

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Abou Bekr Belkaid
Tlemcen Algérie



جامعة أبي بكر بلقايد

Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de master

Option

Alimentation et Nutrition

Thème

**Mesure de la vitamine C et de l'activité anti-radicalaires et anti
anti-oxydante des citro-flavonoïdes du jus de citron**

Présenté par : **BOUDALIA SOUAD ep BENAMMAR**

Soutenu le : 4 juillet 2017 devant le jury composé de :

Présidente : **MOKHTARI SOULIMANE NASSIMA** Professeur, Université de Tlemcen.

Examineur : **BENAMMAR CHAHID** Maître de conférences, Université de Tlemcen.

Promotrice : **BEKHTI SARI FADIA** Maître de conférences, Université de Tlemcen.

Année universitaire 2016-2017

REMERCIEMENTS

- Je remercie tout d'abord le bon **DIEU**, le tout puissant, de m'avoir donnée la force et la volonté de mieux mener ce travail.
- je tiens, à adresser mes sincères remerciements à **Madame Bekhti-Sari Fadia Maitre de conférences au département de Biologie**, qui a accepté de m'encadrer, en me soutenant tout le long de l'élaboration du mémoire. je la remercie également pour son soutien moral et sa disponibilité.
- Mes remerciements s'adressent également à **Madame Mokhatri Nassima, Professeur au département de Biologie** qui a bien voulu présider le jury de mon mémoire.
- J'exprime mon estime et mes vifs remerciements à **Monsieur Benammar Chahid, Maitre de conférences au département de Biologie et Chef de Département de Biologie, faculté SNV-STU** d'avoir accepté l'examination de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A la mémoire de ma très chère maman ,a mon cher papa,

Pour leurs encouragements, leur présence et leur soutien sans faille et leur aide tout au long de mon cursus. Je ne vous remercierai jamais assez.

A mon frère et mes sœurs,

Pour toutes nos chamailleries passées mais surtout pour l'amour de ce même sang qui coule dans nos veines.

A mon mari,

A toi qui prends si bien soin de moi et d'être toujours présent pour moi et pour tout l'amour que tu me donnes.

A ma belle mère, mon beau père et ma belle sœur.

A mes amies

Rabia,Zoulikha,Amel .

A tous les autres, que je n'ai pas cités mais qui comptent beaucoup pour moi.

Souad

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

ETAT ACTUEL DE SUJET

Chapitre I : Citron

I.	Historique	2
II.	Classification botanique	2
III.	Culture de citron	2
IV.	Caractéristiques physico-chimiques de citron	3
V.	Valeur nutritionnelle du citron	3
	V.1 L'apport calorique et répartition des macronutriments	3
	V.2 Vitamines	4
	V.3 Minéraux et oligoéléments	5
	V.4 Poly phénols	5
VI.	Les variétés courantes	6
VII.	Les bienfaits du citron	6

Chapitre II : Stress oxydatif

I.	Définition du stress oxydatif	8
II.	Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	8

II. Les molécules du stress oxydatif	9
III. Les situations du stress oxydant	9
IV. Les systèmes antioxydants	9
1. Définition.....	9
2. Systèmes antioxydants endogènes	10
3. Systèmes antioxydants exogènes	10-11
IV. Méthodes de dosage de l'activité anti-oxydante et anti-radicalaire	12

Chapitre III

Les poly phénols et vitamine C

I. Introduction	14
1. Poly phénols	14
1.1. Présentation générale sur les poly-phénols.....	14
1.2. Classification des poly-phénols	14
1.3. Rôle des poly-phénols dans les plantes	16
1.4. Les poly phénols comme antioxydants.....	16
2. la vitamine C	17
2.1 Définition.....	17
2.2 structure de l'acide ascorbique.....	17
2.3 Sources de la vitamine C	17
2.4 Les rôles physiologiques et avantages de l'acide ascorbique	17

MATERIEL ET METHODES

I. Caractéristiques du citron étudié	18
II. Préparation des échantillons	18
II.1 jus.....	18
III. Dosage de poly phénols	18
III.1 Principe.....	18
III.2 Mode opératoire	18

IV.	Dosage indirect de la vitamine C	19
	IV.1 Principe du dosage	19
	IV.2 Mode opératoire.....	19
V.	Test d'hémolyse.....	19
	V.1 Principe	19
	V.2 Mode opératoire.....	20
	V.3 Taux d'hémolyse	20
	V.4 Hémolyse total.....	20
VI.	Mesure des marqueurs de stress oxydatif	20
	VI.1 Dosage du glutathion réduit GSH	20
	VI.1.1 Principe	20
	VI.2 Dosage de MDA.....	21
	VI.2.2 Analyse statistique	21

RESULTATS ET INTERPRETATION

I.	Taux des polyphénols	24
II.	Taux de la vitamine C	24
III.	Taux d'hémolyse.....	24
	III.1 Taux d'hémolyse en présence de jus de citron	24
IV.	Statut oxydant/antioxydant	24
	IV. 1 Teneurs érythrocytaires en GSH en présence de jus de citron	24
	IV. 2 Teneurs érythrocytaires en MDA en présence de jus de citron.....	24

DISCUSSION 27-29

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 30

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des abréviations

AA : l'Acide Ascorbique
ADN : acide désoxiribonucléique
AGPI : acide gras polyinsaturée
DPPH: 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle)
DO: densité optique
DTNB: 5,5'-dithiobis (2-acide nitrobenzoïque)
EC₅₀ (IC₅₀) : concentration inhibitrice à 50 %
EDTA : Acide éthylènediamine tétra-acétique
ERO: espèce réactive oxygénée
GPx: glutathione peroxydase
GSH: glutathionréduit
GSSG: glutathione oxydé
H₂O₂:peroxyde d'hydrogène
HO°: radical hydroxyle
I₂ : diiode
KPO₄ : tampon
MDA :malondialdéhyde
Na₂S₂O₃: Thiosulfate de sodium
Na₂SO₃: carbonate de sodium
NO°: monoxyde d'azote
O₂°-: anion superoxyde
OH : groupe hydroxyle
PBS: Phosphate buffer saline.
RL: radical libre
ROS: espèces réactives de l'oxygène
S₂O₃⁻ : ion thiosulfate
SOD: superoxydedismutase.
TBA: acide thiobarbiturique
TBHP: *tert*-butylehydroperoxyde
TNB: acide thionitrobenzoïque

Liste des tableaux

Tableau 1 : composition pour 100gr net de citron.....	2-3
Tableau 2 : composition de vitamines pour 100gr net de citron.....	3
Tableau 3 : composition de minéraux et oligo- éléments pour 100gr de citron net	4
Tableau 4 : Composition de polyphénols pour 100gr de citron net.....	4
Tableau 5 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.....	11
Tableau 6 : description de quelques tests antioxydants in vitro chimiques.....	12
Tableau 7 : Description de quelques tests in vitro biologique.	12

Liste des figures

Figure 1 : Origine des espèces réactives de l'oxygène.....	7
Figure 2 : Production et élimination d'espèces réactives de l'oxygène soit: l'anion superoxyde (O_2^-) le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl ($HO\bullet$).....	9
Figure 3 : Structure de base de flavonoïdes	14
Figure 4 : Structure des lignanes	14
Figure 5 : Structure de base de tanins hydrolysables.....	15
Figure 6 : Structure de base de tanins condensés	15

Plus personne ne conteste aujourd'hui l'impact positif de la consommation de fruits et légumes sur la santé. Consommés en quantité suffisante, ils participent à la prévention des principales pathologies qui affectent nos sociétés occidentales : cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou obésité, tant et si bien qu'un encouragement à la consommation de fruits et légumes constitue désormais une des principales recommandations formulées par les autorités de santé publique (**Scalbert, 2004**).

Les multiples atouts santé des fruits et légumes sont liés à leur faible teneur calorique, à leur richesse en fibres, minéraux, vitamines et autres micronutriments. Certains de ces micronutriments, sont essentiels au fonctionnement en participant à la protection de notre organisme. C'est le cas des antioxydants dont les fruits et légumes constituent l'une des principales sources alimentaires. Les principaux antioxydants végétaux sont au nombre de quatre : la vitamine C ou acide L-ascorbique et la vitamine E, les caroténoïdes et les poly phénols. Ces puissants antioxydants sont capables de piéger les radicaux libres, générés par notre organisme en permanence ou formés en réponse à des agressions extérieures (pollutions diverses, infections). Ces molécules renforcent nos défenses naturelles contre le stress oxydatif en protégeant les constituants tissulaires (**Marcoux, 2001 ; Hollman, 2005**).

Ils peuvent également agir comme chélateurs d'ions pro-oxydants, comme le TBHP, et inhiber la production des radicaux libres (**Macroux, 2001**).

Le citron constitue une source d'antioxydant comme l'a précisé le pharmacien **Thomas Kassab (2017)** qui grâce à sa richesse en antioxydants et en vitamine C, booste le système immunitaire. C'est aussi un excellent antiseptique, antibiotique et antiviral. Selon **Jagetia et ses collaborateurs (2003)** le citron ainsi que tous les agrumes contiennent une source de polyphénols qui sont des pigments neutralisant des radicaux libres. Et des antioxydants améliorant l'absorption de la vitamine C.

Chaque seconde, ce sont plus de 450 kilos de citrons et limes qui sont produits dans le monde. Cela représente une récolte mondiale annuelle de 14,3 millions de tonnes de citrons et limes avec l'Inde, le Mexique et l'Argentine comme premiers producteurs (**Baudin, 1980**). Selon l'ONS (l'office national des statistiques), le verger agrumicole algérien couvre 63 000 ha. La production (oranges principalement, mandarines, clémentines, citrons) a été de 1,1 millions de tonnes en 2010/2011.

C'est dans ce contexte que notre travail a pris naissance. Notre étude a porté sur la valorisation du jus de citron par la mise en évidence de son effet anti-oxydant in vitro par plusieurs méthodes : le dosage de poly-phénols, le dosage de la vitamine C, par le test d'hémolyse, dosage de paramètres de stress (MDA, GSH).

Chapitre I : Citron

I. Historique

Le citronnier est vraisemblablement originaire d'Asie, et plus précisément du Cachemire, région aux confins de la Chine et de l'Inde. Arrivé au Moyen-Orient par la Perse, il s'acclimate en Mésopotamie. Les Hébreux apprennent alors à le cultiver, sans doute durant la captivité de Babylone. Les Grecs anciens ne semblent pas l'avoir intégré à leur alimentation, même s'il joue un rôle dans les festivités accompagnant les noces. D'après **Tolkowsky (1966)** le citron (*Citrus limon*) aurait été connu en Italie au II^{ème} siècle. Ce qui est plus sûr, c'est que les Arabes ont largement contribué à le répandre en Méditerranée jusqu'en Afrique du Nord et en Espagne. C'est à la fin du XV^e siècle que les Espagnols et les Portugais implantent le citronnier en Floride, où il prospère toujours ! C'est en tout cas dans la Méditerranée que le citronnier a acquis son statut actuel.

II. Classification botanique

- Nom scientifique : *Citrus aurantiifolia*, *Citrus latifolia*, *Citrus limettioides*, *Citrus limetta*
 - Famille : *Rutaceae*
 - Ordre : *Sapindales*
 - Classe : *Magnoliopsida*
 - Sous-classe : *Rosidae*
 - Division : *Magnoliophyta*
- Description

Le citronnier est un petit arbre à feuilles persistantes et brillantes (**Tomer, 2010**).

Le citronnier (*Citrus limon L. Burns pp.*) appartient à la famille des *Rutacea* (**Bourgou, 2012**).

Les principaux cultivars sont Femminello Santa Teresa, Monachello et Femminello Continella (**Settanni et al, 2014**).

III. Culture du citron

Le citronnier fleurit plusieurs fois dans l'année : on dit qu'il est remontant. Un même citronnier peut donc fournir des fruits en toute saison.

Cependant, chaque vague de fructification n'a pas la même intensité. Par exemple, sous le climat méditerranéen, les citronniers peuvent fleurir quatre fois dans une même année :

- en Mars (récolte en octobre) ;
- de fin Mars à début juin (floraison à l'origine de la plus grosse récolte, de novembre à fin mai) ;

- fin Juin (petite floraison à l'origine de citrons qui atteindront leur maturité un an plus tard) ;
- en Août-Septembre (à l'origine de fruits récoltés l'été suivant ; ces fruits étant légèrement verts).

Le citronnier est sensible au froid. Mais il s'adapte particulièrement bien aux climats subtropicaux, à la fois secs et doux. C'est pourquoi l'essentiel de la production mondiale est localisé dans ces zones : bassin méditerranéen, côte californienne et zones semi-tropicales de Piémont (Himalaya, Andes). Sous ces climats, le caractère remontant des citronniers peut s'exprimer et permet une production étalée sur une grande partie de l'année.

Si l'Argentine est un grand exportateur de citrons, l'Espagne et l'Italie sont actuellement des acteurs incontournables de cette production.

IV. Caractéristiques physico-chimiques du citron

Le citron occupe une place de choix dans nos cuisines. On l'aime pour sa chair juteuse, sa saveur qui oscille entre acide et amère, et sa belle couleur jaune doré. Fruit tonique, riche en vitamine C, le citron est aussi source de bienfaits pour l'organisme. Il possède un arôme caractéristique qui dynamise plats et cocktails (**Revue Weleda, 2010**). Le citron est de forme oblongue ou ovoïde, jaune vif avec une écorce épaisse (**Tomer, 2010**). Sa chair est acide et de couleur jaune pâle. Ce goût acide est dû à la présence d'acide citrique (**Tomer, 2010**). En effet, selon la **table de Ciquial (2013)** le citron a une forte concentration en acides organiques (4,88 g pour 100 g) dont l'acide citrique fait partie.

V. Valeur nutritionnelle du citron :

V.1 L'apport calorique et répartition des macronutriments:

L'apport énergétique du citron est en moyenne de **34,30 Kcal pour 100 g soit 146 KJ**. Un citron pèse en moyenne **120 g**, il apporte donc **41,16 kcal**. Le citron est majoritairement composé d'eau (89,20 %). Il contient peu de protéines (0,80 %) et de lipides (0,30 %). Les glucides sont présents avec un pourcentage de 2,45 % et les fibres représentent 2,00 % du citron (**Ciquial, 2013**).

Tableau 1 : Composition en macronutriments pour 100gr net de citron (**Ciquial, 2013**).

Composants	Quantités
Eau	89,2g

Protéines	0,8g
Lipides	0,3g
Acides gras saturés	0,0871g
Glucides	2,45g
Sucres	2 ,2g
fibres	2g
Acides organiques	4,88g

V.2 Vitamines

Les vitamines sont des éléments indispensables à notre vie. C'est d'ailleurs de là que leur vient leur nom, « vita » signifie vie en latin.

Les 13 vitamines actuellement connues jouent des rôles clefs dans le fonctionnement du corps : réactions enzymatiques, rôle hormonal, assimilation des aliments ou encore action anti-oxydant (Kava, 2000).

Il existe deux types de vitamines, hydrosolubles ou liposolubles, qui définissent leur mode de stockage dans l'organisme.

Le citron est riche en vitamine C, les autres vitamines hydrosolubles sont présentes en quantité moindre.

Tableau 2 :Composition en vitamines pour 100gr net de citron (Ciquel, 2013)

Vitamines	Quantités
Provitamine A Béta-carotène	3 µg
Equivalent vitamine A	0 ,5 µg
Vitamine B1	0,05 µg
Vitamine B2	0,02 mg
Vitamine B3	0,2 mg
Vitamine B5	0,19 mg
Vitamine B6	0,08 mg
Vitamine B9	11 µg
Vitamine C	53 mg
Vitamine E	0,8 mg

V.3 Minéraux et oligo- éléments

Les oligo-éléments font partie des micronutriments, avec les vitamines et les minéraux .Ils sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme .Ils sont apportés par l'alimentation en quantité faible de l'ordre de mg /j voire infime de l'ordre du $\mu\text{g/j}$ (**Constans, 1998**). Leur absence comme leur excès peuvent être responsables de désordres important (**Chappuis, 1991**).

Le citron contient de nombreux minéraux en faibles quantités. A l'exception du potassium qui représente 149 mg dans 100 gr du citron. Les autres minéraux et oligo-éléments sont en quantité inférieure.

Tableau 3 : Composition de minéraux et d'oligo- éléments pour 100gr de citron net (**Ciquel ,2013**)

Minéraux et oligo-éléments	quantités
Calcium	18 mg
Cuivre	0,0335 mg
Fer	0,4 mg
Iode	0,93 μg
Magnésium	8,93 mg
Manganèse	0,0154 mg
Phosphore	15,5 mg
Potassium	149 mg
sélénium	4,9 μg
Sodium	3 mg
zinc	0,1 mg

V.4 Les poly-phénols

Les poly-phénols, tels que les lignanes, les tannins ou les flavonoïdes, représentent une large classe de composés naturels accessibles à partir d'extraits de bois ou végétaux. Ces molécules sont principalement connus comme anti-oxydants (**Van et al. 2000**).

Tableau 4 : Composition de poly-phénols pour 100g de citron net (**Ciquel, 2013**)

Poly-phénols	Quantités
Flavonoïdes	36,89 mg
Lignanes	0,02 mg
Poly-phénols totaux	36,91 mg

VI. Variétés courantes

Les variétés de citronnier les plus exploitées sont sélectionnées selon un ou plusieurs de ces trois critères :

- le rendement en fruits.
- la qualité du jus de citron.
- et la résistance de l'arbre aux principales maladies parasitaires.

Les cinq principales variétés de *Citrus limon* (L.) sont : Euréka, Lisbon, Femminello, Monachello et Verna.

Il existe quelques variétés de moindre importance comme les citrons Villafranca, Royal Messine, Napoléon ou Olivia.

VII. Les bienfaits du citron

Le citron est nommé le roi des fruits. Il présente de nombreux bienfaits pour la santé. C'est une plante médicinale puissante dont les très nombreuses vertus sont utilisées depuis plus de 3000 ans. Il stimule les défenses naturelles, favorise la digestion, combat la grippe, les angines, les maux de tête, ainsi qu'un grand nombre de maladies.

De nombreuses études indiquent que la consommation d'agrumes, dont le citron et la lime, exerce un effet favorable contre le cancer.

• **Cancer (prévention)** : Plusieurs études ont démontré que la consommation d'agrumes serait reliée à la prévention de certains types de cancers (**Chainani, 2002**), comme le cancer de l'œsophage, le cancer de l'estomac, le cancer du côlon, de la bouche et du pharynx. Selon l'une de ces études **Foschi et al (2010)**, ont démontré qu'une consommation modérée d'agrumes (soit de 1 à 4 portions par semaine) permettrait de réduire les risques de cancers touchant le tube digestif et la partie supérieure du système respiratoire. En ce qui concerne le cancer du pancréas ou de la prostate, les études demeurent controversées (**Guyatt et al., 2009**).

Cancer (ralentir la progression) : Les flavonoïdes, des composés antioxydants contenus dans les agrumes, ont démontré qu'ils pouvaient ralentir la prolifération de plusieurs lignées de cellules cancéreuses (**Poulose et al., 2005**) et diminuer la croissance des métastases. Ces propriétés pourraient servir à l'élaboration de thérapies anti-tumorales (**Ogata et al., 2000**).

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

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

- **Inflammation** : Plusieurs études ont démontré que les flavonoïdes des agrumes avaient des propriétés anti-inflammatoires (**Castillo, 2008**).

- **Hypercholestérolémie** : Les flavonoïdes et les limonoïdes des agrumes et de leurs jus pourraient avoir un potentiel de réduction de l'hypercholestérolémie. Des études réalisées chez l'animal ont démontré que certains d'entre eux abaissaient le cholestérol sanguin. Les flavonoïdes et les limonoïdes du citron ainsi que sa teneur en fibres solubles comme la pectine, permettent également de réguler le taux de cholestérol dans le sang (**Kawaguchi et al., 1997**).

- **Autres** : Parmi d'autres effets observés, deux limonoïdes présents dans les agrumes (la limonine et la nomiline) inhiberaient la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), en plus d'inhiber l'activité de la protéase du virus (**Battinelli et al., 2003**). De plus, certains limonoïdes du citron démontrent une activité contre certains champignons pathogènes. D'autres limonoïdes et certaines protéines amélioreraient le système immunitaire chez l'animal. Ces résultats sont prometteurs, mais n'ont pas fait l'objet d'études cliniques contrôlées. Il est donc impossible pour l'instant de transposer ces effets chez l'humain (**Ghaderi et al., 2001**).

Chapitre II : Stress oxydatif

I. Définition du stress oxydant

Des composés à fort potentiel oxydant, sont produits constamment en situation physiologique au sein d'un organisme. Il se met alors en place un système antioxydant. En situation normale, la balance antioxydant/pro-oxydant est équilibrée. Mais l'organisme peut être confronté à une surexposition à des composés oxydants lorsque la production endogène d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) devient excessive ou suite à l'exposition à un phénomène toxique exogène.

Une alimentation pauvre en fruits et légumes où se trouve la majeure partie des antioxydants exogènes nécessaires (vitamines C et E, caroténoïdes, poly-phénols) favorise une baisse de la capacité anti-oxydante (**Favier, 1993**).

Le stress oxydant est étroitement lié au vieillissement cellulaire et à de nombreuses pathologies (**Halliwell et Gutteridge, 1984**).

II. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites dans n'importe quel type cellulaire, et ce même en conditions normales (**Rutkowski et al, 2007**). Trois de ces espèces réactives de l'oxygène seront décrites ici, soit l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH).

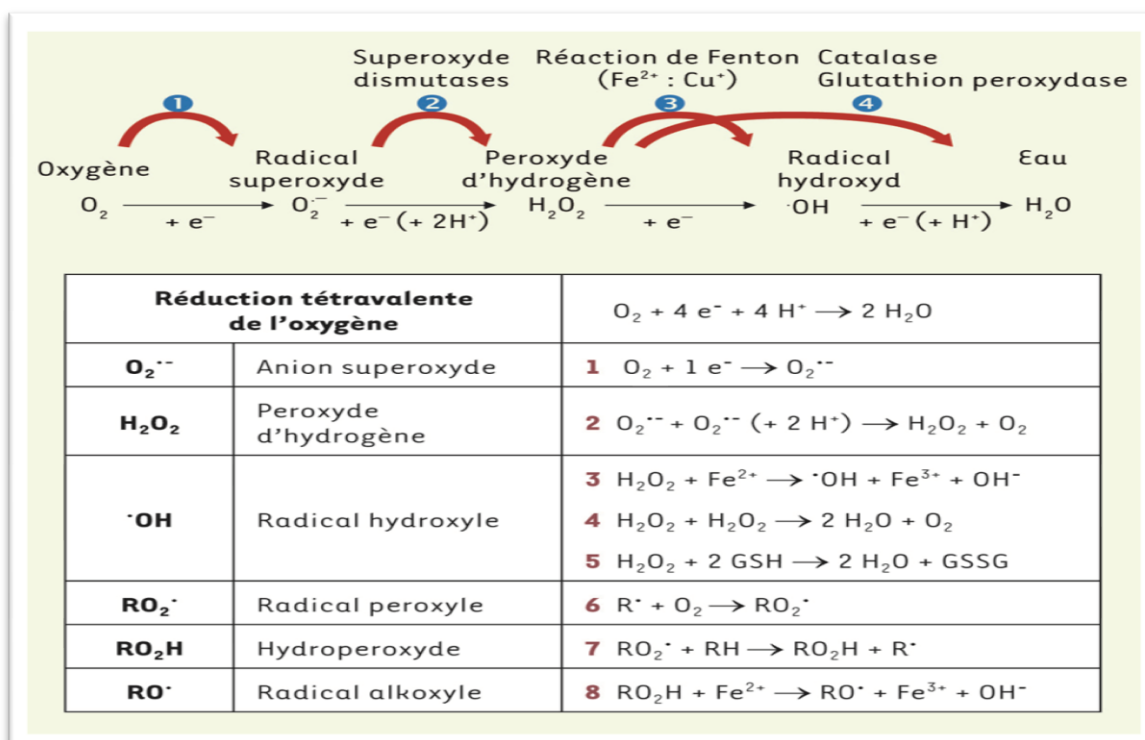


Figure 1: Origine des espèces réactives de l'oxygène (**Rutkowski et al, 2007**).

III. Les molécules du stress oxydatif

Anion superoxyde : catalyseur de la réaction de Haber-Weib par recyclage de Fe^{2+} et Cu^+ ; formation du peroxyde d'hydrogène et du peroxydinitrite.

Peroxyde d'hydrogène : formation du radical hydroxyle ; inactivation d'enzymes ; oxydation des biomolécules.

Radical hydroxyle : abstraction de l'hydrogène, production de radicaux libres et de peroxydes lipidiques, oxydation des thiols.

Oxygène singulet : réaction avec les doubles liaisons, formation des peroxydes, décomposition des aminoacides et nucléotides.

Oxyde nitrique : formation du peroxydinitrite, réaction avec autres radicaux.

Peroxydinitrite : formation du radical hydroxyle, oxydation des groupements thiols et aromatiques,

Hypochlorite : oxydation des groupements amine et sulfure, formation de chlore.

IV. Les situations du stress oxydant

Les situations lors desquelles l'organisme est soumis à un stress oxydant sont toutes les situations au cours desquelles la consommation en dioxygène et donc la production d'ERO (espèces réactives de l'oxygène) sont accrues (**Fisher-Wellman et Bloomer, 2009**). On peut citer toutes les situations d'hyperoxie, l'exercice physique intense et les phénomènes d'ischémie-reperfusion. Mais aussi les maladies inflammatoires chroniques et aiguës (par l'intervention du $TNF\alpha$), certains désordres nutritionnels, le vieillissement cellulaire (**Harman, 1956**).

V. Les systèmes antioxydants

1. Définition

L'organisme est capable, dans une certaine mesure, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques et chimiques développés au cours de l'évolution (**Hennebelle, 2006**).

Le radical libre arrache un électron à l'antioxydant et non pas aux constituants de nos cellules. Grâce à cette réaction, le radical libre devient stable. C'est un déchet sans danger qui sera éliminé naturellement par l'organisme. L'antioxydant, auquel il manque un électron, a l'avantage de ne pas se transformer en radical libre. Il devient inactif, et la réaction en chaîne est stoppée. La propagation des radicaux libres dans l'organisme cesse et les lésions sont ainsi limitées.

Il existe un très grand nombre de molécules anti oxydantes. Elles peuvent être biologiques (endogènes) ou bien apportées par l'alimentation (exogènes).

2. Systèmes antioxydants endogènes :

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GSH-Px) (Sharma et al., 2012).

Le rôle majeur de la superoxyde dismutase est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire.

-La **catalase**, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

-L'activité du **glutathion peroxydase**, ou GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (Delattre, 2005).

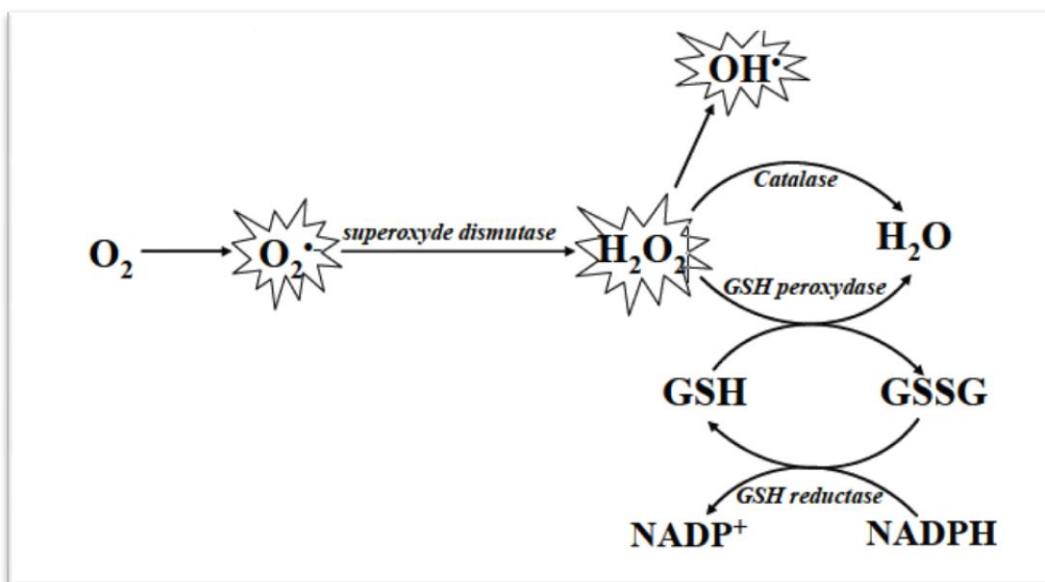


Figure 2 : production et élimination d'espèces réactives de l'oxygène soit: l'anion superoxyde (O_2^-) le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl ($HO\cdot$). Leur transformation se fait à l'aide des enzymes de détoxification soit: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px) qui oxyde également le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) (Klaassen, 2001).

3. Systèmes antioxydants exogènes :

Les antioxydants chimiques exogènes eux, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (McCall et Frei, 1999).

La **vitamine C** ou **acide ascorbique** est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire. Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH^-) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AscH^\bullet) (**Retsky et al, 1999**).

La **vitamine E** est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols. Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines. Elle prévient l'apparition d'hydro-péroxydes en piégeant les radicaux libres

(**Yoshida et al, 1993**).

Les **caroténoïdes (Car)** sont des pigments issus des plantes et des microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. On en dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO^\bullet , HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, R^\bullet par simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet (**Valko et al, 2006**).

Les **composés phénoliques (Ph)**, et en particulier les **flavonoïdes**, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (**Schroeter, et al, 2002; Leopoldini, et al, 2011**).

De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, en particulier du nombre de groupements hydroxyles (**Schroeter et al, 2002**).

Tableau 5: Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées
(**Koehlin-Ramonatxo, 2006**).

Principaux nutriments Antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs ,noix
β -carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium	Poisson, œufs viandes, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huitres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou Œufs, poissons, viandes

VI. Méthodes de dosage de l'activité anti-oxydante et anti-radicalaire

C'est l'ensemble de techniques qui permettent de mettre en évidence l'aptitude d'une molécule ou d'un extrait naturel à piéger des radicaux libres – par transfert d'électron et/ou de proton -issus de phénomènes d'oxydations (**Prior et al, 2005**). On parlera alors d'évaluation *in vitro* de l'activité anti-oxydante.

- Seules les méthodes les plus utilisées, seront représentées ici, en mettant en avant les mécanismes réactionnels, les avantages et inconvénients de la méthode (tableau 6).
- Les tests antioxydants *in vitro* biologiques sont difficilement accessibles en raison de leur caractère commercial (brevets). Néanmoins, la littérature mentionne quelques tests qui sont présentés dans le (tableau 7).

Tableau 6 : Description de quelques tests antioxydants *in vitro* chimiques (**Prior et al, 2005**)

QUELQUES TESTS <i>IN VITRO</i> CHIMIQUES				
Tests	DPPH	ABTS ou TEAC	FRAP	ORAC
Mécanismes réactionnels	• transfert d'électron majoritaire	• transfert d'électron et de proton	• transfert d'électron	• transfert de proton
Nature des molécules testées	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles	• hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	• CI_{50} et/ou en mg ou μmol équivalent Trolox [®]	• CI_{50} et/ou en mg ou μmol équivalent Trolox [®]	• en mg ou μmol équivalent Fe^{2+}	• CI_{50} et/ou en mg ou μmol équivalent Trolox [®]
Avantages	• très facile à mettre en œuvre • peu coûteux	• très facile à mettre en œuvre • cinétique de réaction très rapide • peu coûteux	• très facile à mettre en œuvre • peu coûteux	• facile à mettre en œuvre • coûteux (nécessité d'un fluorimètre) • Utilisation d'un générateur de radicaux (ROO [•])
Inconvénients	• encombrement stérique de molécules à hauts poids moléculaires • interférences possibles à 515 nm • forte dépendance au pH et au solvant • radical inexistant <i>in vivo</i>	• produits de dégradation antioxydants • radical inexistant <i>in vivo</i>	• pH utilisé non physiologique • interférences possibles à 595 nm • interférences avec composés possédant $E^{\circ} < 0,77 \text{ V}$	• mécanismes de génération des ROO [•] non physiologique • interférences possibles des protéines
Références	[Brand-Williams <i>et al.</i> , 1995; Pinelo <i>et al.</i> , 2004]	[Awika <i>et al.</i> , 2003; Arts <i>et al.</i> , 2004; Osman <i>et al.</i> , 2006]	[Benzie et Strain, 1996; Ou <i>et al.</i> , 2002]	[Ou <i>et al.</i> , 2001; Lopez <i>et al.</i> , 2003]
[Prior <i>et al.</i> , 2005]				

Tableau 7: Description de quelques tests in vitro biologique.

TESTS <i>IN VITRO</i> BIOLOGIQUES			
Tests	KRL	CAP-e	ROS-PMN
Substrat ou réactif utilisé	• érythrocytes • sang total	• érythrocytes	• leucocytes
Mécanismes réactionnels	• mécanismes enzymatiques et chimiques	• aptitude des AO à pénétrer et piéger les radicaux	• aptitude des AO à pénétrer et piéger les radicaux • Inhiber la formation des EOR par les leucocytes polynucléaires (mécanisme anti-inflammatoire) • effet pro-inflammatoire
Nature des molécules testées	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	• % du temps de demi-hémolyse • en mg ou μmol équivalent Trolox [®] , acide gallique	• en mg ou μmol équivalent Trolox [®] , acide gallique	• concentration en extrait
Avantages	• limitation des solvants • Utilisation d'un générateur de radicaux • attaque radicalaire continue et progressive	• limitation des solvants • utilisation d'un générateur de radicaux	• très similaire au test CAP-e avec en plus des effets anti-inflammatoires
Inconvénients	• accès difficile au brevet • coûteux	• attaque radicalaire uniquement initiale • accès difficile au brevet • étude uniquement qualitative	• utilisation de H_2O_2 • accès difficile au brevet • 3 mécanismes d'action
Références	[Prost, 1989; Blache et Prost, 1992]	[Honzel <i>et al.</i> , 2008; Kang <i>et al.</i> , 2010]	

Chapitre III : Les poly phénols et vitamine C

I. Introduction :

L'intérêt nutritionnel des poly-phénols date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi, 1937 (Prix Nobel), chercheur à l'Université Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou du jus de citron, riche en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre de mot perméabilité). Malgré ces premiers résultats encourageants, les recherches ne permirent par ensuite d'attribuer un rôle essentiel aux divers poly-phénols d'origine végétale. A partir des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour les poly-phénols dont les propriétés antioxydants sont remarquables (**Rosenfeld, 1997**).

1. Poly-phénols

1.1 Présentation générale sur les poly-phénols

Les **poly-phénols** constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les

Poly-phénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (**Harborne et al, 1992**).

1.2 Classification des poly-phénols

Une classification de ces substances a été proposée par HARBORNE en 1980. On peut distinguer les différentes classes des poly-phénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques), Ces composés sont universellement rencontrés chez les plantes.

Les flavonoïdes : Le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des poly-phénols. Certains sont des pigments quasi-universels des végétaux. Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les dihydroflavanols, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes.

Les citroflavonoïdes sont des polyphénols de la famille des flavonoïdes que l'on trouve spécifiquement dans l'écorce des agrumes (orange, citron, pamplemousse, mandarine, orange amère). Ce sont des pigments neutralisant les radicaux libres Ils sont antioxydants et améliorent l'absorption de la vitamine C (**Reddy et al, 2003**).

Lignines, les tanins qui sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tannins sont le vin et le thé (**Pénicaud, 2009**).

Plus rares, **les coumarines** qui ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce (**Hoffmann, 2003**), et **les stilbènes** qui se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine (**Belkheiri, 2010**).

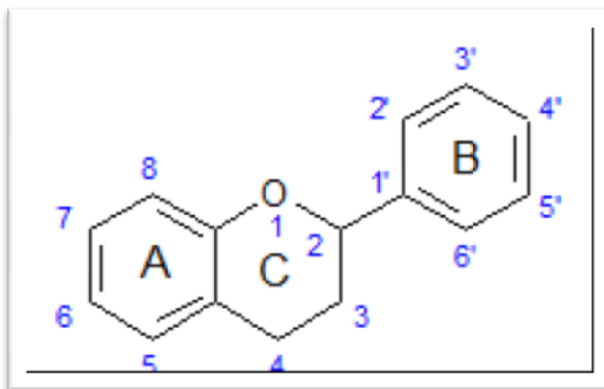


Figure 3 : Structure de base de flavonoïdes (Dacosta, 2003)

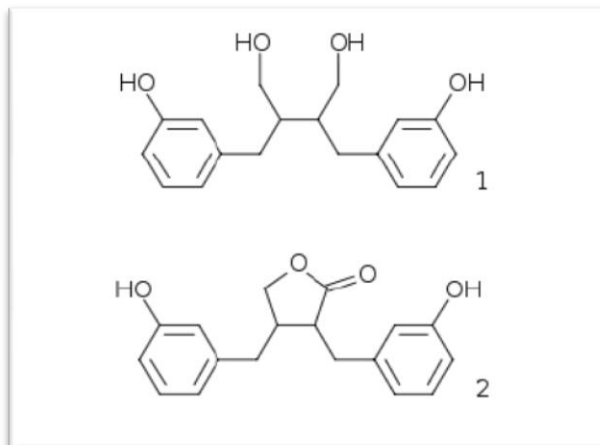


Figure 4 : Structure des lignanes (Midoun, 2011).

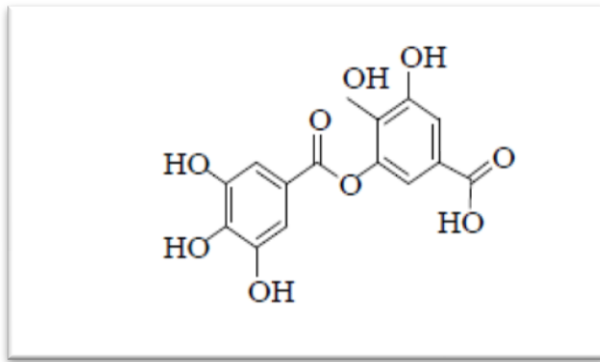


Figure 5 : Structure de base de tanins hydrolysables (Perrony, 2005)

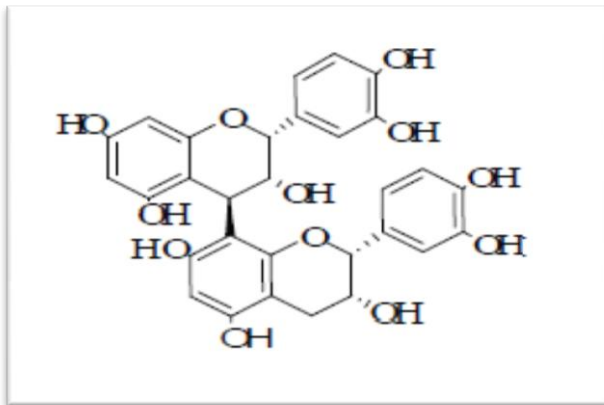


Figure 6 : Structure de base de tanins condensés (Hartzfeld, 2002)

1.3 Rôle des poly-phénols dans les plantes

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. D'autre part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité anti-microbienne (Maillard, 1996). Ainsi, il a été montré que les catéchines des feuilles du thé inhibent la croissance de micro-organismes en altérant des fonctions membranaires des pathogènes, les détruisant à plus ou moins long terme (Fukai et al, 1991).

1.4 Les polyphénols comme antioxydants

Les principaux mécanismes d'activité anti oxydante sont :

- Le piégeage direct des EOR ;
- L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR;
- La protection des systèmes de défense antioxydants (**Halliwell, 1994**).

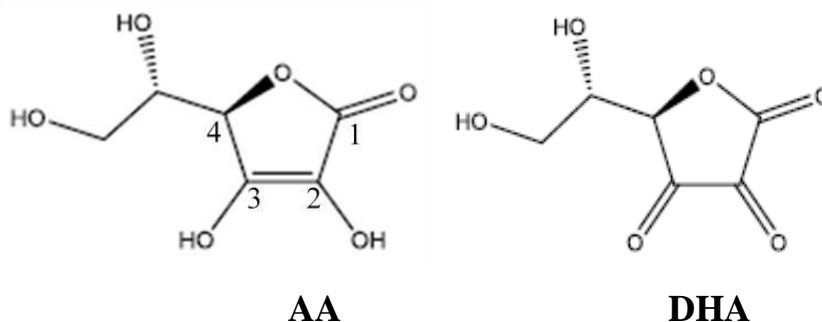
2. la vitamine C

2.1 Définition

La vitamine C est un antioxydant qui aide à rester en bonne santé. Puisque l'homme est incapable de la produire ou de l'emmagasiner.

2.2 structure de l'acide ascorbique

La structure chimique de l'acide ascorbique (AA) fut établie par Haworth en 1932. Sa formule chimique est $C_6H_8O_6$. Il possède une fonction ène-diol, deux fonctions alcool et une fonction lactone qui unit les carbones C_1 et C_4 . Sa forme oxydée est l'acide déhydroascorbique (DHA), de formule chimique $C_6H_6O_6$.



2.3 Sources de la vitamine C

La vitamine C se trouve essentiellement dans les végétaux frais, particulièrement dans les agrumes, les fruits frais, les légumes verts. Un bon apport alimentaire (fruits frais) doit suffire à couvrir les besoins quotidiens (**Fujita et al, 2001**)

2.4 Les rôles physiologiques et avantages de l'acide ascorbique

L'acide ascorbique joue plusieurs rôles dans l'organisme, notamment grâce à ses propriétés antioxydantes (**Evans et al, 2012**) et hydro-xylantes. Il intervient dans la synthèse du collagène, de la tyrosine, de la carnitine, du cholestérol et des acides biliaires. Il participe également au métabolisme du fer et a un rôle dans l'élimination des carcinogènes et des nitrosamines cancérigènes (**Feng et al, 2005**).

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition (PPABIONUT), faculté des sciences de la nature et de la vie ; de la terre et de l'univers, Université de Tlemcen.

I. Caractéristiques du citron étudié :

Dans ce travail nous avons choisi d'utiliser une espèce de citron « *Citrus Limon* » de la famille de rutacées planté à Tlemcen.

Tableau 08: Caractéristiques du citron étudié :

Caractéristiques	Moyenne ± écart type
Poids du citron (g)	217.37± 3,10
Volume du jus (ml)	77.33± 7,51
Dosage de la vitamine C dans le jus de citron (g /l)	6,644 ± 0
Dosage des poly-phénols dans le jus de citron (µg EAG/mg)	106,15 ± 6,16

II. Préparation des échantillons :

II.1 Jus :

Le jus de citron est pressé puis filtré. Le filtrat obtenu est centrifugé à 1500 t/min pendant 10 minutes. Le surnageant est réservé pour les dosages suivants.

III. Dosage de poly-phénols :

III.1 Principe :

Le Folin est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène

L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés.

Le dosage des poly phénols a été effectué à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible à double faisceaux de type SHIMADZU UV -2401PC, la technique à double faisceaux a aidé à éliminer l'absorbance du blanc et donner directement la densité optique de l'échantillon (Boizot et Charpentier, 2006).

III.2 Mode opératoire :

200 µl de jus de citron est introduit dans un tube, **1ml** de réactif de Folin Ciocalteu dilué

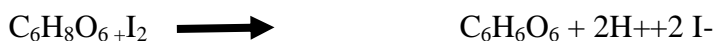
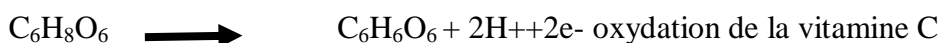
10 fois est ajouté. Après 4 minutes, **800** μl de la solution de carbonate de sodium est ajouté au tube. L'absorbance est mesuré à **765nm** après **2 h** d'incubation.

IV. Le dosage indirect de la vitamine C :

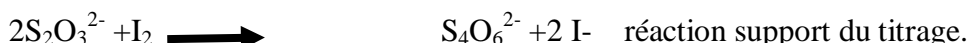
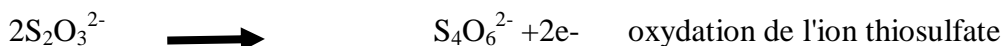
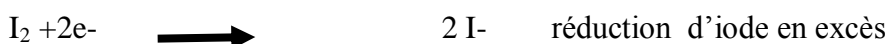
IV.1 Principe de dosage :

La totalité de la vitamine C réagit avec le d'iode en excès l'iode restant est dosé par une solution de thiosulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Lorsqu'il n'y a plus de molécule de vitamine C, les molécules d'iode vont s'accumuler dans la solution, cette accumulation indique la fin de titrage et la mise en évidence par la formation d'un composé bleu de grande intensité, ce composé est formé par l'iode et l'amidon

*couples oxydant / réducteur : $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6 / \text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$; I_2 / I^- .



Couples oxydant / réducteur: $\text{S}_4\text{O}_6^{2-} / \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; I_2 / I^- .



IV.2.Mode opératoire :

Dans un bécher **10ml** de jus et **20ml** d'iode sont introduit, le mélange est agité puis incubé pendant **4 minutes**. **10 gouttes** d'empois d'amidon sont ajoutés. La titration est réalisée par une solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. jusqu'a la disparition de la couleur.

V. Mesure de l'activité anti-oxydante:

V.1 Test d'hémolyse :

V.1.1 Principe :

-Ce test consiste à soumettre un échantillon de sang à une agression oxydante (production

contrôlée des **radicaux libres RL**)

-La lyse des cellules sanguines est induite par un générateur des **RL** : le **TBHP**, les érythrocytes ainsi libèrent tout leur équipement enzymatique et moléculaire pour résister à cette agression jusqu'à ce que la membrane soit modifiée et que la cellule laisse échapper son contenu (**Lesgard, 2000**).

V.1.2 Mode opératoire :

Le sang prélevé est collecté dans des tubes héparinés puis centrifugés à **2000 t/min** pendant **10 minutes**. Le plasma est éliminé et le culot est réservé. Trois lavages successifs sont effectués avec du tampon phosphate. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à **2000 t/min** pendant **10 minutes**. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les érythrocytes est dilué dans un tampon de phosphate pour obtenir un hémocrite de 2 %.

A la solution de globules rouges de 2 % est ajoutée **50 µl** de l'extrait de jus et l'incuber pendant **30 min** à 37 C° sous agitation, puis **5 µl** de TBHP (pro-oxydant) sont ajoutés. Une deuxième incubation à 37°C pendant **2h** sous agitation est réalisée.

V.1.3 Taux d'hémolyse :

Dans un ependorf, **100 µl** d'extrait de jus est introduit puis **900 µl** de PBS est ajouté. Le mélange est ensuite agité puis centrifugé à **2000 t/min** pendant **10 min**. Lire la DO du surnageant à **545 nm** contre le blanc (PBS).

V.1.4 Hémolyse Total :

Dans un ependorf on introduit **200 µl** d'extrait de jus et **800 µl** d'eau distillée glacée à **4°C**, le mélange est agité puis incubé pendant **15 min** à **4° C**. Lire la DO du tube PBS contre l'eau distillée. Une aliquote de **360 µl** de l'hémolyse totale est réservés vue du dosage des paramètres de stress oxydatif.

VI. Mesure des marqueurs de stress oxydatif:

VI.1 Dosage du GSH :

VI.1.1 Principe :

Le taux du glutathion réduit (GSH) est mesuré sur le plasma et le lysat érythrocytaire, le dosage est réalisé par le **réactif d'Ellman** (DTNB) (**Ellman,1959**). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui

libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB). Ce dernier à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à **412 nm** avec un coefficient d'extinction égal à $13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

VI.2 Dosage du MDA :

VI.2.1 Principe :

Le malondialdéhyde (MDA) plasmatique et érythrocytaire est mesuré selon la **méthode de Draper & Hadley**, 1990. Il représente le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Après traitement par l'acide à chaud, les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA. L'absorption intense de ce chromogène se fait à une longueur d'onde de **532 nm**. La concentration du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ; $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 532 nm.

VI.2.2 Analyse statistique :

Les résultats sont présentes sous forme de moyenne \pm erreur stand . Tous les tests sont réalisés à l'aide du programme STATISTICA version 4.1 (STATSOFT, TULSA, OK).

I. Taux des polyphénols

Les résultats montrent que le taux des polyphénols dans le jus de citron ($106.15 \mu\text{g EAG/mg}$) est présent en petites quantités .

II. Taux de la vitamine C

Les résultats montrent que la concentration en vitamine C dans le jus (6.644g/kg) est présente en petites quantités

III. Taux d'hémolyse

III. 1-Taux d'hémolyse en présence du jus de citron

Le taux d'hémolyse induit par le TBHP représente (58.94%), cependant, l'ajout du jus de citron entraîne une diminution du taux d'hémolyse (27.50%) comparé au contrôle (TBHP), il en est de même en présence de jus + TBHP (47.66%) (**Figure 07**).

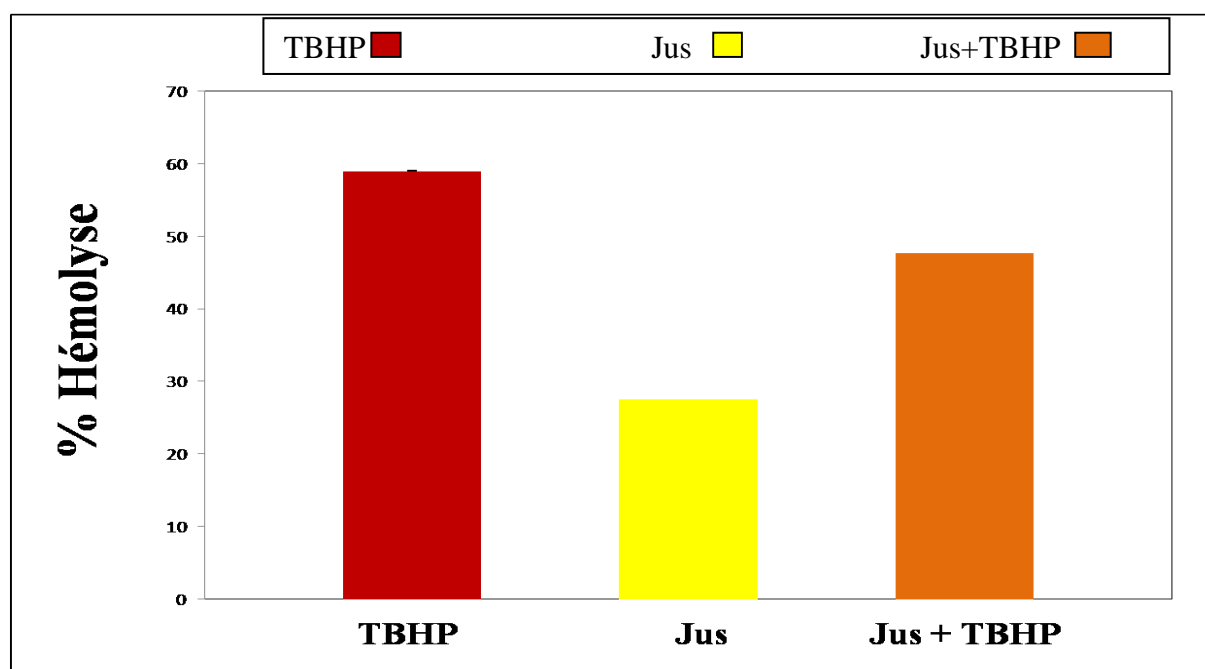


Figure 07: Taux d'hémolyse d'une solution de GR à 2% (V/V) en présence de jus de citron, de TBHP et de TBHP + jus.

Les érythrocytes sont incubés en présence de jus , de TBHP et de TBHP + jus . Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart type.

IV. Statut oxydant/antioxydant

IV.1 Teneurs érythrocytaires en GSH en présence de jus de citron

Les teneurs érythrocytaires en GSH ne montrent aucune différence significative dans les tubes contenant les érythrocytes en présence de TBHP (0,084mmol/l) et du TBHP en présence de jus (0,092mmol /l) par rapport au témoin (PBS) (0,094mmol /l). En outre, les teneurs en GSH montrent une différence significativement élevée dans les tubes contenant les érythrocytes en présence de jus (0,159mmol/l (**Figure 08**)).

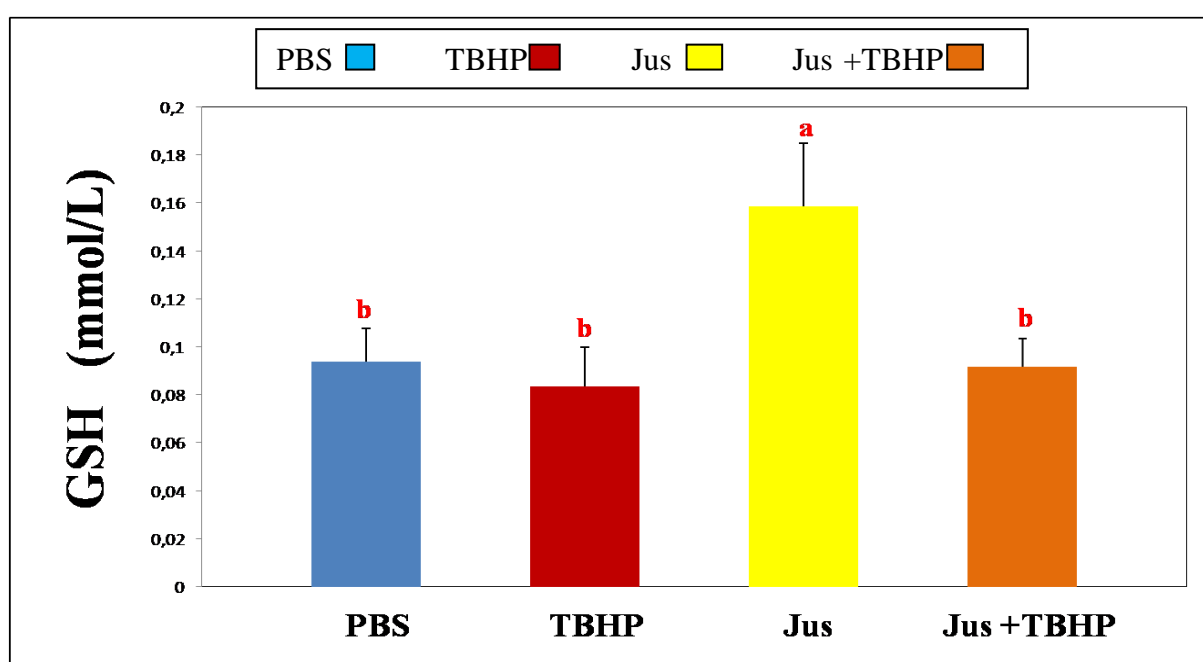


Figure 08: Teneurs érythrocytaires en GSH d'une solution de GR à 2% (v/v) et en présence de jus de citron .

Les érythrocytes ont été incubés en présence de PBS, de jus, de TBHP et de TBHP + jus . Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart type. Les différences significatives sont marquées par des lettres différentes (a,b).

IV.2 Teneurs érythrocytaires en MDA en présence de jus de citron

Les résultats des marqueurs du statut oxydant ont montré une augmentation significative des teneurs érythrocytaires en MDA de 0.205 mmol/l dans les tubes contenant les érythrocytes en présence de TBHP comparés au témoin (PBS). Par contre, aucune différence n'est observée pour les teneurs en MDA en présence du jus de citron (0,168mmol/l) ou bien du jus de citron

complexé avec du TBHP (0,170mmol/l) comparé au témoin (PBS) (0,155mmol/l) (**Figure 09**) .

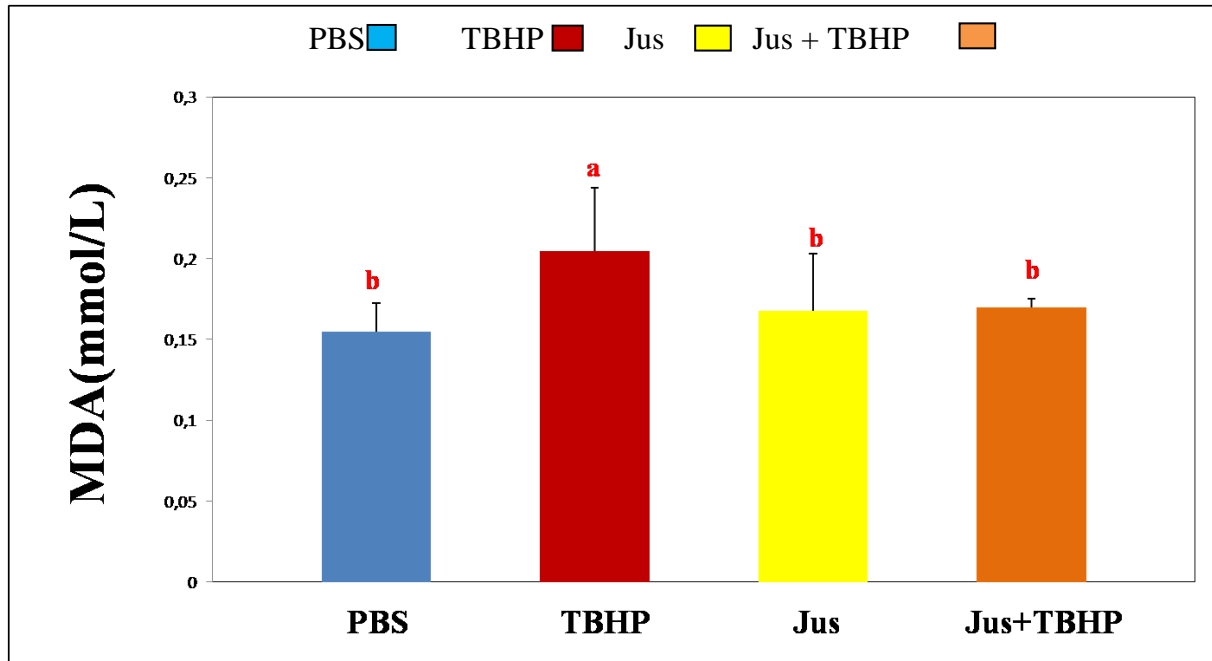


Figure 09: Teneurs érythrocytaires en MDA d'une solution de GR à 2% (v/v) et en présence de jus de citron.

Les érythrocytes ont été incubés en présence de PBS, de jus, de TBHP et de TBHP + jus . Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart type. Les différences significatives sont marquées par des lettres différentes (a,b).

Ce travail vise à doser et à mettre en évidence l'effet de deux antioxydants (les composés phénoliques et la vitamine C sur le stress oxydatif *in vitro*. Au cours de ce travail, nous avons aussi étudié la capacité de ces antioxydants à piéger les radicaux libres.

Concernant le dosage de la vitamine C, nos résultats ont révélé que le taux de vitamine C est faible dans le jus de citron, le fait qu'elle est très sensible et s'oxyde facilement à la lumière et à la chaleur (**Gonzales-Molina, 2008**).

Les poly-phénols ont été longtemps considérés comme des agents chimio-prévenants avec de fortes activités anti-oxydantes (**Lee et al, 2003**). Et forment les composés antioxydants poly-phénoliques alimentaires qui peuvent avoir des avantages potentiels dans la santé et la gestion des maladies. Les extraits d'agrumes et les flavonoïdes d'agrumes présentent une large gamme de propriétés biologiques prometteuses, y compris des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-tumorales et anti-oxydantes et l'inhibition des caillots de sang (**Middleton et al, 1994**). Des espèces d'agrumes de diverses origines ont été évaluées pour leurs constituants phénoliques et leurs activités anti-oxydantes (**Anagnostopoulou et al, 2006**).

Nos résultats ont révélé que le jus contient une quantité moyenne en poly-phénols. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Gorinsteina et ses collaborateurs 2001**, qui ont démontré que les poly-phénols sont les composants majeurs de l'écorce sèche de citrus limon.

D'autres auteurs suggèrent que le jus de citron se caractérise par la présence de quantités significatives des flavanones, l'hespéridine et eriocitrine (**Ramfula et al, 2011**). Il y a une autre expérience qui montre que les zestes contiennent des quantités plus importantes de poly phénols que le jus (**Yusof et al, 1990**).

Concernant le test d'hémolyse l'incubation *in vitro* des érythrocytes isolés du sang humain avec des concentrations variables des extraits de jus a été réalisée à fin d'évaluer l'activité anti-hémolyse. Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydant. En raison de leurs facilités d'isolement, leurs simplicités, la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en hémoglobine, ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs (**Arbos et al, 2008**). Quand les antioxydants seront consommés, les radicaux libres agiront alors sur les parois des érythrocytes entraînant alors leur éclatement. S'il y'a dans le milieu des composés à activité anti-oxydante, l'hémolyse sera logiquement retardée

(**Thomas, 2016**).

De nombreuses études réalisées sur les produits naturels ont prouvé que ce sont particulièrement les composés phénoliques qui sont responsables de leur activité anti-oxydante (**Apostolidis et al, 2007**).

Dans les conditions de ce test, les radicaux libres sont générés par le TBHP. Nos résultats ont révélé une diminution de l'hémolyse en présence du jus lorsque les globules rouges sont soumis à l'action pro-oxydante du TBHP.

Notre extrait de jus montre des activités anti-hémolytiques grâce à la présence des citro- flavonoides et de la vitamine C. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres auteurs qui ont confirmé que les citro-flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en cédant l'hydrogène de leurs groupements hydroxyles. Ils renforcent aussi l'action de la vitamine C en empêchant son oxydation (**Sandhar et al, 2011**).

Concernant les teneurs érythrocytaires du GSH, nos résultats révèlent de fortes teneurs en GSH en présence du jus. Ceci peut être expliqué par la capacité des cellules à réduire en masse le GSSG (glutathion oxydé) en GSH (glutathion réduit) lorsque la vitamine C est présente en très grande quantité (**Jones, 2002**). Lorsque le TBHP est ajouté au jus du citron la teneur du GSH diminue. Ceci est dû à la forte utilisation de la GSH au cours du stress oxydatif. En effet lors d'un stress oxydatif le GSH régénère les autres antioxydants que sont les vitamines C et E et l'ubiquinone sous leur forme initiale, après que ceux-ci aient réagi avec les radicaux libres (**Jones, 2002**). Le glutathion permet aussi la neutralisation des radicaux libres générés par le TBHP empêchant ainsi l'oxydation des acides gras (**Jones et al, 2002 ; Martin, 2003**).

Il y a certaines études qui montrent que la supplémentation de l'alimentation ou l'administration orale d'extraits végétaux riches en poly-phénols corrige également la chute du taux de GSH (**Mustafa et al., 2006, Marquez et al., 2010**).

Le taux élevé du MDA reflète un stress oxydatif portant notamment sur l'oxydation des lipides (**Delattre et al, 2005**). Les résultats de notre étude ont montré que les concentrations en MDA érythrocytaires sont significativement augmentées dans les tubes contenant les érythrocytes en présence de TBHP par rapport au contrôle. Ces résultats sont en faveur de la présence d'un stress oxydant évident dû à la capacité de ce radical synthétique à générer des radicaux libres portant notamment sur l'oxydation des lipides ce qui augmente le

taux de MDA. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études antérieures qui ont montré que la décomposition thermique du TBHP produit un radical libre qui attaque les lipides polyinsaturés des membranes ce qui provoque la peroxydation lipidique (**Dwight et Hendry, 1995**).

En présence du jus du citron, nos résultats montrent une diminution du taux du MDA érythrocytaires, ce qui suggère que la vitamine C et les citro-flavonoïdes présents dans le jus inhibe la peroxydation lipidique limitant ainsi la production du MDA. Ceci concorde avec des études qui ont montré que la vitamine C s'oppose à l'initiation de la peroxydation lipidique par chélation ou par suppression de la production des radicaux libres (**Jonsson et al, 2003**). Aussi les citro-flavonoïdes neutralisent les radicaux libres limitant ainsi la production du MDA (**Sandhar et al, 2011**).

Le citron (*Citrus limon*) est une source de composés bioactifs : vitamines C et flavonoïdes. Dans le but de valoriser le jus du citron, nous avons mesuré le taux de la vitamine C, des poly-phénols, l'activité anti-hémolytique et les concentrations en composés antioxydants.

Concernant le dosage de la vitamine C et des poly-phénols, le jus contient des quantités moyennes en vitamine C (6.644g/kg) et de poly-phénols (106.15 µg EAG/mg).

L'exposition des érythrocytes à des conditions oxydatives résulte en la formation des radicaux libres qui conduisent finalement à la lyse cellulaire. Les antioxydants sont capables de contrecarrer la formation des radicaux libres et la lyse cellulaire.

En effet, nos résultats concernant le test hémolytique montrent une diminution du taux d'hémolyse dans les tubes contenant les érythrocytes en présence de jus de citron de part la présence des poly-phénols et de la vitamine C.

En ce qui concerne l'évaluation de certains marqueurs du statut oxydant / antioxydant au niveau du lysat érythrocytaire, il apparaît que ces poly-phénols et la vitamine C présente dans le jus de citron, diminuent la teneur en MDA et augmentent l'activité érythrocytaire du GSH. Ceci suggère que ces composants du citron améliorent le statut redox en stimulant le système de défenses antioxydants.

Le jus de citron constitue donc une source intéressante d'antioxydants naturels qui peuvent remplacer les antioxydants synthétiques nuisible à la santé.

Au terme de ce travail, afin de valoriser le jus et l'écorce de citron il faut prendre en considération ces bienfaits qui représentent une source d'antioxydants. Pour cela :

- Il faut investissez dans des projets pour le recyclage des écorces de citron.
- Utilisez le citron comme antioxydant naturel et évitez les antioxydants synthétiques.
- encouragez la consommation quotidienne de citron par les autorités de santé publique, et la plantation d'agrumes.

Références

B

Battinelli L, Mengoni F, 2003. Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells. *Planta Med.* ;69:910-913.

BELKHEIRI, N , 2010. Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE

Bourgou S, Rahali FZ, Ourghemmi I, Saïdani Tounsi M, 2012 ,Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *ScientificWorldJournal.* ;pp 52 85 93.

C

Castillo J, Benavente-Garcia O ,2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J.Agric.Food.Chem.* 56:6185-205

Chainani-Wu, 2002. Diet and oral, pharyngeal, and esophageal cancer. *Nutr Cancer* ;44:104-126.

Communiqué de presse de l'INAO .

Chappuis P, 1991. Les oligo-éléments en médecine et biologie. EMI, LAVOISIER TEC & DOC, Paris.

Constans T, 1998. Besoins nutritionnels de la personne âgée Nutrition et alimentation de la personne âgée .

D

Delattre ,2005, des Plantes, Livre V, d'après le Livre II, paragraphe 25 de l'Anthologie palatine

E

Evans JR, Lawrenson JG,2012 Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration *Cochrane Database Syst Rev*;11:

F

Favier A., Cadet J., Kalaryanaman R., Fontecave M., Pierre J.-L.,1993 Analysis of Free Radicals in Biological Systems, Birkhauser, New-York,

Fisher-Wellman et Bloomer, 2009 Oxid Med Cell Longev. (1):19-25

Feng, S.L . Wang, X. G. Chen, J. Fan , 2005 ; Kinetic spectrofluorimetric determination of Spectrochim. Acta, 61 841- 844.

Foschi R, Pelucchi C, et al, 2010 Citrus fruit and cancer risk in a network of case-control studies. Cancer Causes Control;21:237-42.

Fukai K. et coll., 1991. J. Agric. Biol. Chem,55, 1895-1897

Fujita, Y, Mori, I., Yamaguchi, T., Hoshino, M., Shigemura, Y., Shimano, M, 2001, Anal. Sciences, 17, 853.

G

Ghaderi A, Gharagozloo M, 2001. Immunomodulatory effect of concentrated lime juice extract on activated human mononuclear cells. J Ethnopharmacol. 77:85-90.

Guyatt G, Bae JM, Lee EJ, 2009. Citrus fruit intake and pancreatic cancer risk: a quantitative systematic review. Pancreas;38:168-74

González-Molina E, Moreno DA, García-Viguera C,2008. Genotype and harvest time influence the phytochemical quality of Fino lemon juice (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) for industrial use. J Agric Food Chem. 12;56(5):1669-75.

H

Halliwell B, 1994. Nutr. Rev. ,52, 253- 265.

Halliwell et Gutteridge, 1984 oxygen toxicity.oxygen radicals.transition metals and disease.biochem j219:1-4

Harborne JB, Williams CA, 1992, Advances in flavonoid research . Phytochemistry 55:481–504.

Harman D. Aging ,1956 : a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* ; 11 : 298–300

Hennebelle, 2006. Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. Marruhi um peregrinum, Bal iota larendana, Ballota Pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbénacées). Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologique de Lille, Lille L Ecole Doctorale Sciences de la Matière du rayonnement et de l'Environnement. France

Hoffmann, L,2003. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I.

K

Kawaguchi K, Mizuno T, et al, 1997. Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and Pseudomonas. *BiosciBiotechnolBiochem.*;61:102-104

Koechlin-Ramonatxo C, 2006 . Nutrition clinique et métabolisme 165–177

L

Louis Rosenfeld, 1997 « Vitamine—vitamin. The early years of discovery », *Clinical Chemistry*, vol. 43, p. 680-685

Leopoldini, N. Russo, M. Toscano ,2011 ,The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants *Food Chemistry*, pp. 288-306

M

Maillard M. N, 1996. Thèse Doct., E.N.S.IA., Paris, 148p.

McCall MR, Frei B, 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad Biol Med*, 26:1034–53.

O

Ogata S, Miyake Y, et al ,2000. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (Citrus limon BURM. f.) and its metabolites in HL-60 cells. *BiosciBiotechnolBiochem.* 64:1075-1078.

P

Pénicaud, C, 2009. Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. Thèse de Doctorat : Université de MONTPELLIER II

Poulose SM, Harris ED, Patil BS, 2005. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity.;135:870-877.

Prior et al, 2005 Production mondiale de citrons et limes en 2010

R

Reddy TK ,Jageti GC, Venkatesha VA, Naringin, 2003 a citrus flavonone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis* 18(4): 337–343

Retsky KL, Chen K, Zeind J & Frei B ,1999 Inhibition of copper induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. *Free Radic Biol Med* 26, 90–98.

Revue Weleda, 2010

Ruth Kava, 2000, Vitamins and Minerals: Does Epidemiologic Evidence Justify General Supplementation ? », American Council on Science and Health,

Rutkowski D. T., Wu J., Backetal S. H, 2007 UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stressmediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev. Cell* 15: 829–840

S

Sharma, A.B. Jha, R.S. Dubey, M. Pessara k li ,2012 ,Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions *J. Bot.* pp. 1-26

S. L. Feng, J. Wang, X. G. Chen, J. Fan , 2005 ; Kinetic spectrofluorimetric determination of Spectrochim. Acta, 61 841- 844.

Schroeter H, Boyd C, Spencer JPE, et al. MAPK, 2002, signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric acid. *Neurobiol Aging.*;23:861–80

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

T

Table de composition nutritionnelle des aliments CIQUAL ,2013 via le site internet www.anses.fr, consultée le 09/07/2014.

Tanaka T, Kohno H, Tsukio Y et al ,2000 Citrus limonoidsobacunone and limonin inhibit azoxymethane-induced coloncarcinogenesis in rats. *Biofactors.* 13:213-218.

Tolkowsky S, 1966. Citrus fruits, their origin and history throughout the world. Jerusalem

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

V

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al , 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter* 160:1–40.

Van Esch J. H., Feringa B. L, 2000 New functional materials based on self-assembling organogels: from serendipity towards design, 39, 13, 2263-2266

Y

Yoshida, T., Honda, A., Tanaka, N. et al, 1993. Simultaneous determination of mevalonate and 7 α -hydroxycholesterol in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry as indices of cholesterol and bile acid biosynthesis. *J. Chromatogr.*, 613:185–93.

Résumé

Le citron constitue une source d'antioxydants naturels non valorisée.

Ce travail porte sur l'étude de la capacité du jus de citron à chélater les métaux pro-oxydant et à piéger les radicaux libres. L'évaluation du pouvoir antioxydant a été réalisée par le test d'hémolyse suivi par, le dosage des paramètres du stress oxydants (MDA et GSH). Les résultats obtenus montrent la présence dans le jus de *Citrus limon* de poly-phénols dont la teneur est de 106.15 µg EAG/ g. La teneur en vitamine C dans le jus de *Citrus limon* est de 6.64g/kg. La présence des poly-phénols et de la vitamine C dans le jus de citron entraîne une diminution du taux d'hémolyse une diminution du taux du MDA et d'une augmentation du taux du GSH.

Les résultats de la présente étude nous permettent de conclure que le jus du citron constitue une bonne source en divers antioxydants avec une bonne activité biologique anti-oxydante et anti-hémolytique

Mots clés : jus, antioxydants, polyphénols, vitamine C,

Abstract

The lemon constitutes a source of anti-oxidants natural not developed.

This work concerns the study of the capacity juice to chelating metals pro-oxidant and has to trap the free radicals. The evaluation of the antioxydant power was carried out by the hemolysis test e followed by the proportioning of the parameters of the oxidizing stresses (MDA and GSH).The got results show the wealth of citrus silt in poly phenols whose varies 106.15 µg EAG/g. The vitamin C values in the citrus silt 6.64g/kg . The presence of polyphenols and the vitamin C in the juice involves a reduction in the rate of hemolysis a reduction in MDA rate and an increase GSH rate.

The results of this study enable us to conclude that the juice of lemon constitutes a good source in various anti-oxidants and anti-hemolytic biological activity.

Keywords: juice, polyphenols, anti-oxidants, vitamin C

ملخص

يشكل الليمون مصدرا طبيعيا من المضادات للأكسدة الغير المستعملة. هذا العمل يتعلق بدراسة عصير الليمون وقدرته على امسك المعادن المؤكسدة و ازالة الايونات الحرة. تم تقييم القوة المضادة للأكسدة عن طريق اختبار انحلال الدم و تقييم معايير الاجهاد المؤكسد (MDA,GSH) . النتائج المتحصل عليها تبين ان نسب البوليفينول في الليمون *Citrus lemon* تعادل 106.15 g/EAG/µg وتتراوح كمية الفيتامين سي في عصير الليمون 6.64غ/كغ. وجود البوليفينول و الفيتامين سي في عصير الليمون يساعدان على خفض انحلال الدم خفض معدل MDA و زيادة معدل GSH .

النتائج المتحصل عليها من خلال هذه الدراسة تبين أن عصير الليمون يشكل منبعا من مضادات الاكسدة التي تساعدان على مكافحة الاكسدة و انحلال الدم

الكلمات الرئيسية : عصير, البوليفينول, مضادات الاكسدة, فيتامين سي



Introduction



Partie : 1

Etude

Bibliographique



Partie : 2

Etude

Expérimentale



*Résultats et
interprétations*



Discussion



*Conclusion et
Perspectives*



Références
Bibliographiques