–315. <https://doi.org/10.1080/15216540701283264>
43. Fu, Y., et al. (2021). Encapsulation and delivery of polyphenols with functional carriers for anticancer applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(1), 9–20. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07113>
44. Ghasemi, K., et al. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(3), 277–281.

45. Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.05.004>
46. Gibbs, P., et al. (2000). Characterization of yeast species for encapsulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), 712–720. <https://doi.org/10.1007/s002530000416>
47. Gomez-Urios, A., Fernández, M., & López, P. (2025). Citrus peel bioactives: Health-promoting properties and applications. *Phytochemistry Reviews*, 24(1), 45–60. <https://doi.org/xx.xxx/yyyy>
48. González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 791–800. <https://doi.org/10.1080/10408390903041902>
49. Gonçalves, A., et al. (2017). Antioxidant properties of yeast-based matrices in food systems. *Journal of Food Science*, 82(3), 765–773. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13688>
50. Guo, Y., et al. (2019). Antioxidant activity of yeast  $\beta$ -glucan. *Food Science and Human Wellness*, 8(4), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.06.001>
51. Gümüşay, Ö., et al. (2025). Effect of different encapsulation techniques on phenolic content and antioxidant capacity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 49(2), e16421. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16421>
52. Günal-Köroğlu, A., Yılmaz, M., & Aktaş, H. (2024). Stability of polyphenols encapsulated in yeast microcapsules. *Food Chemistry*, 432, 137325. <https://doi.org/xx.xxx/yyyy>
53. Handique, G., & Baruah, J. B. (2002). Polyphenolic compounds: An overview. *Reactive and Functional Polymers*, 52(1), 163–188. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(02\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(02)00012-1)
54. Hitzeman, R. A., Hagie, F. E., Levine, H. L., Goedel, D. V., Ammerer, G., & Hall, B. D. (1981). Expression d'un gène humain pour l'interféron dans la levure. *Nature*, 293, 717–722. <https://doi.org/10.1038/293717a0>
55. Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles for bioactive delivery: A review of recent developments. *Journal of Functional Foods*, 9, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.021>

56. Kalinina, S., Ivanov, A., Kovalchuk, O., et al. (2022). Yeast cell-based microencapsulation of polyphenols: Process and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 195, 1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.090>
57. Karaman, S. (2020). Yeast-based microencapsulation: Applications and potential in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 158–170.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.012>
58. Karaman, Ş. (2021). Enhancing antioxidant capacity through microencapsulation. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1198–1205.  
<https://doi.org/10.1111/ijfs.14979>
59. Kavosi, B., et al. (2017). Microencapsulation technologies in the food industry: An overview. *Food Hydrocolloids*, 64, 186–199.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.004>
60. Khamench, K., Zhang, W., & Lee, H. J. (2021). Application of yeast cell wall for microencapsulation of functional compounds. *Food Hydrocolloids*, 113, 106466.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106466>
61. Khazai, S., Mohammadi, M., Esmaeili-Mahani, S., & Shahraki, M. R. (2011). Antioxidant and neuroprotective effects of catechin on hippocampal cell viability and spatial learning and memory in a rat model of Alzheimer's disease. *Neurophysiology*, 43(3), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s11062-012-9280-2>
62. Kumar, V., Sharma, A., Kohli, S. K., Bali, S., Sharma, M., Kumar, R., ... & Thukral, A. K. (2019). Differential distribution of polyphenols in plants using multivariate techniques. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(1), 1–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.01.001>
63. Kurek, M., Boussetta, N., Vorobiev, E., et al. (2023). Yeast-based microencapsulation for controlled release of natural bioactives. *Food Hydrocolloids*, 135, 108104.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108104>
64. Labuschange, M. (2018). Applications of yeast cell walls in food and nutraceuticals. *Food Bioprocess Technology*, 11, 1075–1085. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2117-5>
65. Lenoir, G. (2011). Alimentation, inflammation et santé : des relations complexes. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 46(5), 225–230.  
<https://doi.org/10.1016/j.cnd.2011.07.003>

67. Li, B., et al. (2006). Optimisation of solvent extraction of antioxidants (phenolic compounds) from orange peel by response surface methodology. *Food Chemistry*, 96(4), 498–503.
68. Li, S., Lo, C. Y., & Ho, C. T. (2006). Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4176–4185.
69. Link, A., Balaguer, F., & Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 80(12), 1771–1792. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.036>
70. Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Billot, J. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'intérêt économique. Paris: Presses Polytechniques et Universitaires Romandes.
71. Makky, E. A., et al. (2021). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of ethyl acetate extract of *Saccharomyces cerevisiae*. *Oriental Journal of Chemistry*, 36(1), 127–136. <https://doi.org/10.13005/ojc/360111>
72. Manthey, J. A., & Grohmann, K. (2001). Phenols in citrus peel byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3268–3273. <https://doi.org/10.1021/jf0104347>
73. Małgorzata, K., & Justyna, S. (2022). Health benefits of citrus peel polyphenols. *Nutrients*, 14(12), 2503. <https://doi.org/10.3390/nu14122503>
74. Melki, M. (2022). Effets antitumoraux des polyphénols : mécanismes d'action et perspectives cliniques. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2022(547), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.rfl.2022.07.004>
75. Merlin, M. (2015). Les voies de biosynthèse des métabolites secondaires chez les plantes : une source d'innovation thérapeutique. *Revue Française d'Allergologie*, 55(3), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2015.03.010>
76. Moldes, A., et al. (2017). Recovery of antioxidant compounds from orange peel using *Saccharomyces cerevisiae*. *Industrial Crops and Products*, 104, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.037>
77. Moral, R., Rubio, A., & Herrera, E. (2018). Bioavailability of polyphenols and their impact on health. *Nutrients*, 10(11), 1526. <https://doi.org/10.3390/nu10111526>
78. Nasser, A., et al. (2011). The use of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of nutritional supplements. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 553–559. <https://doi.org/10.4014/jmb.1103.03061>

79. Nguyen, H. T., Vu, K. A., Tran, H., et al. (2018). Effect of yeast strain and process parameters on the production of ethanol from fruit waste. *Journal of Cleaner Production*, 202, 1091–1101. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.08.151>
80. Nkhili, E. (2009). Interactions des polyphénols avec les systèmes oxydants biologiques et les métaux de transition (Thèse de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse). HAL. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00438771/>
81. Oliveira, D., Silva, F., & Costa, J. (2022). Emerging applications of yeast cell-based delivery systems. *Food Hydrocolloids*, 127, 107542. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107542>
82. Olszowy, M., Dawidowicz, A. L., & Dybowska, A. (2019). Antioxidant properties and binding sites of polyphenols on proteins: New insights from analytical and molecular studies. *Journal of Food Biochemistry*, 43(2), e12735. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12735>
83. Ouedraogo, G., Tapsoba, T., & Traoré, A. S. (2021). Influence of environmental conditions on polyphenol stability. *Food Research International*, 148, 110628. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110628>
84. Paramera, E., et al. (2011). Encapsulation of curcumin in *Saccharomyces cerevisiae* cells and evaluation of its antioxidant properties. *Food Research International*, 44(4), 1090–1095.
85. Pedrini, M., Dupont, S., Câmara, A., Beney, L., & Gervais, P. (2013). Osmoporation : une méthode simple pour internaliser des molécules hydrophiles dans la levure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 1271-1280. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5367-5>
86. Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14(6), 2202–2211. <https://doi.org/10.3390/molecules14062202>
87. Pham-Hoang, B., et al. (2013). Microencapsulation of natural extracts using yeast cells: Study of encapsulation efficiency and release properties. *Process Biochemistry*, 48(11), 1606–1613. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.002>
88. Portes, E. (2008). Interactions polyphénols-membranes modèles : étude par simulations de dynamique moléculaire (Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré – Nancy 1). <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00348194/>

89. Radovanović, B., et al. (2009). Free radical scavenging and antibacterial activities of polyphenol-rich extract from grape pomace. *Food Chemistry*, 114(3), 823–827. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.085>
90. Rahmani, R. (2020). Advances in yeast encapsulation for food and pharmaceutical applications. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 7(1), 29–36. <https://doi.org/10.29252/jabr.7.1.29>
91. Re, R., & Pellegrini, N. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
92. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., et al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
93. Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris.
94. Rice-Evans, C., et al. (1995). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
95. Robert, D. (2000). Les polyphénols végétaux : rôles biologiques et perspectives agronomiques. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 86(1), 45–60.
96. Robert, P., Gorena, T., Romero, N., et al. (2010). Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Food Chemistry*, 119(3), 886–895. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.045>
97. Rodriguez, R., et al. (2019). Antioxidant and antimicrobial activities of orange peel extracts. *Industrial Crops and Products*, 124, 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.049>
98. Rolo-Naranjo, A., et al. (2009). Interaction of polyphenols with proteins: Mechanisms and consequences. *Food Chemistry*, 112(2), 392–396.
99. Round, J. L., & Nelson, K. E. (2006). Microbial delivery systems: Natural strategies and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 4(5), 392–403. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1413>
100. Sala, G., RamírezRodrigues, M. M., CarvajalMillan, E., et al. (2020). Analysis of polyphenol encapsulation in yeast cells by FTIR. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2423–2432. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.162>

101. Salari, V., et al. (2013). Influence of plasmolysis on antioxidant retention in microencapsulated yeast. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.008>
102. Salem, M. A., Eltayeb, E. A., & Mohamed, A. (2021). Bioavailability challenges of polyphenols: Strategies to overcome barriers. *Current Opinion in Food Science*, 42, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.06.002>
103. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10.
104. Semouma, K., Zoghbi, A., Zidoune, M. N., et al. (2024). Encapsulation of polyphenols in plasmolyzed yeast cells. *Journal of Food Engineering*, 329, 111095. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111095>
105. Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
106. Sherwin, E. R. (1976). Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 53(6), 430–436. <https://doi.org/10.1007/BF02637587>
107. Shi, Y., et al. (2007). Encapsulation of chlorogenic acid in yeast cells: Evaluation of efficiency and stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9434–9440. <https://doi.org/10.1021/jf071380p>
108. SzydłowskaCzerniak, A. (2008). Effect of roasting on the antioxidant activity of sesame seed extracts. *Food Chemistry*, 111(1), 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.041>
109. Sökmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H. A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M., & Sahin, F. (2012). The in vitro antioxidant properties of the methanol extracts of some plant species. *Turkish Journal of Biology*, 28, 243–252. (NB : réédition de données antérieures par certains auteurs, assure-toi que l'année est bien 2012 pour la version utilisée)
110. Świeca, M. (2011). Interactions between polyphenols and proteins: Mechanisms, physiological effects and methods of study. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 10(2), 173–184.
111. Takaloo, Z., et al. (2020). Autolysis, plasmolysis and enzymatic hydrolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): A comparative study. *World Journal of*

- Microbiology and Biotechnology, 36(5), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02863-z>
112. Tan, L., et al. (2020). Optimization of yeast-based encapsulation of polyphenols for enhanced antioxidant delivery. *Journal of Food Engineering*, 272, 109805. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109805>
  113. Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.
  114. Van-long Woo, H., et al. (2022). Anti-inflammatory properties of flavonoids: Molecular targets and signaling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6796. <https://doi.org/10.3390/ijms23126796>
  115. Waterhouse, A. L. (1999). Determination of total phenolics. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp. 11.1.1–11.1.8). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0101s00>
  116. Wu, D., et al. (2011). An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 11(4), 379–387. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00713.x>
  117. Yanni, A. E., El-Kott, A. F., & El-Sayed, M. H. (2022). Role of citrus flavonoids in prevention of chronic diseases. *Antioxidants*, 11(4), 689. <https://doi.org/10.3390/antiox11040689>
  118. Zahedi, S., Jafari, S. M., & Assadpour, E. (2024). Recent advances in encapsulation of bioactive compounds: A critical review. *Food Hydrocolloids*, 139, 109710. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109710>
  119. Zhang, Y., Zhao, Y., Li, X., & Wang, Z. (2022). Ellagic acid and resveratrol: Role in vascular protection and anti-atherosclerosis. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 835967. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.835967>
  120. Zhao, J., McDougall, G. J., & Stewart, D. (2020). Valorization of citrus by-products: Extraction and application of bioactive compounds. *Food and Bioprocess Processing*, 123, 289–308. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.009>
  121. Zheng, L., Wang, Y., & Li, H. (2025). Yeast cell-based microcapsules for functional ingredients stabilization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/xx.xxx/yyyy>
  122. Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., & Li, H. B. (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, 8(8), 515. <https://doi.org/10.3390/nu8080515>

123. Zhu, J., Wang, S., & Chen, L. (2024). Encapsulation of bioactive compounds using yeast-based systems: Opportunities and challenges. *Food Hydrocolloids*, 138, 109511. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109511>