



**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche Scientifique**

**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMCCEN**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie,**

**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 en biologie**

**Option : Physiologie cellulaire et Physiopathologie**

**Thème**

***Impact des polyphénols, des citroflavonoïdes et des tanins de l'écorce de la clémentine sur le stress oxydant***

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> SEDJAI Selma et M<sup>elle</sup> BENAÏSSA Cheime**

**Présidente : Mme MOKHTARI N Professeur Université Tlemcen**

**Examineur : Mme SAKER M Professeur Université Tlemcen**

**Promotrice : Mme BEKHTI SARI F Maitre de conférences Université de Tlemcen**

**Année universitaire : 2020/2021**

# Remerciements

*Tout d'abord, Nous tenons à remercier dieu tout puissant de nous avoir données la force, le courage, la patience et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science.*

*Nos remerciements les plus vifs s'adressent à notre directeur de thèse, notre promotrice Bekhti Sari Fadia. Nous vous remercions d'avoir acceptée de diriger notre mémoire. Merci pour votre disponibilité, conseils, aide et surtout pour votre patience pendant la rédaction de ce travail. Nous vous sommes sincèrement reconnaissantes.*

*Nous exprimons nos profondes gratitudee à Madame la professeur Mokhtari Nassima d'avoir acceptée la présidence du jury de cette thèse, qu'il trouve ici l'expression de nos profonds respects. Nos remerciements s'adressent également à la professeur Saker Meriem qui a acceptée d'examiner ce travail et de participer à ce jury.*

*Nos remerciements vont également à l'adresse de toutes les personnes qui ont contribués de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Ainsi que tous nos familles qui nous ont soutenus, encouragées et motivées tout au long de nos études.*

# Dédicace

*Je dédie ce travail :*

♥ *A mon cher père, **SEDJAI Tayeb***

♥ *A ma chère mère, **MIMOUNI Samira***

*Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour je puisse atteindre mes objectifs.*

♥ *A mes chères sœurs, **Aida, Fatima Zahra et Saadia***

*Pour ses soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long de mes études.*

♥ *A mon cher binôme : **BENAISSA Cheime***

*Pour sa entente et sa sympathie*

♥ *A mes ami(e)s : **Halima, Nassima, Zahra, Reda, Imane, Soulef, Youssra et Sarah***

*Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles*

♥ *A toute ma famille, ma tante **Zakia**, son mari et ces enfants, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour*

♥ *A tous ceux que j'aime*

*Puisse dieu vous donne santé et de bonheur*

♥ ***Selma***

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail :*

♥ *A ma famille qui a partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la  
Réalisation de ce travail et qui,*

♥ *Femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes  
Exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse*

*Mon adorable mère **Benaissa rekia***

♥ *L'homme à qui je dois ma vie, ma réussite m'a doté d'une éducation digne ;  
son*

*Amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Mon cher père **benaissa***

***Mostapha***

♥ *Mon cher frère **Abdelhak** qui n'a pas cessé de me conseiller, de m'encourager  
et*

*De me soutenir tout au long de mes études, que dieu les protège et lui offre la  
Chance et le bonheur.*

♥ *Pour mes sœurs **Fatima Amel khalida** et petite sœur **rihem** que dieu leur  
donne une longue et joyeuse vie.*

♥ *A mon cher binôme pour sa entente, sa sympathie, sa compréhension et sa  
Patience infinie mon adorable **Sedjai Selma***

♥ *A tous mes amis, surtout **nada** et **Sanaa ; Salim** et a tous mes collègues, qui  
M'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.*

♥ *A tous ceux qui m'ont soutenu et épaulé pour que je puisse atteindre mes  
Objectifs.*

♥ ***Cheime***

## Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

الملخص

Introduction.....1

### ***Chapitre 01 : Synthèse bibliographique***

I. La clémentine ..... 4

I.1. Définition ..... 4

I.2. Historique et origine géographique de la clémentine..... 4

I.3. Systématique ..... 5

I.4. Morphologie de la clémentine ..... 5

I.5. Composition chimique de la clémentine ..... 6

I.6. Variétés de clémentine..... 7

I.7. Bienfaits nutritionnels de clémentine ..... 8

II. Les composés phénoliques de la clémentine ..... 8

II.1. Généralités sur les polyphénols..... 8

II.1.1. Classification des polyphénols ..... 9

II.1.2. Propriétés biologiques des polyphénols..... 9

II.2. Généralités sur les flavonoïdes..... 9

II.2.1. Classification des flavonoïdes ..... 10

II.2.2. Les citroflavonoïdes ..... 11

II.2.3. Les citroflavonoïdes de clémentine ..... 11

II.3. Généralités sur les tanins .....	13
II.3.1. Classification des tanins .....	13
II.3.2. Propriétés biologiques des tanins de clémentine.....	14
III. Stress oxydatif .....	15
III.1. Définition .....	15
III.2. Radicaux libres.....	16
III.3. Conséquences biologiques de stress oxydant.....	17
III.4.1. Antioxydants (naturels non enzymatiques).....	19
III.4.2. Antioxydants enzymatiques.....	20
III.4.3. Antioxydants synthétiques .....	21
III.4.4. Mécanismes d'action des antioxydants.....	21
IV. Modes d'action des polyphénols dans la défense antioxydante.....	21
V. Mécanisme d'action des flavonoïdes contre les ROS .....	23
VI. Les Antioxydants de clémentine .....	23
VI.1. Acides phénoliques.....	24
VI.2. Flavonoïdes.....	24
VI.3. Tanins .....	25

## ***Chapitre 02 : Matériel et méthodes***

I. Préparation des extraits de l'écorce de la clémentine.....	27
I.1. Le séchage .....	27
I.2. Le broyage et le tamisage.....	27
II. Extraction des composés phénoliques totaux .....	27
II.2. Macération .....	28
II.3. L'évaporateur Rotatif.....	29
III. Extraction des tanins .....	29
IV. Extraction des citroflavonoïdes.....	30

V. Test de cytotoxicité .....	31
V.1. Préparation de la suspension des globules rouges humain .....	31
V.2. Mode opératoire .....	32
VI. Dosage des paramètres du statut oxydant /antioxydant .....	32
VI.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA) .....	33
VI.1.1. Principe .....	33
VI.1.2. Procédure .....	33
VI.2. Dosage du glutathion réduit GSH (Ellman, 1959) .....	33
VI.2.1. Principe .....	33
VI.2.2. Procédure .....	33
VII. Etude statistique .....	34

### ***Chapitre 03 : Résultats et interprétations***

I. Test d'hémolyse .....	36
II. Statut oxydant .....	37
III. Statut antioxydant .....	38
I. Test d'hémolyse .....	40
I.1. Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence des polyphénols totaux .....	40
I.2. Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence des tanins .....	40
I.3. Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence des citroflavonoïdes .....	40
II. Statut oxydant .....	40
II.1. Teneurs érythrocytaires de MDA en présence des polyphénols totaux .....	40
II.2. Teneurs érythrocytaires de MDA en présence des tanins .....	41
III. Statut antioxydant .....	41
III.1. Teneurs érythrocytaires de GSH en présence des polyphénols totaux .....	41
III.2. Teneurs érythrocytaires de GSH en présence des tanins .....	41

## **Chapitre 04 : Discussion et Conclusion générale**

Discussion .....	43
Conclusion.....	49
-Références bibliographiques .....	52



## Liste des tableaux

<b>Tableau n°01:</b> Classification botanique de clémentine .....	5
<b>Tableau n°02:</b> Valeur nutritive de la clémentine .....	6
<b>Tableau n°03:</b> Caractéristiques de quelques types de clémentine .....	7
<b>Tableau n°04:</b> Les principales classes des flavonoïdes .....	10
<b>Tableau n°05:</b> Propriétés fonctionnelles et domaines d'utilisation de quelques citroflavonoïdes de l'écorce de clémentine .....	12
<b>Tableau n°06:</b> Les principales espèces réactives de l'oxygène .....	17

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Photographie du fruit <i>citrus clémentina</i> .....	4
<b>Figure 02 :</b> Anatomie de la clémentine .....	5
<b>Figure 03 :</b> Diagramme de classification des polyphénols .....	9
<b>Figure 04 :</b> Structure chimique de tanins hydrolysables (Gallotannins (1), Ellagitannins (2)) ..	13
<b>Figure 05 :</b> Structure chimique des tanins condensés .....	14
<b>Figure 06 :</b> Déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et antioxydants .....	15
<b>Figure 07 :</b> Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire .....	18
<b>Figure 08 :</b> Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique.....	20
<b>Figure 09 :</b> Antioxydants agissant en cascades oxydatives.....	22
<b>Figure 10 :</b> Piégeage des radicaux libres par les polyphénols pour former des molécules stables.....	22
<b>Figure 11 :</b> Piégeage des ERO (X•) par un noyau catéchol .....	24
<b>Figure 12 :</b> Sites possibles de la fixation de Fe <sup>3+</sup> aux cycles A et C des flavonoles. ....	25
<b>Figure 13 :</b> écorce séchée (à gauche) et écorce broyée et tamisée (à droite) .....	27
<b>Figure 14 :</b> Schématisation de l'appareil de SOXLHET .....	28
<b>Figure 15 :</b> Extraction par macération .....	29
<b>Figure 16 :</b> Evaporation des solvants dans le rota-vapeur.....	29
<b>Figure 17 :</b> Macération du tourteau à gauche, filtration après macération à droite .....	30
<b>Figure 18 :</b> Extraction liquide-liquide des citroflavonoïdes. ....	31
<b>Figure 19 :</b> (1) Test de cytotoxicité à différentes concentrations de tanin sur les globules rouges. (2) Test de cytotoxicité à différentes concentrations d'acide gallique sur les globules rouges.....	31
<b>Figure 20 :</b> Test de cytotoxicité des tanins et d'acide gallique à différentes concentrations dans la plaque ELIZA.....	32
<b>Figure 21 :</b> le réactif d'Ellman (DTNB) en présence de groupement thiol.....	33
<b>Figure 22 :</b> Effet de différentes concentrations de polyphénols combinés ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse .....	36

<b>Figure 23</b> : Effet de différentes concentrations de tanins combinées ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse .....	36
<b>Figure 24</b> : Effet des différentes concentrations des citroflavonoïdes sur la cytotoxicité des globules rouges .....	37
<b>Figure 25</b> : Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non au TBHP sur les teneurs en MDA .....	37
<b>Figure 26</b> : Effet de différentes concentrations des tanins combinées ou non au TBHP sur les teneurs du MDA érythrocytaire .....	38
<b>Figure 27</b> : Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non sur TBHP sur les teneurs en GSH.....	38
<b>Figure 28</b> : Effet de différentes concentrations des tanins combinées ou non au TBHP sur les teneurs du GSH érythrocytaire .....	39

## Liste des abréviations

**%** : pourcentage

**µg** : microgramme

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**AO** : antioxydant

**C°** : degré Celsius

**DTNB** : 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid

**EPH** : polyhydroxyl flavonoïdes

**EPM** : flavones polyméthoxylées

**ERO** : espèces réactives oxygénées

**FL** : flavonoïdes

**FL-O°** : radical flavonoxy

**g**: gramme

**GSH** : glutathion

**h** : heure

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**J** : jour

**Kcalories** : kilocalories

**KJoules** : kilojoules

**LDL**: Low Density Lipoprotein

**MDA** : malondialdéhyde

**mg**: milligramme

**ml** : millilitre

**Mm** : millimètre

**N°** : numéro

**nm** : nanomètre

**NO°** : monoxyde d'azote

**-O°** : radical anion superoxyde

**O<sub>2</sub>** : oxygène singulet

**OH°** : radical hydroxyle

**PBS** : phosphate buffered saline

**RL** : radical libre

**ROS** : espèces réactives oxygénées

**ROS**: reactive oxygen species

**SO**: stress oxydatif

**SOD** : superoxyde dismutase

**TBA** : acide thiobarbeturique

**TBHP** : tert butyl hydroperoxide

**Vit C** : acide ascorbique

**Vit E** : tocophérol

## Résumé

La clémentine (*Citrus clementina*) est un agrume de famille des rutacées du bassin méditerranéen. Ce fruit est recouvert par une écorce souple très riche en composés bioactifs tels que les polyphénols, citroflavonoïdes et les tanins connus par leurs activités antioxydantes. Ce travail a pour but de mettre en valeur l'activité antioxydante *in vitro* des polyphénols, des tanins et des citroflavonoïdes de l'écorce de la clémentine par le dosage des paramètres de stress oxydant : MDA et GSH. Nos résultats démontrent que les extraits d'écorce présentent une activité antioxydante très élevée. Les fortes concentrations en polyphénols (**2 ; 4**) mg/ml induisent une diminution des taux du MDA (**15 ; 12**) µmol/l. D'autre part, les faibles concentrations en polyphénols (**0,062**) mg/ml augmentent les teneurs en GSH. Par ailleurs, les faibles concentrations en tanins (**0,25 ; 0,125**) mg/ml augmentent les teneurs en GSH. Ces résultats démontrent l'activité antioxydante *in vitro* des polyphénols, des tanins et des citroflavonoïdes de l'écorce de la clémentine.

**Mot clés** : clémentine, polyphénols, tanins, citroflavonoïdes, MDA, GSH, stress oxydatif.

## **Abstract**

Clementine (*Citrus clementina*) is a citrus fruit from the Rutaceae family in the Mediterranean basin. This fruit is covered by a flexible rind very rich in bioactive compounds such as polyphenols, citroflavonoïds and tannins known for their antioxidant activities. The aim of this work is to highlight the antioxidant activity in vitro of polyphenols, tannins and citroflavonoïds in the bark of clementine by assaying the oxidative stress parameters: MDA and GSH. Our results show that the bark extracts exhibit very high antioxidant activity. The high concentrations of polyphenols (**2 ; 4**) mg/ml induce a decrease in the levels of MDA (**15 ; 12**) µmol/l. On the other hand, the low concentrations of polyphenols (**0.062**) mg/ml increase the levels of GSH. In addition, the low concentrations of tannins (**0.25; 0.125**) mg/ml increase the levels of GSH. These results demonstrate the antioxidant activity in vitro of polyphenols, tannins and citroflavonoïds in the bark of clementine.

**Keywords** : clementine, polyphenols, tannins, citroflavonoïds, MDA, GSH, oxidative stress.

## الملخص

الكليمنتين (*citrus clementina*) هي ثمرة من عائلة حمضيات rutaceae المتواجدة في حوض البحر الأبيض المتوسط. هذه الفاكهة مغطاة بقشرة مرنة غنية جدًا بالمركبات النشطة بيولوجيًا مثل البوليفينول، السيتروفلافونويدات و التانينات المعروفة بأنشطتها المضادة للأكسدة. الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على النشاط المضاد للأكسدة في المختبر من البوليفينول، التانينات والسيتروفلافونويد في لحاء الكليمنتين عن طريق تحديد معايير الإجهاد التأكسدي: MDA وGSH. تظهر نتائجنا أن مستخلصات اللحاء تظهر نشاطًا عاليًا جدًا في مضادات الأكسدة. التركيزات العالية من البوليفينول (2، 4) ملغ / مل تحفز انخفاض في مستويات MDA (15، 12) ميكرو لتر / لتر. من ناحية أخرى، فإن التركيزات المنخفضة من مادة البوليفينول (0.062) ملغ / مل تزيد من مستويات GSH. بالإضافة إلى ذلك، فإن التركيزات المنخفضة من التانينات (0.25؛ 0.125) ملغ / مل تزيد من مستويات GSH. توضح هذه النتائج النشاط المضاد للأكسدة في المختبر للبوليفينول، التانينات والسيتروفلافونويد في لحاء الكليمنتين.

الكلمات المفتاحية: كليمنتين، بوليفينول، حمض التانينات، سيتروفلافونويد، MDA، GSH، الإجهاد التأكسدي.





# ***Introduction***

Depuis quelques années de nombreuses recherches épidémiologiques suggèrent qu'il existe un lien entre l'alimentation et la santé, et plus précisément des effets positifs des fruits et légumes sur la prévention de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles divers cancers et des maladies cardiovasculaires **(Huang C.L & Sumpio B.E, 2008 ; Lalas S et al., 2011 ; Michaël et al., 2019)**.

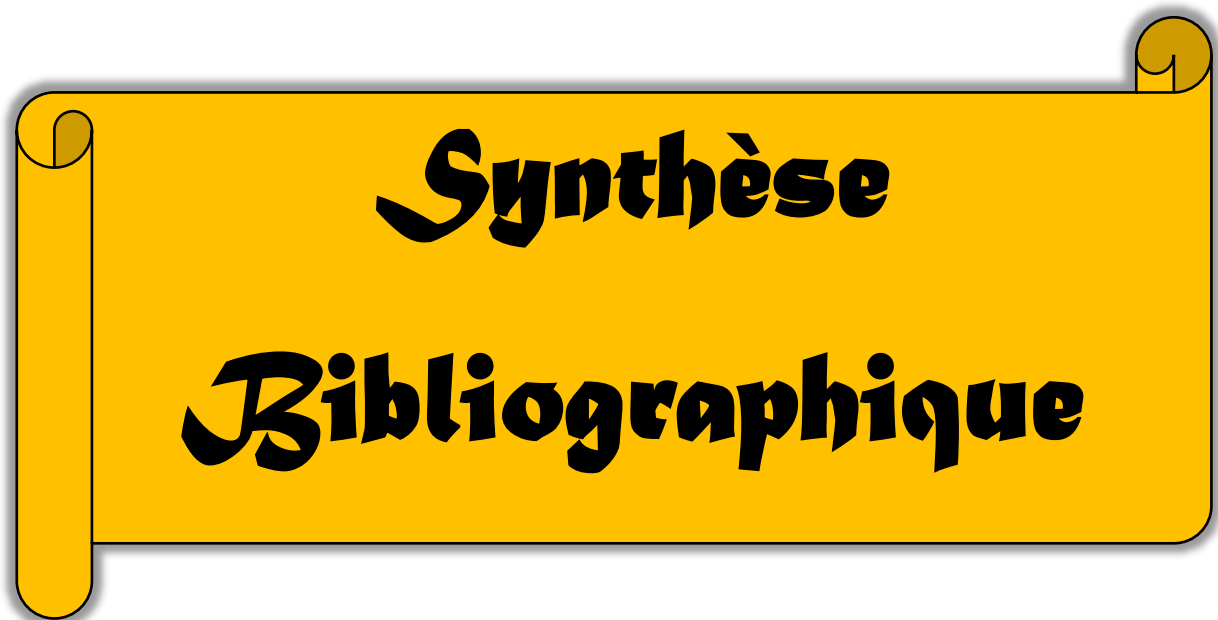
Pour cela un grand nombre de recherches sur différents fruits, y compris les agrumes. Les agrumes disposent de multiples composés bioactifs ayant des applications thérapeutiques **(Kim H et al., 2002)**. Parmi ces composés bioactifs à effet thérapeutique : les antioxydants occupent une place de choix. De multitude d'antioxydants sont synthétisés par l'organisme ou le plus souvent apportés par notre alimentation qui participent aux effets protecteurs **(Defraigne J.O & Pincemail J, 2008)**. Partie intégrante de l'alimentation humaine, Ils constituent un ensemble de molécules très répandues dans le règne végétal, en particulier chez les plantes supérieures où ils se retrouvent dans les racines, les feuilles, les fleurs et les fruits. D'autre part, ils possèdent un apport alimentaire total qui pourrait atteindre 1 g / j, ce qui est très élevé que celui de toutes les autres classes de composés phytochimiques et d'antioxydants alimentaires connus **(Sakakibara H et al., 2003 ; Augustin et al., 2005)**.

Les études épidémiologiques prouvent que la consommation de la clémentine peut protéger la santé contre différentes maladies grâce à leur richesse en diverses molécules antioxydants dont l'acides ascorbique, les caroténoïdes et les polyphénols **(Kim H et al., 2002)**. Suite à cette richesse, l'extraction des constituants phénoliques a considérablement attiré l'intérêt scientifique pour les utiliser comme des antioxydants naturels, conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique **(Ramful D et al., 2010)**. Les écorces de clémentine constituent un gisement riche en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels telle que les huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les flavonoïdes des écorces d'agrumes sont caractérisés par leurs activités antioxydants, thérapeutiques, antivirales, antifongiques et antibactériennes **(Ma Y et al., 2009 ; Huang Y.S & Ho S.C, 2010 ; Singh A et al., 2010)**.

L'étude sur les impacts des polyphénols alimentaires sur la santé humaine s'est développée au cours des 10 dernières années en particulier dans les pathologies dégénératives. Il est devenu clair que les modes d'action des polyphénols commencent par la modulation du stress oxydatif (**Augustin et al., 2005**).

Parmi ces composés phénoliques, les tanins sont présents dans les organelles cytoplasmiques des végétaux ayant des propriétés chimiques et physiques multiples (**Kriaa S & Thewis A, 1999 ; Piluzza G et al., 2013**). Les flavonoïdes sont aussi des composés phénoliques qui représentent des composants substantiels de la partie non énergétique de l'alimentation humaine. Ils ont été considérés initialement comme des substances sans aucun effet bénéfique pour la santé. Plus tard, il a été démontré qu'ils exercent de nombreux impacts biologiques selon leurs capacités antioxydantes et anti-radicalaires. Tandis que les résultats de différentes recherches aient démontrés que les flavonoïdes peuvent agir comme pro-oxydant à des doses très élevée. Ils ont par ailleurs des effets anti-inflammatoires, antiviraux ou anti-allergiques et un rôle protecteur dans les maladies cardiaques, le cancer et différentes maladies (**Martínez S et al., 2002**). Les citroflavonoïdes constituent une classe des polyphénols appartenant à la famille des agrumes (**Hennebelle, T et al., 2004**).

A la suite de toutes ces connaissances notre travail s'est orienté vers l'étude de l'impact des polyphénols, tanins et citroflavonoïdes de l'écorce de clémentine *in vitro* sur le stress oxydant par dosage des GSH et MDA.

A yellow scroll graphic with a black outline and a drop shadow, featuring the text 'Synthèse Bibliographique' in a bold, black, stylized font. The scroll is unrolled in the middle, with the top and bottom edges curled up.

**Synthèse**  
**Bibliographique**

**I. La clémentine****I.1. Définition**

La clémentine (*Citrus clémentina*) est un agrume, fruit du clémentinier, un arbre de la famille des rutacées. Issue du croisement d'une orange douce avec un mandarinier. Le fruit créé étant un hybride dont la multiplication est obtenue par greffage, cela explique que la clémentine soit presque dépourvue de pépins (**Luro F, 2015**). Le fruit est caractérisé par une peau brillante, couleur orange à rougeâtre, finement granulée, ayant une épaisseur qui varie selon les clones de 2.5 à 4.5 mm. La pulpe est riche en jus, tendre et parfumée. Les fruits sont d'un poids moyen de 60g (**Trabut L, 1926**).



**Figure 01** : Photographie du fruit citrus clémentina (**Luro F, 2015**).

**I.2. Historique et origine géographique de la clémentine**

La clémentine est actuellement l'agrume phare de la zone méditerranéenne où elle naquit vers la fin du XIXe du côté d'Oran en Algérie. Son histoire commença précisément dans les vergers de l'orphelinat de Misserghin, où le père Clément (Vincent Rodier, 1829-1904) fit des semis de graines de mandariniers. Quelques années plus tard, parmi les arbres issus de ces semis, on attira son attention et celle probablement des enfants de l'orphelinat sur les fruits de l'un d'entre eux remarquables par la qualité acidulée et la précocité de maturité. Plus tard au début du XXe en hommage à son découvreur cet arbre fut nommé Clémentinier et ses fruits clémentine (**Luro F, 2015**).

### I.3. Systématique

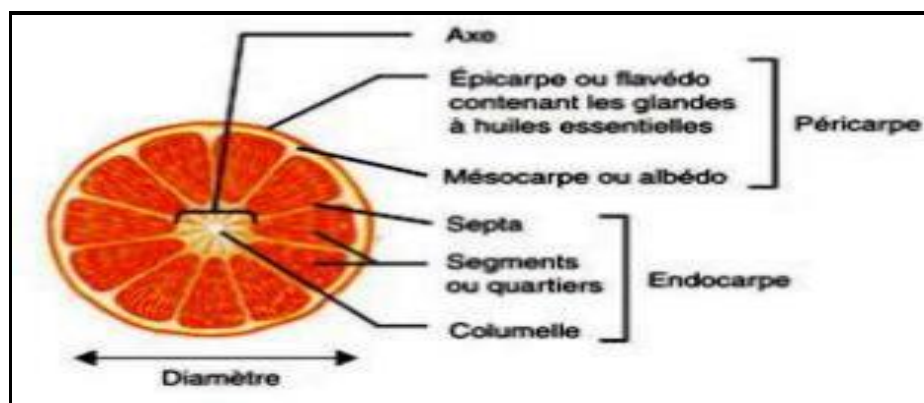
La systématique de clémentine est représentée dans le tableau suivant :

**Tableau n°01** : Classification botanique de clémentine (Milind D & Dev C, 2012).

<b>Espèce</b>	Citrus clementina
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous-classe</b>	Rosidæ
<b>Ordre</b>	Sapindales
<b>Famille</b>	Rutaceæ

### I.4. Morphologie de la clémentine

D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits charnus de type baie avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées (Duan L *et al.*, 2014).



**Figure 02** : Anatomie de la clémentine (Curk F, 2013).

- ❖ L'épicarpe appelé flavédo, c'est la couche extérieure colorée, elle comprend plusieurs poches sécrétrices d'huiles essentielles (Tripoli E *et al.*, 2007).
- ❖ Le mésocarpe appelé albédo, c'est la couche intérieure blanche et spongieuse riche en pectine. La combinaison flavédo et albédo est appelée péricarpe, communément connue sous le nom d'écorce (Salunkhe D.K & Kadam S, 1995 ; Tripoli E *et al.*, 2007).
- ❖ L'endocarpe (pulpe), c'est la partie comestible, elle est composée des segments, recouverts par une membrane mince, les segments sont composés de vésicules de jus recouvertes par les membranes plus fines et contiennent les cellules de jus (Salunkhe D.K & Kadam S, 1995 ; Tripoli E *et al.*, 2007).

### I.5. Composition chimique de la clémentine

Une clémentine contient 12% de glucides et 87% d'eau et des quantités négligeables de lipides et de protéines. Il contient des composés chimiques naturels comme les vitamines, les oligoéléments et les fibres, la composition chimique de la clémentine présentée dans (tableau 02).

**Tableau n°02** : Valeur nutritive de la clémentine (Di Taranto C.D.G & di Calabria C, 2016).









Composants	Quantité	Composants	Quantité
Eau	86.58 g	Provitamine A	0,3 mg
Glucides	12.02 g	Vitamine E	0,20 mg
Protides	0.85 g	Potassium	145 mg
Lipides	0,15 g	Calcium	26 mg
Fibres	1,7 g	Magnésium	10 mg
L'apport calorique	47kcalories	Fer	0,35 mg
Vitamine C	48.8 mg	Vitamine B8	1 µg
Vitamine B9	24 µg	Vitamine B3	0,3 mg
Sodium	1 mg	Vitamine B6	0.075 mg

La clémentine offre une quantité importante de vitamine C, mais sont également sources de vitamines du groupe B et de provitamine A. moyennement énergétiques, Elle est également source de minéraux et d'oligo-éléments : calcium, potassium, phosphore, magnésium, fer et cuivre. L'effet thérapeutique de ces aliments revient à leurs composants très bénéfiques pour la santé humaine (Luro F, 2015).

I.6. Variétés de clémentine

Les principales variétés de la clémentine sont présentées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau n°03** : Caractéristiques de quelques types de clémentine.

<p><b>La clémentine Nules</b></p>	<p>Est un mutant naturel de la clémentine 'Fina', apparu en 1953 dans un verger du village de Nules, dans la région de Castellon en Espagne <b>(Chahidi, B et al., 2008)</b>.</p>	
<p><b>La clémentine Hernandina</b></p>	<p>Peau mince très fine, pratiquement sans pépins, écorce orange foncé, pousse dans les vergers espagnols <b>(Habchi R &amp; Alachaher N, 2017)</b>.</p>	
<p><b>La clémentine Nour</b></p>	<p>Cultivé au Maroc, écorce rugueuse qui se détache facilement, saveur doucement sucrée <b>(Habchi R &amp; Alachaher N, 2017)</b>.</p>	
<p><b>La clémentine caffin</b></p>	<p>De couleur rouge vif tendant vers le rouge, très juteuse, gout acidulé, peu ou pas de pépins, trouvé dans la région Azemour, au Maroc <b>(Chahidi, B et al., 2008)</b>.</p>	
<p><b>La clémentine Marisol</b></p>	<p>Issues par une mutation spontanée de clémentine Oroval découverte dans Bechí (Castellón) en 1970 <b>(Aderdour, T et al., 2015 ; Habchi R &amp; Alachaher N, 2017)</b>.</p>	
<p><b>La clémentine de corse</b></p>	<p>C'est un petit fruit bien rond avec au moins deux feuilles attachées. Sa chair est acidulée et son parfum délicat <b>(Habchi R &amp; Alachaher N, 2017)</b>.</p>	
<p><b>La clémentine Guerdane</b></p>	<p>C'est un mutant détecté sur un arbre de la clémentine en 1987 dans le Sud du Maroc. Il a été récemment enregistré dans le catalogue national <b>(Chahidi, B et al., 2008)</b>.</p>	
<p><b>La clémentine Oroval</b></p>	<p>Elle est produite en Espagne. Ce fruit est plutôt gros et précoce et son goût légèrement acide <b>(Habchi R &amp; Alachaher N, 2017)</b>.</p>	



**I.7. Bienfaits nutritionnels de la clémentine**

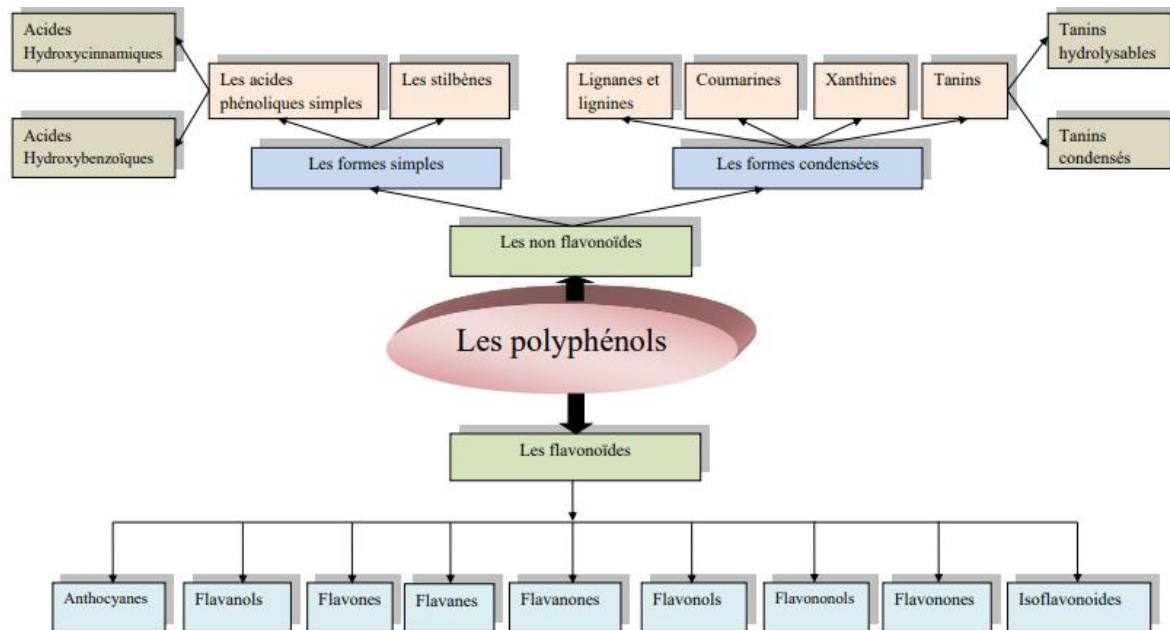
Comme les autres agrumes, la clémentine pourrait aider à prévenir de nombreux cancers, en particulier ceux : du côlon, l'estomac, pharynx, l'œsophage, la bouche grâce aux effets protecteurs de la vitamine C et les citroflavonoïdes qui ont démontrés qu'ils pouvaient ralentir la prolifération de plusieurs lignées de cellules cancéreuses et diminuer la croissance des métastases. Ces propriétés pourraient servir à l'élaboration de thérapies antitumorales. La clémentine est également très utile pour se protéger contre les maladies cardiovasculaires grâce aux flavonoïdes en équilibrant le bilan lipidique. Réduire des troubles cardiaques grâce aux vitamines B, aussi diminuer le taux de LDL (mauvais cholestérol), lutter contre les crampes et l'arthrose, car le potassium est l'élément minéral qui est présent en plus grande quantité dans la clémentine. Soulager les douleurs menstruelles, favoriser le transit intestinal, permet la protection de système immunitaire par la vitamine C, renforcer les os et réduire le risque d'ostéoporose par la présence des caroténoïdes. La vitamine A que contient la clémentine est un rempart contre la dégradation des fonctions visuelles. Comme la régénération des cellules de la peau car la clémentine est riche en vitamine E (**Sagee et al., 1996 ; Sonia A & Lemya B, 2020 ; Zineb B & Khadidja B, 2020**).

**II. Les composés phénoliques de la clémentine****II.1. Généralités sur les polyphénols**

C'est une catégorie des molécules organiques hydrosolubles biologiquement actives, largement répandues dans la règne végétal (nombreuses plantes médicinales et comestibles qui représentent les sources alimentaires, y compris les fruits, les légumes, les boissons comme le thé et le vin rouge et huile extra vierge, connues par leurs propriétés antioxydants (**Parrella, E et al., 2021**). Ils sont composés d'un assemblage des petites molécules, les phénols, possédant un ou plusieurs cycles benzéniques qui portent un ou plusieurs fonctions hydroxyles liées (**Belščak-Cvitanović, A et al., 2018**). Ces composés sont synthétisés par les plantes au cours du développement normal que dans les conditions de stress. Chez les végétaux, ils participent dans le développement, la reproduction, la croissance cellulaire, la différenciation, l'organogenèse, la floraison et la lignification, protègent contre les infections microbiennes ou les animaux herbivores, ou attirent les pollinisateurs. D'autre part, la teneur des végétaux en composés phénoliques est très variable en fonction de plusieurs paramètres génétiques, physiologiques et environnementaux (**Rejeb I, 2008 ; Parrella, E et al., 2021**).

### II.1.1. Classification des polyphénols

Les polyphénols sont classés sur la base du nombre de noyaux phénoliques et des éléments structuraux qui lient les noyaux l'un à l'autre, comprenant les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes, les curcuminoïdes, lignanes, ellagitannins et acide ellagique, coumarine et les tanins (Rejeb I, 2008 ; Kumar, H *et al.*, 2015). Cette classification est représentée dans la figure 03.



**Figure 03** : Diagramme de classification des polyphénols (Macheix, J *et al.*, 2005 ; Stalikas D, 2007 ; Kumar, H *et al.*, 2015).

### II.1.2. Propriétés biologiques des polyphénols

Des études récentes soutiennent que les polyphénols contribuent à prévenir les maladies cardiovasculaires, le cancer et l'ostéoporose, et suggèrent un rôle dans la prévention des maladies neuro-dégénératives et du diabète (Athamena S, 2009).

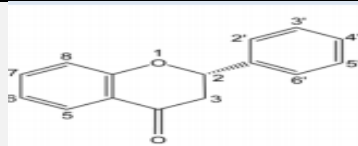
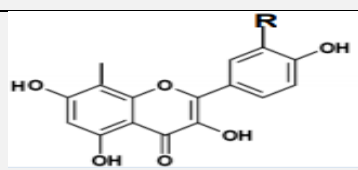
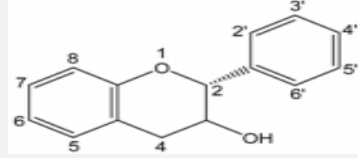
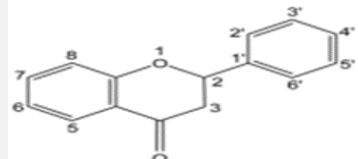
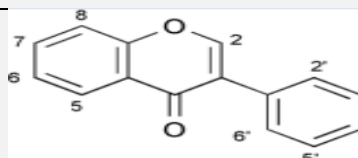
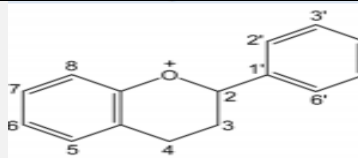
### II.2. Généralités sur les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés poly-phénoliques qui partagent un squelette basique de quinze atomes de carbone, avec deux cycles aromatiques reliés par une chaîne linéaire à trois atomes de carbone (Rufino, A. T *et al.*, 2021). Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, ils sont particulièrement présents dans l'épiderme des feuilles ainsi que dans la peau des fruits et donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune foncé (Lillo & Peter, 2008).

II.2.1. Classification des flavonoïdes

Selon la structure et l'état d'oxydation du noyau central C, les flavonoïdes comprennent les classes suivantes : les flavanones, les flavones, les flavanols (catéchines), les flavonols, les flavanonols, les isoflavones, et les anthocyanines (Arrabi, P *et al.*, 2004 ; Dai & Mumper, 2010).

Tableau n°04 : Les principales classes des flavonoïdes (Lila & Safia, 2017).

Les classes de flavonoïdes	Structure chimique	Exemple
Les flavanones		Naringénine, Naringine, Hesperitine, Hesperidine, Eriodictyol
Les Flavonols		Quercétine, Kaempferol, Galangine, Fisetine, Myricétine, Sorhamnetine
Flavan 3 ols ou Flavanols		Catéchine, Epicatechine
Flavones		Chryisine, Apgenine, luteoline, Eupaline, Balcalin
Isoflavones		Genisteine, Genistine, Daidzeine, Daidzine, Ononine
Les anthocyanines		Cyanidine, Cyanine, Peonidine, Delphinidine, Pelargonidine, Malvidine, Delphinidine.

**II.2.2. Les citroflavonoïdes**

Les citroflavonoïdes sont des composés poly-phénoliques de la famille des flavonoïdes que l'on trouve spécifiquement dans l'écorce des agrumes. Ils sont classés comme :

Les flavanones, les glycosides de flavanones et les flavones poly-méthoxylées (FPM), qui sont physiologiquement très actifs. Ces FPM sont représentés par la nobiletine, la tangerétine, la sinesetine, la 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone et la 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxyflavone. Et aussi les polyhydroxyl flavonoïdes (FPH) qui sont représentés par l'hespéridine, la neohespéridine et la naringine qui sont des glycosides de flavanones (**Evans et al., 2012 ; Karsheva et al., 2013 ; Dong, H et al., 2014 ; Gosslau et al., 2014 ; Nakajima V et al., 2014 ; Rawson, N et al., 2014 ; Rafiq et al., 2016**). Telle que la quercétine, la rutine, l'orange et le limonène. Ces pigments sont capables de neutraliser les radicaux libres. Ce sont des antioxydants qui améliorent l'absorption de la vitamine C ; la capacité antioxydante de la quercétine est cinq fois plus élevée que celle des vitamines E et C. possédants aussi des propriétés anti-inflammatoires et antitumorales (**Edeas M, 2007 ; Bouchachia A, 2017**).

L'action des citroflavonoïdes caractérisé par une protection contre l'oxydation de la vitamine C, un renforcement de la paroi des capillaires et une diminution de perméabilité du tissu élastique des artères et capillaire telle que des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, anticancéreuses (**Huet R, 1962**).

**II.2.3. Les citroflavonoïdes de la clémentine**

Les flavonoïdes de clémentine ont un large spectre d'activités biologiques incluant les activités antibactérienne, antifongique, antivirale, anticancéreuse et antidiabétique (**Hamideche L & Nacer Cherif S, 2016**).

**Tableau n°05 :** Propriétés fonctionnelles et domaines d'utilisation de quelques citroflavonoïdes de l'écorce de clémentine (Ghedira K, 2005 ; M'Hiri N, 2015 ; Hamideche L & Nacer Cherif S, 2016).

<b>Composés</b>	<b>Propriétés</b>	<b>Applications</b>
<b>Hespéridine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité antivirale</li> <li>- Activité antimicrobienne modérée contre Salmonella typhi et S. typhimurium.</li> <li>- Activité antiallergique via l'inhibition de la libération de l'histamine.</li> <li>- Réduction du risque du cancer du tube digestif.</li> <li>- Activité sédatrice.</li> <li>- Activité hypoglycémiant par la régulation du métabolisme du glucose.</li> <li>- Atténuation des anomalies de la rétine et du plasma.</li> <li>- Activité anti-obésité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Préparations pharmaceutiques.</li> </ul>
<b>Eriocitrine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisé dans plusieurs complexes multivitaminés.</li> <li>- Maintien de l'intégrité et de la circulation périphérique.</li> <li>- Stabilité élevée durant le traitement et le stockage.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Industrie agro-alimentaire.</li> </ul>
<b>Nobiletine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité anti-inflammatoire : activation de l'énergie vitale, la circulation sanguine et disperse la stagnation physique.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Préparations pharmaceutiques.</li> </ul>
<b>Quercétine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La quercétine possède des vertus anti-allergènes via le blocage de la libération d'histamine dans la circulation sanguine.</li> <li>- la quercétine améliore la tension et les maladies cardiovasculaires, en diminuant l'hypertrophie cardiaque et rénale qui fait suite à l'hypertension.</li> <li>- La quercétine est capable de prévenir et de traiter le cancer par induction de l'apoptose cellulaire. D'une part, par ses fonctions antioxydantes.</li> <li>- Les effets anti-inflammatoires de la quercétine impliquent plusieurs voies de signalisation</li> <li>- Anti-diabète et obésité, Anti bactériennes et antifongiques, Antiviraux.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Préparations pharmaceutiques.</li> </ul>

### II.3. Généralités sur les tanins

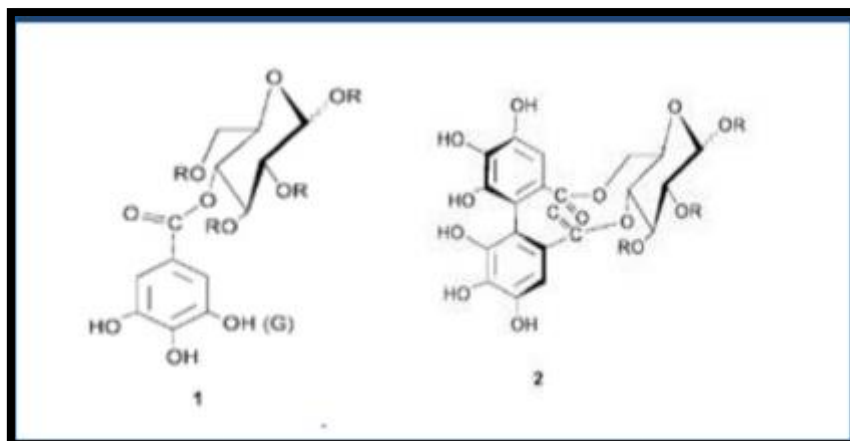
Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones. Ils ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 Dalton (3000 pour les structures les plus complexes) (Khenafou K, 2017).

#### II.3.1. Classification des tanins

Généralement les tanins sont subdivisés en deux groupes en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule (Khanbabaee K & Van Ree T, 2001).

##### II.3.1.1. Les tanins hydrolysables

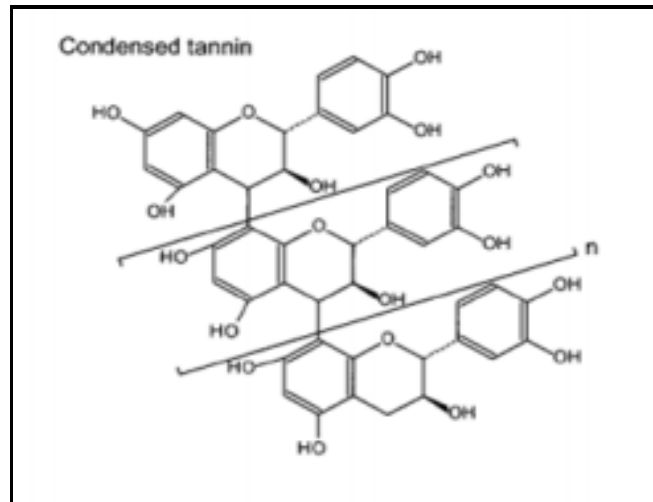
Les tanins hydrolysables (HT) sont des esters de sucre simple et d'acide phénolique. Lorsqu'ils sont hydrolysés, les acides phénoliques produits sont soit de l'acide gallique soit de l'acide éllagique (Warnimont M, 2018).



**Figure 04** : Structure chimique de tanins hydrolysables (Gallotannins (1), Ellagitannins (2)) (Khanbabaee K & Van Ree T, 2001).

##### II.3.1.2. Les tanins condensés

Les tanins condensés appelés aussi pro-anthocyanidines ou pro-cyanidines, se sont des composés qui ne contiennent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavoniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone (Bruneton, 1999). Ils sont résistants à l'hydrolyse et seules d'attaques fortes permettent de les dégrader (Macheix, J et al., 2005).



**Figure 05** : Structure chimique des tanins condensés (Mcmahon *et al.*, 2000).

### II.3.2. Propriétés biologiques des tanins de clémentine

Comme les autres types de polyphénols, les tannins sont aussi répandus pour leurs nombreuses activités thérapeutiques notamment ; anti- infectieuses, cardiovasculaires et anticancéreuses (Benfdila T & Ingrachen N, 2018). Parmi les principaux tanins de clémentine :

- ❖ L'acide gallique a des propriétés pharmacologiques, car il est attribué à des potentiels antioxydants et anti-inflammatoires. En outre, il est impliqué dans diverses voies de signalisation qui régulent le large éventail de fonctions biologiques, y compris les voies pro et inflammatoires, la voie de signalisation NO, les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose. L'acide gallique et ses dérivés ont démontrés un large éventail d'effets bénéfiques dans la prévention et / ou la gestion de plusieurs troubles, ainsi que leurs profils de sécurité et de stabilité acceptables, en font des options importantes à introduire comme compléments alimentaires (Kahkeshani, N *et al.*, 2019).
- ❖ Un niveau relativement élevé de catéchines dans l'alimentation humaine est souvent corrélé à un risque réduit de maladies chroniques courantes telles que le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Les effets bénéfiques des catéchines sur la santé sont principalement attribués à leur activité antioxydante (Muzolf-Panek, M *et al.*, 2012).

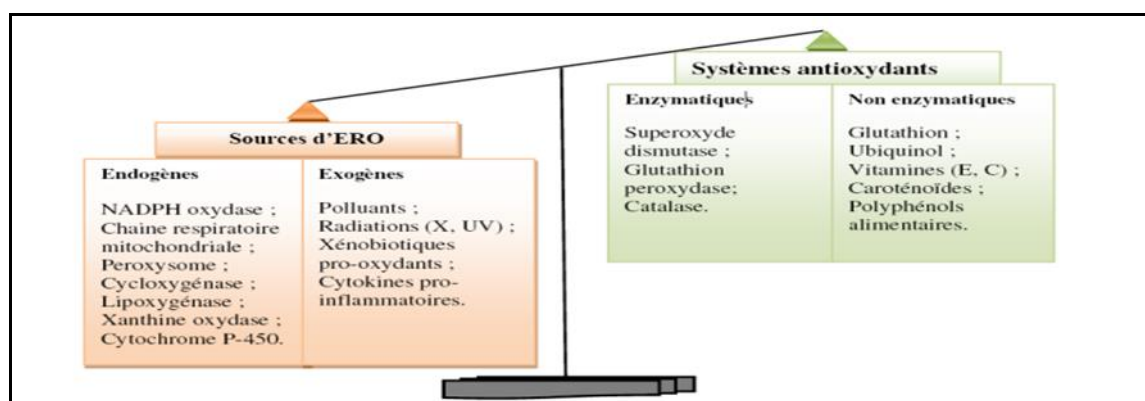
### III. Stress oxydatif

#### III.1. Définition

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydants de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles. Le stress oxydatif est un fonctionnement de l'organisme qui est normal tant qu'il ne dépasse pas certaines limites. En effet, tous les organismes vivants qui consomment de l'oxygène produisent des radicaux libres qui sont de petites substances chimiques très oxydées par le contact avec l'oxygène, et dont nos cellules savent normalement très bien se débarrasser. Le stress oxydatif devient anormal lorsque les cellules sont soit dépassées par la quantité de radicaux libres à éliminer, soit ne disposent pas de ressources antioxydants (vitamines, oligoéléments, enzymes) suffisantes pour les éliminer (Chu, W L *et al.*, 2010).

Les ERO sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables, leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre (Migdal C & Serres M, 2011).

Cependant cette homéostasie redox peut être rompue, c'est-à-dire que l'oxydation dépasse les systèmes antioxydants (figure 06), soit par une production excessive d'ERO, soit par une diminution des capacités antioxydantes, on parle alors de stress oxydatif (Rahman, T *et al.*, 2012 ; Barhe A & Tchouya G.R.F, 2016).



**Figure 06** : Déséquilibre de la balance entre pro-oxydants et antioxydants (Rahman, T *et al.*, 2012).



**III.2. Radicaux libres**

Les radicaux libres sont des espèces chimiquement instables (Milane H, 2004 ; Savard S, 2005), leur durée de vie est généralement très courte (Koechlin C, 2006).

Un radical libre se définit comme toute molécule ou fragment d'une molécule possédant au moins un électron non apparié (célibataire) sur son orbitale externe. Sous l'effet de nombreuses actions, comme les rayons solaires ou les polluants, des atomes de notre corps perdent ou gagnent des électrons. Ils deviennent alors des radicaux libres, molécules très instables et dangereuses pour nos cellules. Quand un atome perd un électron, il en prend un chez un atome voisin, lequel perpétue à son tour le déséquilibre. Il y a donc un enchaînement sans fin de formation de radicaux libres.

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie qui s'appellent « radicaux primaires ». Les autres radicaux libres, dits « radicaux secondaires », se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels le radical anion superoxyde- $O_2^\bullet$ , le radical hydroxyle  $OH^\bullet$  (Januel C, 2003) ou de l'azote tel le radical monoxyde d'azote ( $NO^\bullet$ ) (Favier A, 2003). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ), ne sont pas des radicaux libres mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (Scheibmier, H *et al.*, 2005). L'ensemble de ces radicaux est souvent appelé « espèces réactives de l'oxygène : ERO » (ROS en anglais pour Reactive Oxygen Species) (Favier A, 2003 ; Oktay, M *et al.*, 2003) (tableau n°06).

**Dr. Denham Harman** (1970) (chimiste, biologiste et médecin gériatologue) a proposé la théorie radicalaire du vieillissement qui propose que les organismes vieillissent par la multiplication des lésions provoquées par l'accumulation de radicaux libres dans les cellules. Plusieurs maladies chroniques sont dues à l'oxydation, qui est un élément majeur de leur physiopathologie et d'étiologie de maladies dégénératives telles que le cancer, l'athérosclérose et les maladies de l'inflammation chronique (la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiaques, l'hypertension, le diabète sucré et le

vieillessement) (Everette, J *et al.*, 2012 ; Pavithra, G *et al.*, 2013 ; Teh, S *et al.*, 2014 ; Kamel, Z *et al.*, 2015).

**Tableau n°06** : Les principales espèces réactives de l'oxygène (Fiorucci S, 2006).

ROS	Formule chimique
Radical anion superoxyde	$\cdot\text{O}_2^-$
Peroxyde d'hydrogène	$\text{H}_2\text{O}_2$
Trioxygène moléculaire (l'ozone)	$\text{O}_3$
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Radical hydroxyle	$\text{OH}^\bullet$
Radical hydroperoxyde	$\text{HOO}^\bullet$
Radical peroxyde	$\text{ROO}^\bullet$
Peroxyde et hydroperoxyde	ROOR et ROOH
Radical alkoxyde	$\text{RO}^\bullet$
Radical oxyde nitrique	$^\bullet\text{NO}$
Peroxynitrite	$\text{ONOO}^\bullet$
Hypochlorite	$\text{ClO}^-$

### III.3. Conséquences biologiques de stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, et des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des autoanticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (Nafia, I *et al.*, 2005 ; Boots, A *et al.*, 2008).

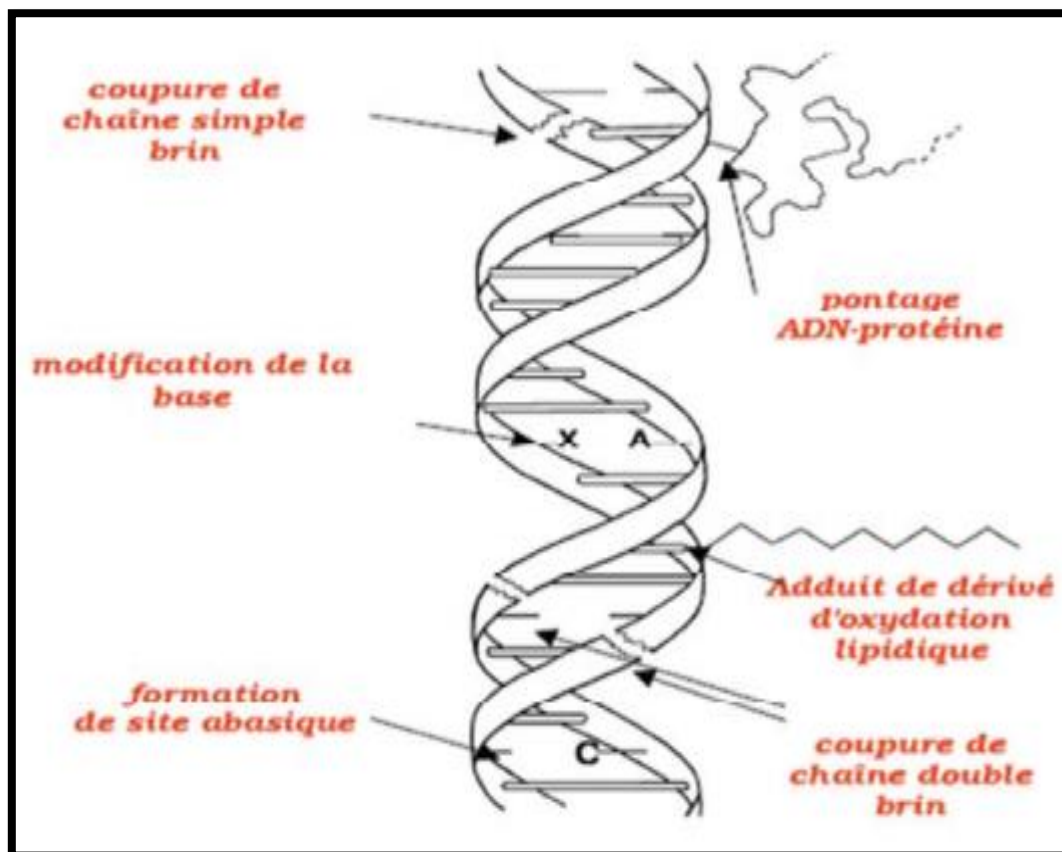
Le stress oxydant a comme conséquences :

❖ L'oxydation des protéines : ces dernières sont les constituants les plus abondants, ce qui en fait des cibles importantes pour les ERO, la modification d'une seule protéine peut conduire à une modification de son activité biologique, le radical hydroxyle est le plus efficace pour induire des dommages aux protéines oxydantes, le processus d'oxydation des protéines introduit fréquemment de nouveaux groupes fonctionnels tels que les hydrolyses et les

carbonyles, qui contribuent à altérer la fonction, le renouvellement et la dégradation. Les effets secondaires comprennent la fragmentation des protéines, la réticulation et le déploiement (Kruidenier L & Verspaget H, 2000).

❖ L'oxydation des acides nucléiques entraîne des modifications des bases azotées, des fragmentations de l'ADN, des ruptures des brins ou à des pontages entre des bases altérant ainsi l'expression génétique (Cooke, M *et al.*, 2003) (figure 07).

❖ La peroxydation lipidique s'accélère uniquement lorsque le système cellulaire de désintoxication n'ont pas réussi à éliminer les précurseurs de l' $\text{HO}\bullet$ , en particulier  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La peroxydation lipidique est plus efficacement combattue par les antioxydants liposolubles tels que la vitamine E (Kruidenier, L *et al.*, 2000).



**Figure 07** : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (Cadet, J *et al.*, 2002).

Une alimentation riche en fruits et en légumes est universellement considérée comme un facteur protecteur contre les maladies chroniques, tel que les maladies cardiovasculaires, et certains cancers, L'apport d'une quantité suffisante d'antioxydants tels que les polyphénols et

les caroténoïdes présents dans les fruits et légumes neutralisent les radicaux libres, et préviennent des maladies dégénératives (**Pavithra, G et al., 2013 ; Everette, J et al., 2014**).

#### **III.4. Défense de l'organisme contre le stress oxydatif**

Pour contourner les dommages causés par les ROS, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants. Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (**Halliwell B & Gutteridge J, 2007**). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (**Tang S & Halliwell B ,2010**). Ils possèdent des capacités telles que le piégeage des radicaux libres, la réduction de l'activité enzymatique (pro-oxydante), la chélation des métaux pro-oxydants, l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'extinction de l'oxygène singulet (**Teh, S et al., 2014 ; Omoba, O et al., 2015**).

On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation exogène sous forme de fruits et légumes riches en vitamine C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque. L'autre est endogène et se compose d'enzymes (super oxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ; de protéine (ferritine, transferrine, céruloplasmine, albumine) et des oligoéléments comme le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes anti oxydantes (**Haleng J, 2007**). Les réactions enzymatiques et non enzymatiques se produisent constamment dans les cellules à la suite de la formation de radicaux libres (**Teh, S et al., 2014**).

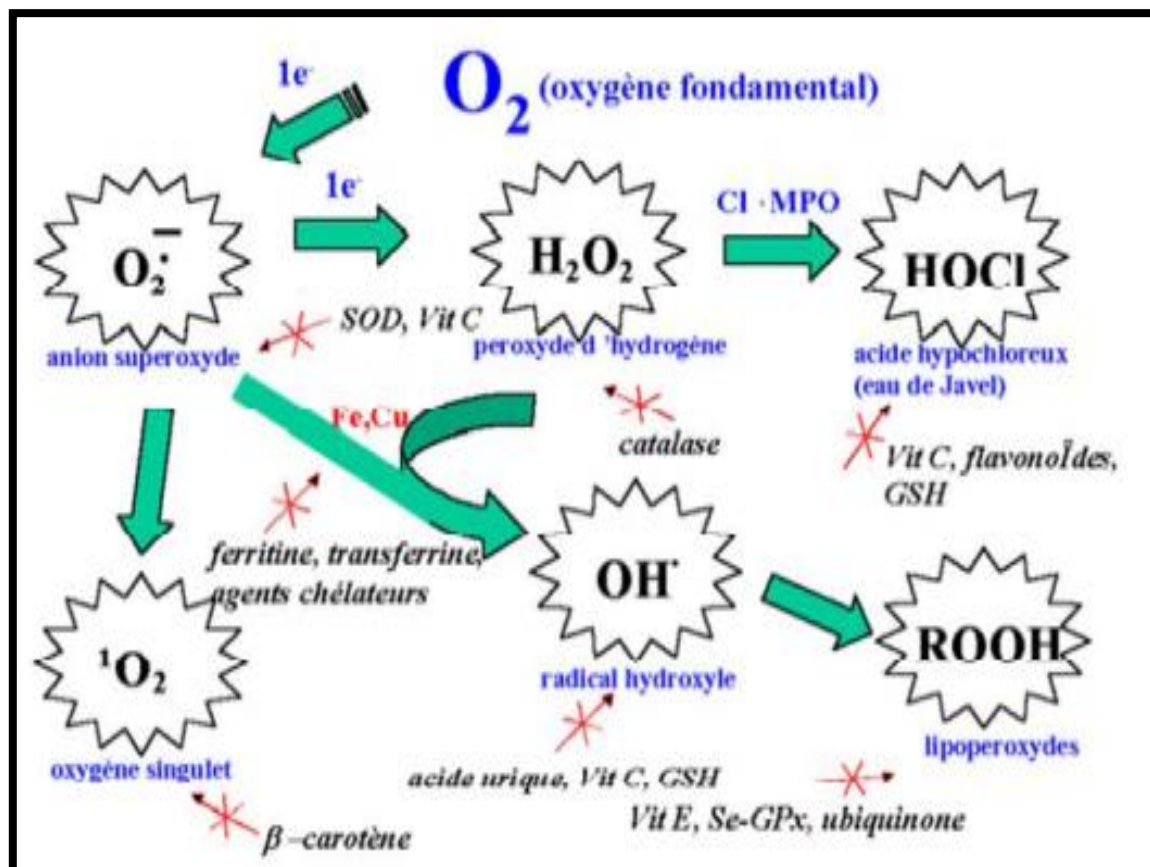
##### **III.4.1. Antioxydants (naturels non enzymatiques)**

Ils incluent des espèces chimiques différentes (composés phénoliques, vitamines, Les caroténoïdes etc....). La plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ROS (**Soares M, 2005**). Qui sont d'origine végétale pour la plupart (**Berger M, 2005**).

Les piègeurs des ROS agissent en piégeant les radicaux libres et en captant les électrons célibataires, les transformant en molécules ou ions stables. Le piègeur va devenir un radical libre, puis soit détruit, soit régénéré par un autre système (**Favier A, 2003**).

## III.4.2. Antioxydants enzymatiques

Les superoxydes dismutases (SOD) sont une classe d'enzymes apparentées qui catalysent la dégradation de l'anion superoxyde en  $O_2$  et  $H_2O_2$ . Les cellules humaines possèdent une enzyme SOD mitochondriale ayant le manganèse dans son site actif (MnSOD) ainsi qu'une enzyme SOD cytosolique et une SOD extracellulaire ayant le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD) comme coenzymes (**Favier A, 2003**). Due à sa relative stabilité, le  $H_2O_2$  produit par les SOD est régulé enzymatiquement par les catalases et les peroxydases. Les catalases sont des enzymes localisées dans les peroxysomes et catalysent la conversion du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . Tandis que les glutathion peroxydases éliminent le  $H_2O_2$  par son utilisation dans l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) et requièrent le sélénium dans leur site actif pour cette activité (**figure 08**).



**Figure 08** : Espèces réactives oxygénées et systèmes de protection permettant de limiter leur effet toxique. GSH : glutathion,  $Cl^-$  : anion chlorure, MPO : myéloperoxydase, SOD : superoxyde dismutase, Se-GPx : glutathion peroxydase séléno-dépendante (**Pincemil, J et al., 1999**).

**III.4.3. Antioxydants synthétiques**

Les plus utilisés dans l'industrie agroalimentaire ce sont des composés avec des structures phénoliques de divers degrés de substitution d'alkyle. L'hydroxyanisole butylé (BHA) et L'hydroxytoluène butylé (BHT) sont les plus couramment utilisés (**Edziri, H *et al.*, 2012 ; Shalaby E & Shanab S 2013 ; Kamel, Z *et al.*, 2015 ; Omoba, O *et al.*, 2015**).

**III.4.4. Mécanismes d'action des antioxydants**

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition, Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

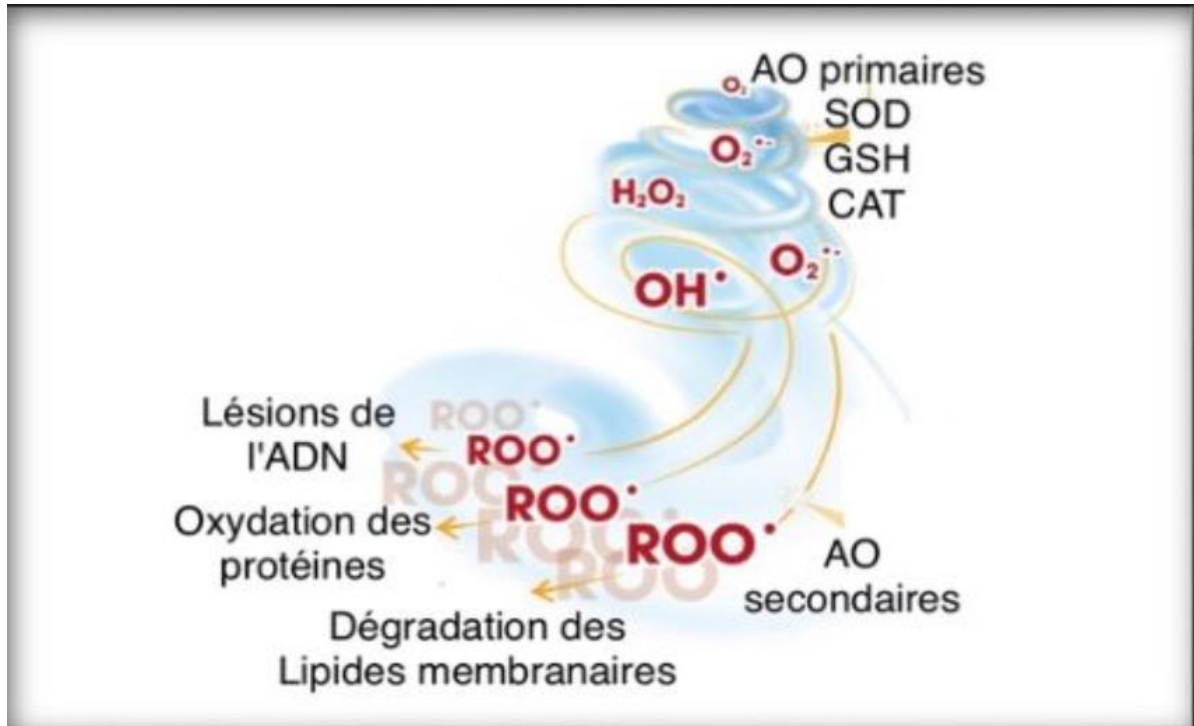
- ❖ **Système de défense primaire** : comme la catalase, le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- ❖ **Système de défense secondaire** : à titre exemple les tocophérols, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants (briseurs) de la chaîne radicalaire bloquant ainsi les réactions de propagation (**Ryma L, 2016**).

**IV. Modes d'action des polyphénols dans la défense antioxydante**

Les polyphénols participent aux réactions de défense de végétaux et de certains microorganismes face à différentes situations oxydatives. Ils sont donc naturellement présents en forte quantité dans les végétaux. Seuls les végétaux et certains types de microorganismes sont capables de les synthétiser. Chez l'homme, les polyphénols ne sont pas synthétisés et doivent être apportés par l'alimentation.

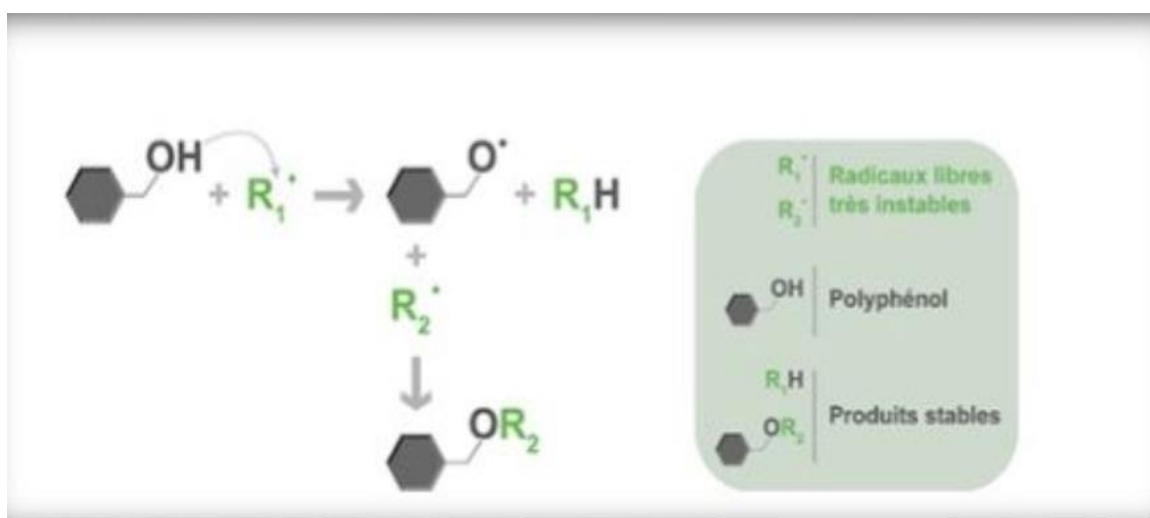
Les propriétés antioxydantes des polyphénols, en particulier les flavonoïdes et les acides phénoliques, (**Klimczak, I *et al.*, 2007 ; Atrouz O, 2009 ; Simone, S *et al.*, 2016**) sont principalement attribuables à leurs propriétés redox. Ce qui leur permet d'agir comme agents réducteurs par don d'électron ou d'hydrogène et inhibiteurs d'oxygène singulet, ou due à la complexation avec des espèces oxydantes, notamment le peroxyde ; en rompant et neutralisant sa chaîne de formation, permettant ainsi d'empêcher l'oxydation des LDL (**Fejie A & Cavar S, 2014 ; Kamel, Z *et al.*, 2015 ; Alam, M *et al.*, 2016**).

Les polyphénols sont ce qu'on appelle des antioxydants secondaires, agissant au milieu de la cascade oxydative. Ils ont une action complémentaire aux antioxydants primaires, tels que la SOD, la glutathion peroxydase et la catalase (Voir figure ci-dessous).



**Figure 09** : Antioxydants agissant en cascades oxydatives (Xavier Leverage, 2009).

Les polyphénols sont capables de piéger directement les radicaux libres pour former des molécules stables (voir figure ci-dessous).



**Figure 10** : Piégeage des radicaux libres par les polyphénols pour former des molécules stables (Xavier Leverage, 2009).

Un polyphénol peut donc supprimer à lui seul plusieurs radicaux libres. Les produits formés lors de ces réactions sont inoffensifs et sont facilement éliminés par le corps. Les polyphénols exercent leur pouvoir antioxydant d'autres manières, qui permettent :

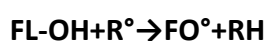
- ❖ L'augmentation de la capacité antioxydante de l'organisme par un effet d'épargne des autres antioxydants endogènes comme par exemple la vitamine E.
- ❖ La neutralisation d'un certain nombre de métaux (fer et cuivre principalement), impliqués dans la production d'ions superoxydes, de puissants radicaux libres.
- ❖ Des effets anti-inflammatoires et antiprolifératifs.

### **V. Mécanisme d'action des flavonoïdes contre les ROS**

L'activité antioxydante des flavonoïdes peut prendre plusieurs formes dans la régulation du stress oxydatif, vis-à-vis des effets délétères des radicaux libres. Ces composants peuvent intervenir en captant directement les radicaux libres, ou inhibant les enzymes responsables de la génération des ROS.

La structure chimique des flavonoïdes leur confère la capacité de fixer directement les radicaux libres (effet anti-radicalaire). Les flavonoïdes peuvent piéger le radical superoxyde, hydroxyle, alkoxy et peroxyde, par transfert d'hydrogène (**Zaarour A, 2012**).

Le radical flavonoxy (FL-O•) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable. La capacité anti-radicalaire des flavonoïdes dépend principalement de leurs structures.



FL : représente le flavonoïde.

R : représente le radical libre.

### **VI. Les Antioxydants de la clémentine**

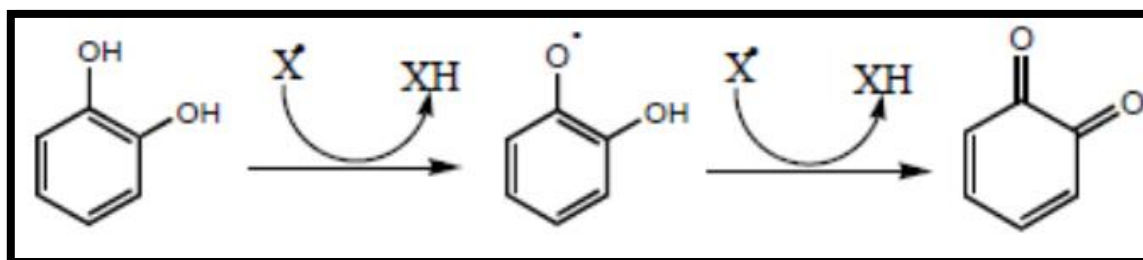
Puisque les antioxydants ont montré des effets protecteurs dans différentes maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer et le vieillissement, dont les plus connus sont les caroténoïdes (surtout le  $\beta$ -carotène), l'acide ascorbique, les tocophérols (vitamine E) et les polyphénols. Ces derniers incluent les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques. Qui



sont classés selon leurs origines (naturelles ou synthétiques), leurs natures (hydrosolubles ou liposolubles) et leurs modes d'actions (primaires ou secondaires).

### VI.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques agissent comme donneurs de protons ou d'électrons et chélatent les métaux de transition (**Blokhina et al., 2003**). La position et le degré d'hydroxylation, et la méthylation du cycle aromatique sont des facteurs importants qui déterminent l'activité antioxydante des acides cinnamiques et de leurs dérivés (**Robards, K et al., 1999**). L'activité antioxydante des acides cinnamiques suit l'ordre décroissant suivant : acide chlorogénique > acide caféique > acide férulique > acide coumarique (**Soobrattee, A et al., 2005**) (figure 11).

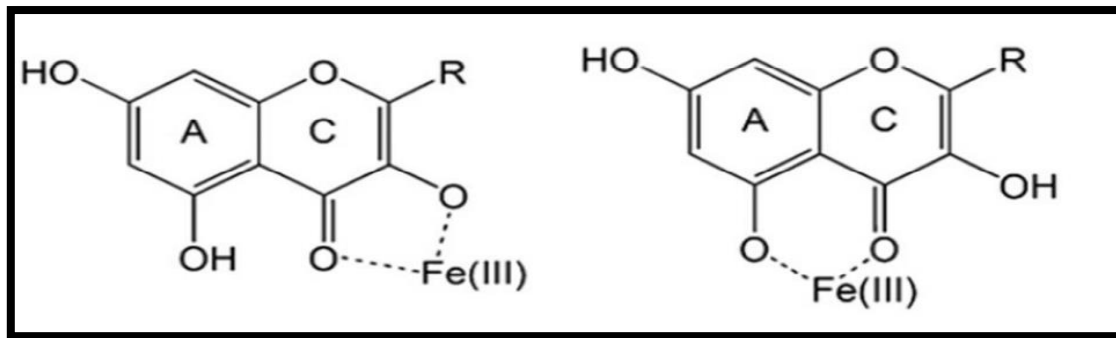


**Figure 11** : Piégeage des ERO ( $X^\bullet$ ) par un noyau catéchol (**Achat S, 2014**).

### VI.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (**Fuhrman, B et al., 1995**).

L'action antioxydante de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS (**Cotelle N, 2001**). A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (FL-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants ( $R^\bullet$ ), comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxy et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxy (FL-O $\cdot$ ) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (**Jovanovic, S et al., 1998**) (figure 12).




**Figure 12** : Sites possibles de la fixation de Fe<sup>3+</sup> aux cycles A et C des flavonoles. Le métal peut se fixer à la position 3-hydroxy-4-céto (gauche) ou la position 5-hydroxy-4-céto (droite) (Verdan, A *et al.*, 2011).

### VI.3. Tanins

La nature poly-phénolique de l'acide tannique qui est hydrophobe est le caractère responsable de l'action antioxydante, et son mécanisme antioxydant est encore loin d'être complètement compris. En présence de cuivre métallique l'acide tannique agit comme un pro-oxydant, ou comme un antioxydant suppresseur du radical hydroxyle (Gulçin, I *et al.*, 2010).

Une affinité pour les protéines, auxquelles ces molécules se lient réversiblement ou irréversiblement et qu'elles dénaturent (inactivation des protéines de surface des microbes et inhibition de leurs métabolismes par déformation des enzymes, d'où un effet antimicrobien ; anti-mutagéniques, inhibition des transcriptases inverses virales, d'où un effet antiviral ; inhibition des enzymes productrices d'espèces réactives de l'oxygène ou stimulation de la synthèse d'enzymes antioxydantes, d'où un effet antioxydant.

A yellow scroll graphic with a black outline and a drop shadow. The scroll is partially unrolled, with the top and bottom edges curled. The text is written in a bold, black, stylized font.

# **Matériel et Méthodes**

Notre travail a porté sur l'étude de l'impact des polyphénols, citroflavonoïdes, tanins de l'écorce de la clémentine (*citrus clémentina*) sur le stress oxydatif.

## **I. Préparation des extraits de l'écorce de la clémentine**

**I.1. Le séchage :** Les fruits sont lavés à l'eau puis essuyés l'écorce est récupérée à l'aide d'un économe. L'écorce est ensuite mise pour le séchage dans un endroit sec à une température ambiante (**Figure 13**) (à gauche).

**I.2. Le broyage et le tamisage :** A l'aide d'un mixeur électrique les écorces séchées sont broyées puis tamisées afin d'obtenir une poudre fine (**Figure 13**) (à droite).

Ces derniers sont placés dans des flacons fermés, étiquetés et conservés à température ambiante à 25°C jusqu'au moment de l'extraction.



**Figure 13 :** écorce séchée (à gauche) et écorce broyée et tamisée (à droite).

## **II. Extraction des composés phénoliques totaux**

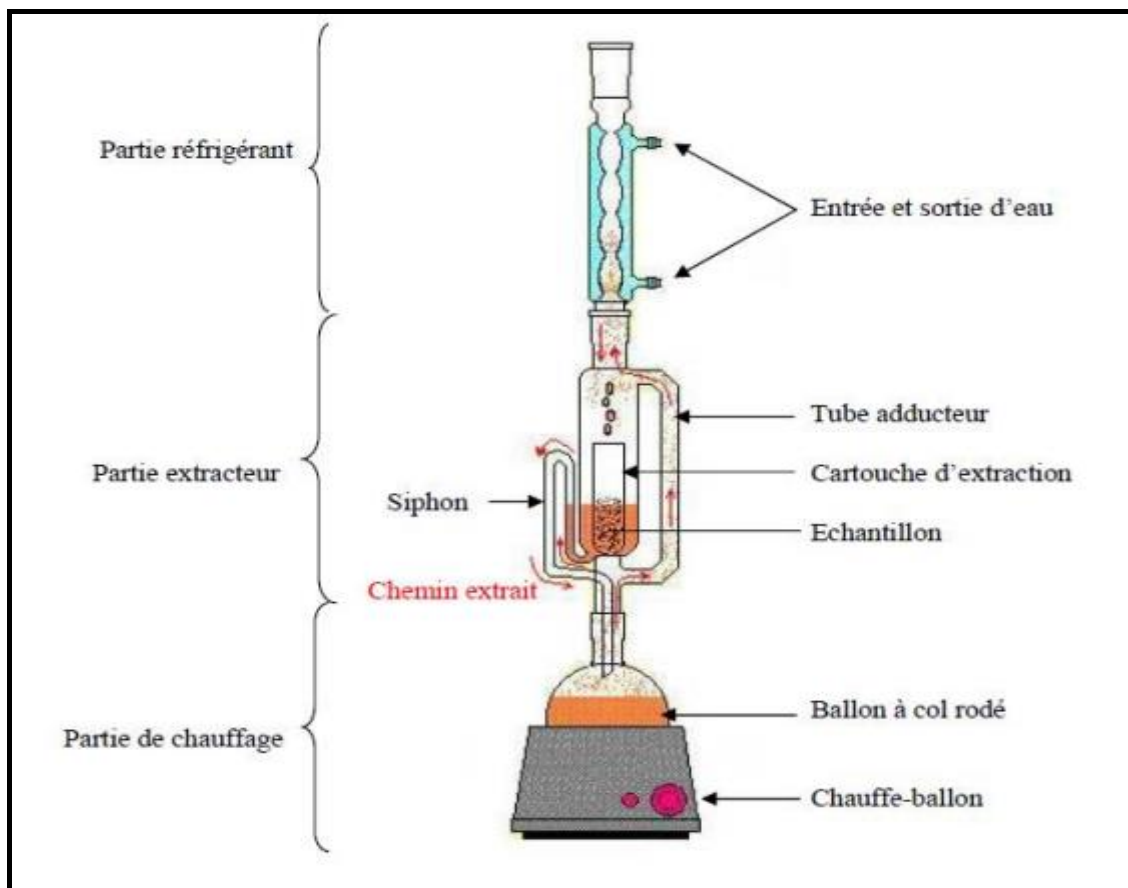
La méthode de (**Ladoh yemeda et al., 2014**) a été adoptée pour l'extraction des composés phénoliques totaux, et les étapes sont comme suit :

### **II.1. Délipidation**

Avant d'extraire les polyphénols, ces derniers ont subi une délipidation de la matière végétale par macération dans l'hexane afin d'éliminer les lipides et les pigments par la méthode de **Soxhlet** (technique standard). La conception de cette technique d'extraction a été décrétée pour la première fois par **Franz Von Soxhlet en 1879**.

Un extracteur de Soxhlet (ou appareil de Soxhlet) est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet l'extraction par solvant continue d'une espèce chimique contenue dans une poudre solide. Cet appareil porte le nom de son inventeur :

**Franz von Soxhlet.**



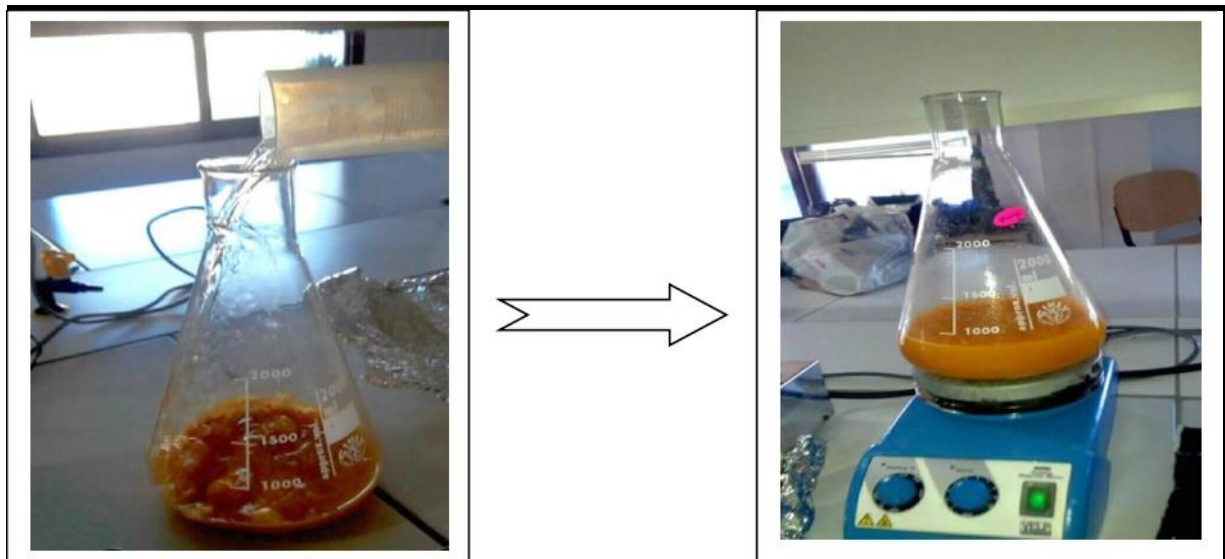
**Figure 14** : Schématisation de l'appareil de SOXLHET.

La poudre de l'écorce de la clémentine est introduite dans la cartouche en cellulose, cette dernière sera placée dans le SOXHLET surmonté d'un réfrigérant. Le ballon à fond rond est rempli avec une quantité suffisante de solvant apolaire (l'hexane). Un circuit fermé permet le passage des vapeurs d'hexane à travers de l'échantillon emportant la matière grasse dans le ballon. Cette opération suit plusieurs cycles d'extractions de la matière grasse, la poudre obtenue est appelée tourteau. Le tourteau sera par la suite séché dans une étuve.

## II.2. Macération

L'extrait brut des échantillons étudiés est obtenu par macération (**Figure 15**). Ce type d'extraction est un simple contact entre le support solide et le solvant ; 5g de poudre ont été mélangés avec 100 ml du solvant d'extraction (éthanol à 96%) ; le mélange a été mis sous

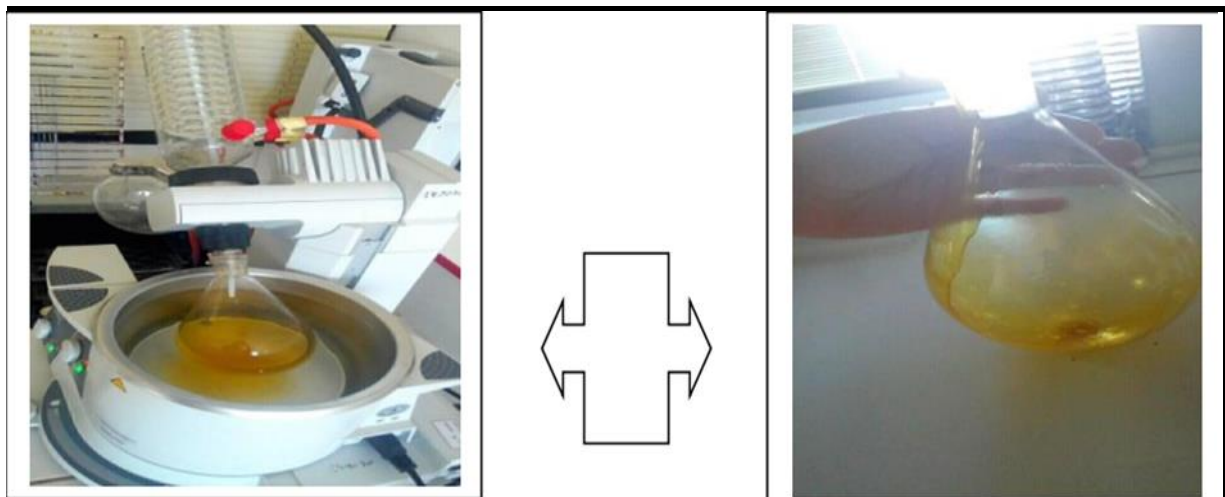
agitateur magnétique température ambiante pendant 24h. Après la macération, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier wattman N°3. Le filtrat correspond à la fraction éthanolique.



**Figure 15** : Extraction par macération.

### II.3. L'évaporateur Rotatif

Après filtration Placé dans l'appareil, le principe basé sur la distillation simple sous vide, qui permet d'éliminer les grandes quantités de solvant, la solution est mise en relation dans un ballon, la durée : procède à l'évaporation jusqu'à la disparition complète au solvant.



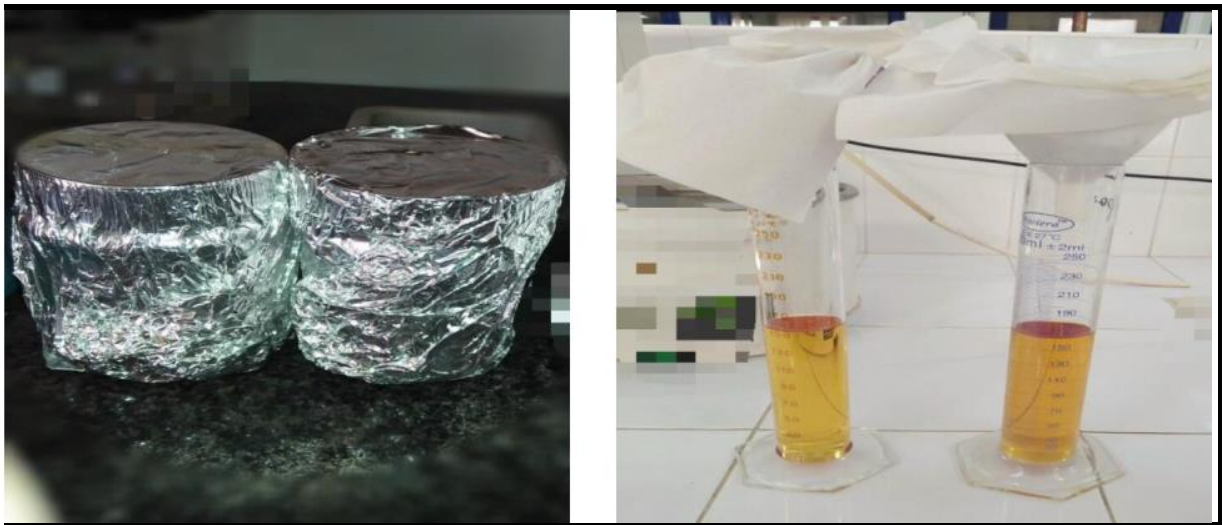
**Figure 16** : Evaporation des solvants dans le rota-vapeur.

### III. Extraction des tanins

L'extraction des tanins est obtenue par la méthode de (Zhang *et al.*, 2008). Le tourteau du matériel végétal (10g) a été macéré dans 200ml du mélange acétone/eau distillée (85/15

v/v) durant 3 jours à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré puis évaporé dans le rota-vapeur à 45°C afin d'éliminer l'acétone.

La phase aqueuse est reprise dans 50ml de dichlorométhane deux fois afin d'éliminer les pigments et les traces des lipides en utilisant une ampoule à décanter. La phase aqueuse est extraite une deuxième fois puis lavée 4 fois avec 50 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange des phases acétate éthylique récupéré et évaporé à sec 54°C dans l'étuve durant une nuit complète.



**Figure 17** : Macération du tourteau à gauche, filtration après macération à droite.

❖ **Préparation des dilutions de l'extrait (tanins) et de l'acide gallique**

A partir d'une solution mère de tanin sont préparées plusieurs dilutions (0,062 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 µg/ml). Les mêmes procédures sont établies avec l'acide gallique.

#### **IV. Extraction des citroflavonoïdes**

Les flavonoïdes n'ont pas la même propriété de la solubilité, certains sont solubles dans l'eau et l'alcool alors que d'autre sont solubles dans les solvants organiques, donc le principe utilisé pour leur extraction dépend du degré de la solubilité de ces derniers dans les solvants organiques (**Bruneton, 1999**).

❖ **Mode opératoire**

Après la filtration et l'évaporation à sec des extraits, les résidus secs sont repris par de l'eau chaude de même volume puis épuisés dans une ampoule à décantation par 10 ml de l'acétate

d'éthyle. Cette opération est répétée 2 à 3 fois pour extraire le maximum des flavonoïdes. Le solvant est ensuite évaporé et l'extrait est récupéré dans 1 ml de méthanol.



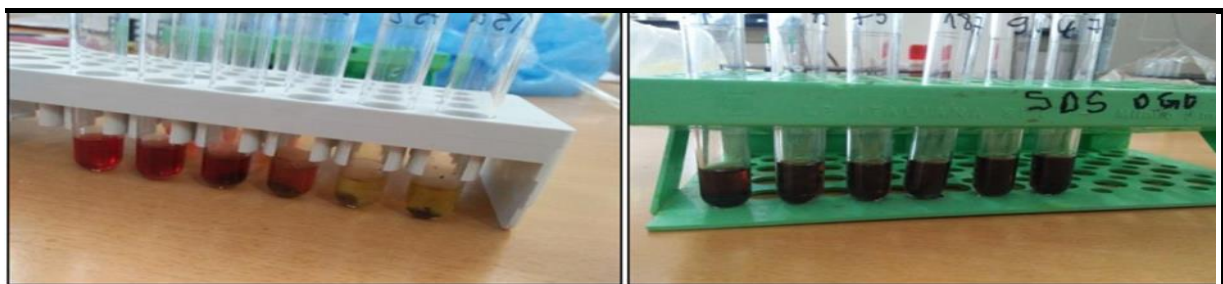
**Figure 18** : Extraction liquide-liquide des citroflavonoïdes.

## V. Test de cytotoxicité

Ce test consiste à mettre en contact des hématies avec les extraits méthanoliques de l'écorce à différentes concentrations (0,062-4  $\mu\text{g/ml}$ ), dans une solution isotonique et de suivre le taux hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de ces extraits, vis-à-vis, des globules rouges (GR).

### V.1. Préparation de la suspension des globules rouges humain

Après prélèvement sanguin chez un individu sain. Le sang est collecté dans des tubes à héparines puis centrifugé à 3000 tours/ minute pendant 10 minutes. Le plasma est éliminé tandis que le culot est lavé successivement 3 fois avec l'eau physiologique. La suspension érythrocytaire est diluée à 10 %.



(1)

(2)

**Figure 19** : (1) Test de cytotoxicité à différentes concentrations de tanin sur les globules rouges.

(2) Test de cytotoxicité à différentes concentrations d'acide gallique sur les globules rouges.





**Figure 20** : Test de cytotoxicité des tanins et d'acide gallique à différentes concentrations dans la plaque ELISA.

### V.2. Mode opératoire

Le protocole suivi est celui de **Bulmus et ses collaborateurs (2003)**, où un volume de 1,6 ml de l'extrait méthanolique et de l'acide gallique (molécule de référence de composé phénolique) a été mélangé avec un volume de 0,4ml de la suspension de GR. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C, pendant 30min, puis centrifugé à 3000 tour/min pendant 10 min. L'absorbance de l'hémoglobine libérée a été mesurée à 560 nm).

Après 30min de l'incubation, l'effet protecteur des tanins est vérifié suite à une exposition des globules rouges à un générateur de radicaux libres le TBHP par une incubation de 90 min avec ce dernier à une concentration finale de 5µM.

### VI. Dosage des paramètres du statut oxydant /antioxydant

Le sang prélevé, collecté dans des tubes héparines et centrifugés à 2000 t/min pendant 10 min. un plasma et un culot ont été obtenues. Trois lavages successifs ont été effectués avec du tampon phosphate suivi à chaque fois d'une centrifugation. Le surnageant a été éliminé et dilué le culot dans un tampon phosphate pour obtenir un hématocrite de 2 %. 1 ml de cette solution est mélangé avec 50 µl d'extrait. Après incubation pendant 30 min à 37 °C sous agitation, 5 µl de TBHP sont ajoutés. Après incubation sous agitation à 37°C pendant 2 heures, les érythrocytes sont préparés pour une hémolyse totale et dosage des paramètres du stress oxydatif.

### VI.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

#### VI.1.1. Principe

Le malondialdéhyde (MDA) plasmatique, érythrocytaire est mesuré selon la méthode de **(Nourooz-Zadeh et al., 1996)**. Après traitement acide à chaud les aldéhydes réagissent avec TBA formant une condensation chromogénique de couleur rose et/ou jaune consistant en 2 molécules de TBA et une de molécule de MDA. L'absorption intense de ce chromogène se fait à 532 nm. La concentration du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ;  $\epsilon = 1,56.105 \text{ mol}^{-1}.1. \text{ Cm}^{-1}$ .

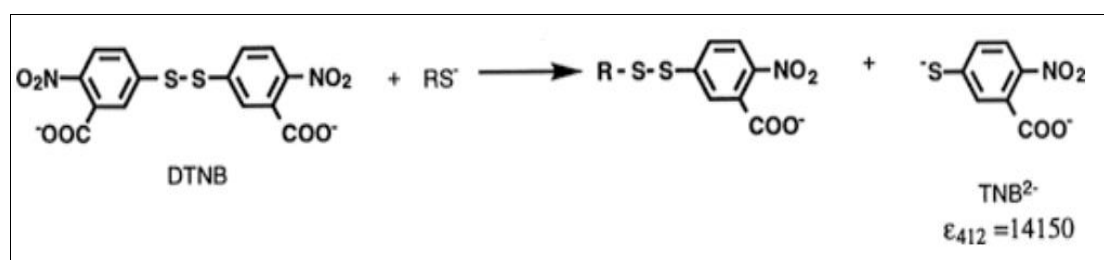
#### VI.1.2. Procédure

Il a été introduit 150  $\mu\text{l}$  de lysat, 150  $\mu\text{l}$  de TBA et 500  $\mu\text{l}$  de TCA dans des tubes en verre, vortexé et incubé pendant 20 mn dans un bain marie à 100°C sous agitation. Refroidir pour choquer la réaction, centrifugé à 6000 tours/ min pendant 10 min. le culot est jeté et le surnageant est prélevé qui contient le MDA ; la DO est mesurée à 532 nm, contre le blanc qui est l'eau distillée.

### VI.2. Dosage du glutathion réduit GSH (Ellman, 1959)

#### VI.2.1. Principe

Le dosage du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire est réalisé par la méthode colorimétrique par le réactif d'Ellman (DTNB). La réaction consiste à couper la molécule de (DTNB) par le GSH, en libérant (TNB) selon la réaction suivante **(Figure 21)**.



**Figure 21** : le réactif d'Ellman (DTNB) en présence de groupement thiol **(Ellman, 1959)**.

#### VI.2.2. Procédure

Il a été introduit dans des tubes 1ml tampon KPO4 (0,2M ; pH=7,5) ; 0,5ml DTNB (3mM) ; 100  $\mu\text{l}$  du lysat érythrocytaire ; 400  $\mu\text{l}$  d'eau distillée. Après incubation pendant 30 min à 37°C la DO est mesurée. Le TNB absorbe à 412 nm.  $E = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ .

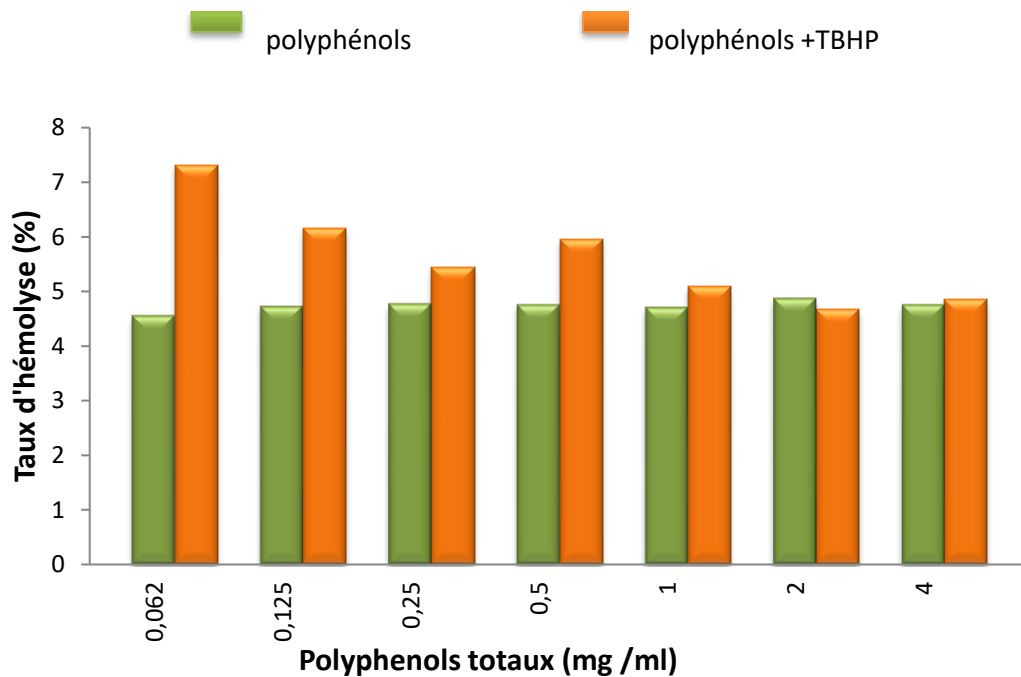
**VII. Etude statistique**

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes entre témoins : tubes contenant les érythrocytes en présence de l'écorce seules (polyphénols, tanins et citroflavonoïdes) ou combinés au TBHP est réalisé par le test « t » de Student pour les différents paramètres. Cette analyse est réalisée grâce au logiciel STATISTICA, version 4.1 (STATSOFT, TULSA, OK). Les différences significatives sont marquées par Après analyse de la variance : \*\*p < 0,01 est très significative ; \*\*\* p < 0,001 est hautement significative.

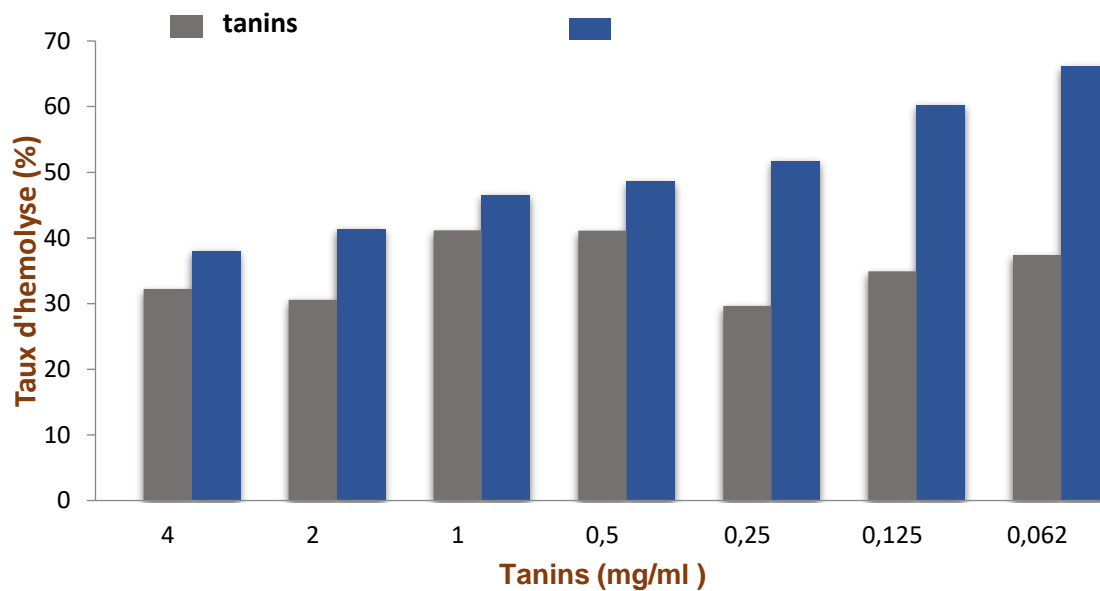
A yellow scroll graphic with a black outline and a drop shadow. The scroll is unrolled in the middle, with the top and bottom edges curled up. The text is centered on the unrolled portion.

# **Résultats et Interprétations**

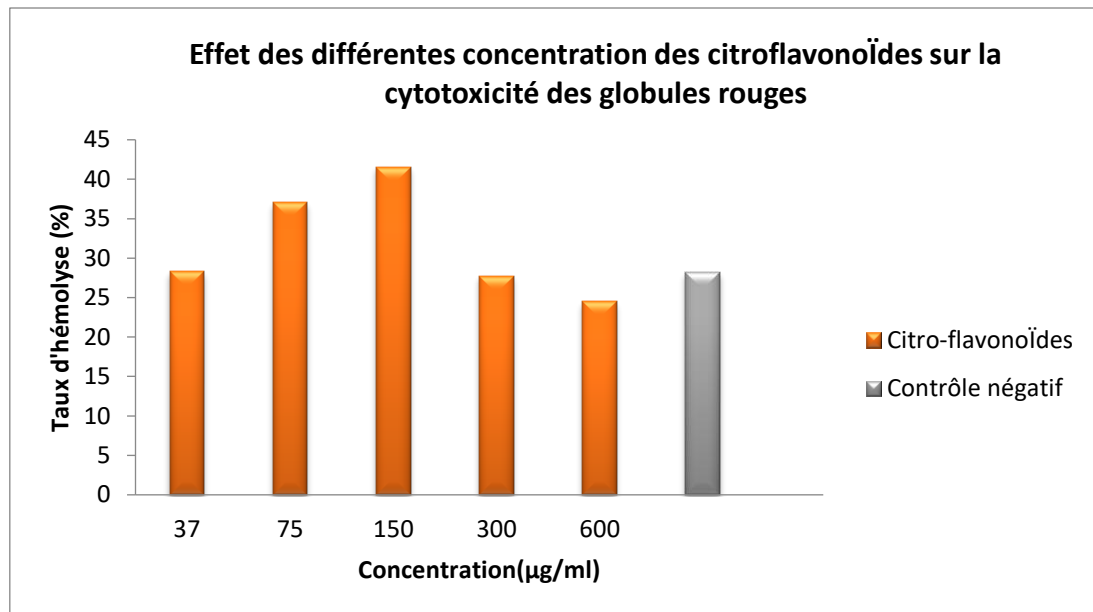
I. Test d'hémolyse



**Figure 22** : Effet de différentes concentrations de polyphénols combinés ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.

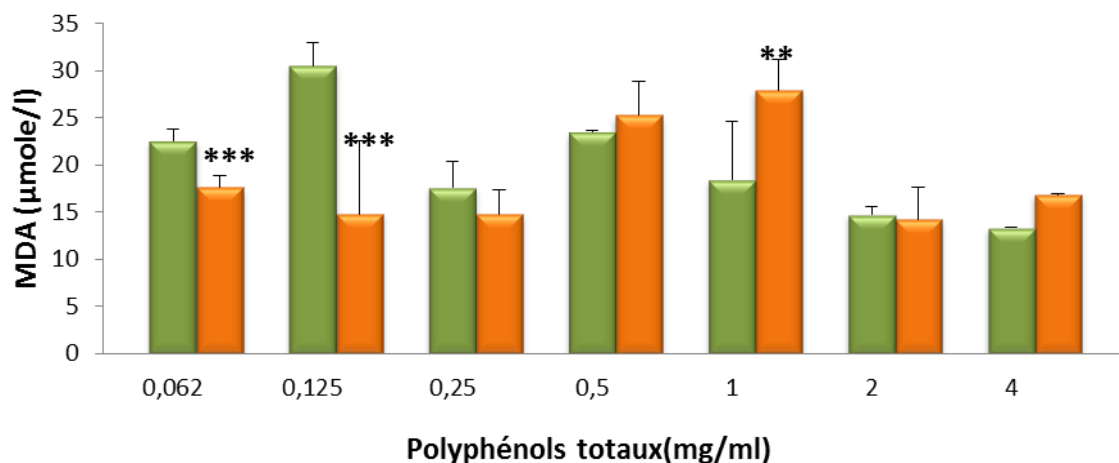


**Figure 23** : Effet de différentes concentrations de tanins combinées ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.



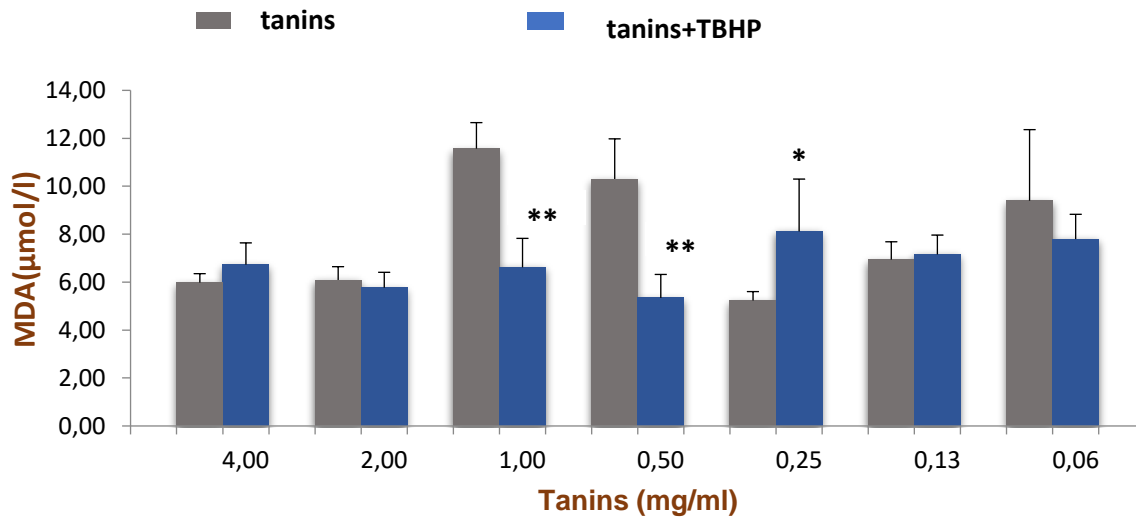
**Figure 24** : Effet des différentes concentrations des citroflavonoïdes sur la cytotoxicité des globules rouges.

## II. Statut oxydant



**Figure 25** : Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non au TBHP sur les teneurs en MDA.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  erreur standard, la comparaison des moyennes entre Polyphénols totaux combinés ou non au TBHP est effectuée par le test « t » de student. Après analyse de la variance : \*\*  $p < 0,01$  est très significative ; \*\*\*  $p < 0,001$  est hautement significative.

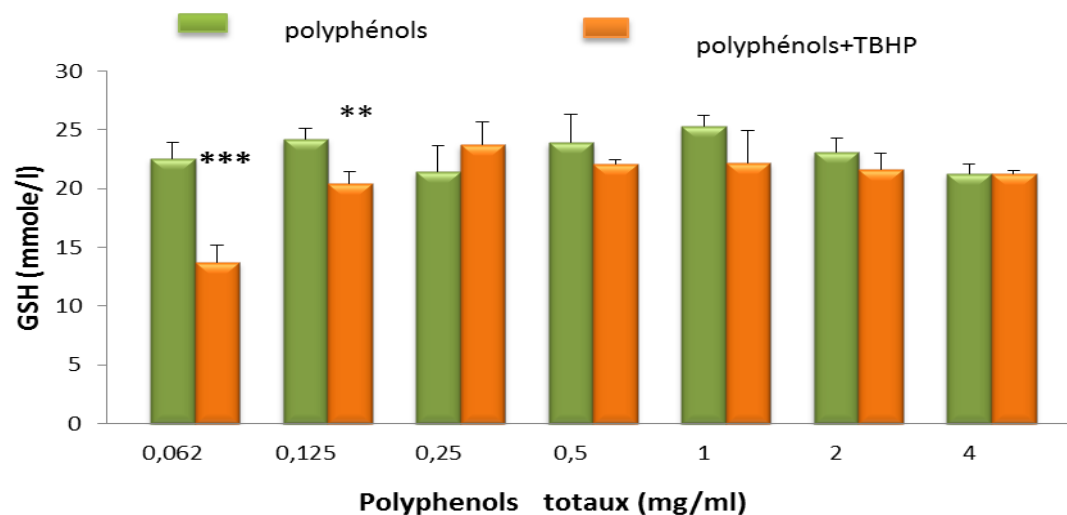


**Figure 26** : Effet de différentes concentrations des tanins combinées ou non au TBHP sur les teneurs du MDA érythrocytaire.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes entre les différentes concentrations de tanins seuls ou associées au TBHP est réalisée par le test « t » de Student pour les différents paramètres.

Les différences significatives sont marquées a : \*  $p < 0.05$  différence significative. \*\*  $p < 0.01$  différence très significative. \*\*\*  $p < 0.001$  différence hautement significative.

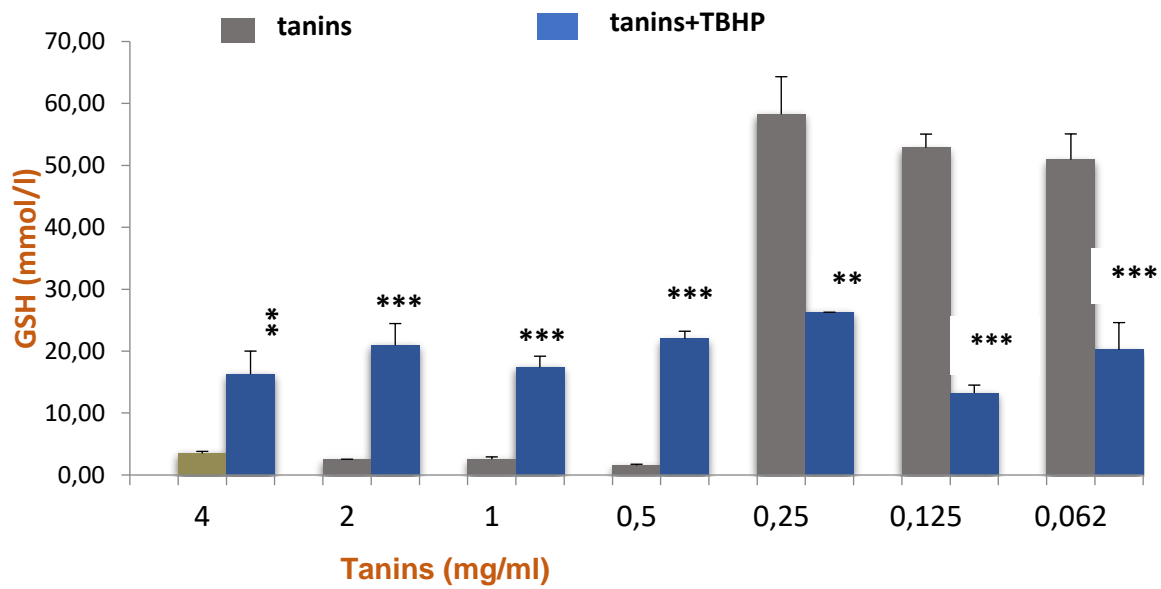
### III. Statut antioxydant



**Figure 27** : Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non sur TBHP sur les teneurs en GSH.

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  erreur standard, la comparaison des moyennes entre Polyphénols totaux combinés ou non au TBHP est effectuée par le test « t » de student. Après analyse de la variance : \*\*p < 0,01 est très significative ; \*\*\* p < 0,001 est hautement significative.

Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage.



**Figure 28** : Effet de différentes concentrations des tanins combinées ou non au TBHP sur les teneurs du GSH érythrocytaire.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Après analyse de la variance, la comparaison des moyennes entre les différentes concentrations de tanins seuls ou associées au TBHP est réalisée par le test « t » de Student pour les différents paramètres.

Les différences significatives sont marquées a : \* p < 0.05 différence significative. \*\* p < 0.01 différence très significative. \*\*\* p < 0.001 différence hautement significative.



**I. Test d'hémolyse****I.1. Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence des polyphénols totaux**

Le taux d'hémolyse présente une diminution lorsque les polyphénols ne sont pas combinés au TBHP comparés aux polyphénols combinés au TBHP. Cependant à la concentration de **2 mg/ml** le taux d'hémolyse est plus élevé en présence des polyphénols comparés aux polyphénols combinés au TBHP.

**I.2. Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence des tanins**

Le taux d'hémolyse présente est à chaque fois diminué en présence de tanins comparé aux tanins combinés au TBHP. Pour les différentes concentrations **4** et **0.5 mg/ml** cette diminution varie autour de **29 %** et **41 %**. Cependant Le taux d'hémolyse le plus bas pour les tanins non combinés au TBHP (**29 %**) est rencontré pour la concentration de **0.25 mg/ml**.

**I.3. Teneurs érythrocytaires de taux d'hémolyse en présence des citroflavonoïdes**

Les résultats (**Figure24**) montrent que les citroflavonoïdes présentent l'effet hémolytique le plus bas à la concentration (**600µg/ml**) avec un taux d'hémolyse de **24.50%**. Ce taux d'hémolyse est inférieur au contrôle négatif (**28.22 %**). La cytotoxicité des citroflavonoïdes augmente progressivement avec l'augmentation des concentrations **37 µg/ml**, **75 µg/ml** et **150 µg/ml** pour atteindre un taux d'hémolyse maximale de **41.54 %** à la concentration de **150 µg/ml**.

**II. Statut oxydant****II.1. Teneurs érythrocytaires de MDA en présence des polyphénols totaux**

Les résultats des marqueurs de stress oxydant (MDA) n'ont montré aucune différences significatives entre polyphénols combinés au TBHP et polyphénols non combinés. Pour les concentrations (**0,25 ; 0,5 ; 2 ; 4**) **mg/ml**. Cependant une diminution hautement significative est notée lorsque les polyphénols sont combinés au TBHP comparés aux polyphénols non combinés et ceci pour les faibles concentrations en polyphénols (**0,062 ; 0,125**) **mg/ml**. Par ailleurs une augmentation significative des teneurs en MDA est notée pour la concentration **1 mg/ml** des polyphénols combinés au TBHP par rapport aux polyphénols non combinés.

**II.2. Teneurs érythrocytaires de MDA en présence des tanins**

Les résultats des marqueurs du stress oxydant (MDA) n'ont montré aucune différence significative entre tanins combinée au TBHP et tanins non combinés pour les concentrations **(4, 2, 0.125, 0.062) mg/ml**. Cependant une diminution significative est notée lorsque les tanins sont combinés au TBHP comparée au tanin non combiné et ceci pour les concentrations **(1 et 0,5) mg/ml**. Par ailleurs une augmentation significative des teneurs en MDA est notée pour la concentration **0,25 mg/ml** des tanins combinés au TBHP par rapport aux tanins non combinés.

**III. Statut antioxydant****III.1. Teneurs érythrocytaires de GSH en présence des polyphénols totaux**

Les résultats des teneurs du GSH montrent des variations en fonction des concentrations en polyphénols mais aussi sa combinaison avec le TBHP. Les faibles concentrations en polyphénols non combinés au TBHP **(0,062) mg/ml** augmentent les teneurs en GSH comparé aux polyphénols combinés au TBHP.

**III.2. Teneurs érythrocytaires de GSH en présence des tanins**

Les résultats des teneurs du GSH montrent des fluctuations en fonction des concentrations en tanins mais aussi sa combinaison avec le TBHP. Les faibles concentrations en tanins non combinés **(0,25 ; 0,125 ; 0,062) mg/ml** augmentent les teneurs en GSH comparées aux tanins combinés au TBHP. A l'inverse les tanins combinés au TBHP augmentent les teneurs en GSH pour les concentrations les plus élevées **(0,5 ; 1 ; 2 et 4) mg/ml** et ceci pour les mêmes comparaisons.



# ***Discussion***

La consommation élevée des aliments riches en phénols peut prévenir certaines maladies et protéger le corps contre les réactions d'oxydation provoquées par des espèces chimiques au nom de "radicaux libres", provoquant une oxydation, qui peut avoir un effet grave : le stress oxydant et induire de sévères dommages cellulaires. Ainsi, pour se protéger de cette agression particulière, notre organisme a besoin d'une source exogène d'antioxydants **(Marzouk I, 2021)**.

Les polyphénols, antioxydants naturels, possèdent aussi un effet anti-hémolytique, en stabilisant la membrane des globules rouges contre la lyse osmotique **(Chaudhuri et al., 2007)**. Cette activité est effective grâce à l'intégration des polyphénols dans la couche lipidique externe de la membrane érythrocytaire et modification de l'arrangement de la partie hydrophile, sans changer la fluidité de la partie hydrophobe. L'emplacement de ces composés dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier de protection de la cellule contre les substances toxiques en particulier les formes réactives de l'oxygène **(Bonarska-Kujawa D et al., 2010)**. De plus, les polyphénols pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer, qui peuvent renforcer les effets oxydants par la production des radicaux hydroxyles (OH·) **(Mladěnka et al., 2011)**.

D'autre part, les composés phénoliques ont la capacité de se fixer sur le site actif de la NADH-cytochrome réductase, ce qui active le complexe PMRS (Plasma Membrane Redox System) et donc agit contre l'oxydation de l'érythrocyte **(Kesharwani, R et al., 2012 ; Fatima, M et al., 2013)**. Car l'hématie peut éliminer les électrons qui sont à l'origine de ce stress par le complexe PMRS, ce dernier est un complexe enzymatique qui expulse ces électrons vers le milieu extérieur **(Rizvi et al., 2009)**.

Une étude faite par **Duchnowitz et ses collaborateurs en 2012** a démontré que dans le cas d'érythrocytes provenant de patients d'hypercholestérolémiques, les polyphénols diminueraient la concentration membranaire de cholestérol, ce qui améliorerait la fluidité membranaire de l'érythrocyte. Les polyphénols peuvent se lier à la surface de la membrane de l'érythrocyte, influant ainsi sur la position du cholestérol.

L'objectif de notre travail est d'étudier *in vitro* l'impact des polyphénols, citroflavonoïdes, tanins de l'écorce de clémentine sur le stress oxydant.

Le test de cytotoxicité est un test *in vitro* qui permet d'évaluer le seuil de toxicité de l'extrait par rapport aux globules rouges. Ces dernières sont souvent choisies comme modèle de recherche. Les hématies sont faciles à séparer et possèdent une membrane similaire à d'autres membranes plasmiques. Elles peuvent être détruites et libèrent leur contenu cellulaire notamment l'hémoglobine dont l'intensité de coloration reflète le taux de toxicité **(Robertis et al., 1995)**.

Nos résultats montrent que le taux d'hémolyse présente une diminution lorsque les polyphénols ne sont pas combinés au TBHP comparés aux polyphénols combinés au TBHP. Cependant à la concentration de **2 mg/ml** présente le taux d'hémolyse le plus élevé en présence des polyphénols comparés aux polyphénols combinés au TBHP. A l'inverse le taux d'hémolyse le plus bas pour les polyphénols (**45%**) est rencontré pour la concentration de **0,062 mg/ml**. En effet et selon certaines études, les polyphénols peuvent conférer des propriétés toxiques à fortes doses **(Galati et al., 2002)**.

Les chercheurs ont mené de nombreuses études sur les polyphénols et leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. Les polyphénols sont des agents réducteurs. Ces puissants antioxydants peuvent capter les radicaux libres produits en permanence par le corps humain ou les radicaux libres formés par des agressions extérieures (pollutions diverses, infections, etc.). Ils ont aussi un rôle protecteur et peuvent renforcer nos défenses naturelles contre le stress oxydatif en protégeant les composants tissulaires. Ils peuvent également agir comme des chélateurs d'ions métalliques pro-oxydants et jouer des effets antimutagènes, anti-inflammatoires, antimicrobiens, antitumoraux ou antiviraux **(Acworth et al., 1995 ; Sala et al., 2002)**.

Concernant l'effet des tanins sur les hématies, nos résultats ont montré que le taux d'hémolyse est à chaque fois diminué en présence de tanins comparé aux tanins combinés au TBHP. Cette diminution varie autour de **29 %** et **41 %**. Cependant le taux d'hémolyse le plus bas pour les tanins non combinés au TBHP (**29 %**) est rencontré pour la concentration de **0.25 mg/ml**. En effet les études montrent que certains métabolites secondaires possèderaient des propriétés anti-hémolytiques **(Fiot et al., 2006)**. Une autre étude sur les tanins a démontré une diminution de la perméabilité des globules rouges. Cette action due aux tanins empêche l'entrée des solutions à l'intérieur des globules rouges ce qui prévient l'hémolyse érythrocytaires **(Verbois, 2002)**.

En ce qui concerne les citroflavonoïdes, nos résultats montrent qu'ils sont les moins toxiques à de faibles concentrations avec un taux d'hémolyse de **24.50%**. De plus ce taux d'hémolyse est inférieur au contrôle négatif (**28.22 %**). Les citroflavonoïdes sont des composés bioactifs ayant de multiples propriétés biologiques : anti-inflammatoires, anti-hémolytiques, antioxydantes, anti-radicalaires...etc. L'activité antioxydante de ces composés est due au piégeage des radicaux libres et l'inhibition des enzymes génératrices de radicaux libres comme la xanthine oxydase. L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres et la neutralisation d'enzymes oxydantes mais elle se manifeste aussi par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (**Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001 ; Kim et al., 2002**). Les citroflavonoïdes peuvent maintenir l'intégrité de la membrane des globules rouges en la stabilisant lors d'un choc osmotique. Aussi lors d'un stress oxydatif, l'emplacement de ces composés dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier de protection de la cellule contre les substances toxiques en particulier les formes réactives de l'oxygène (**Chaudhuri et al., 2007**).

En outre nos résultats ont démontré que la cytotoxicité des citroflavonoïdes augmente progressivement avec l'augmentation des concentrations **37 µg/ml, 75 µg/ml** et **150 µg/ml** pour atteindre un taux d'hémolyse maximale de **41.54 %** à la concentration de **150 µg/ml**.

La toxicité des flavonoïdes peut être attribuée à leur action mutagène, pro-oxydante, et génératrice des radicaux libres. D'après **Galati et al., 2002** ; les flavonoïdes sont impliqués dans l'oxydation de l'hémoglobine, la perturbation de la structure membranaire et donc l'hémolyse des érythrocytes, en raison d'effets pro-oxydants (**Knekt et al., 1997**). Il semble d'après nos résultats que les concentrations les plus élevée en citroflavonoïdes sont responsables de la toxicité des hématies.

Le stress oxydatif apparaît quand l'équilibre entre les espèces pro-oxydantes et antioxydantes est rompu en faveur des pro-oxydants. Une production physiologique d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) se fait de manière continue. Dans des conditions pathologiques ou provoquées par des facteurs exogènes, une surproduction de ces d'espèces réactives est possible (**Valko et al., 2007**).

Les résultats des marqueurs de stress oxydant (MDA) n'ont montré aucune différence significative entre polyphénols combinés au TBHP et polyphénols non combinés. Pour les concentrations **(0,25 ; 0,5 ; 2 ; 4) mg/ml**.

Par ailleurs une augmentation significative des teneurs en MDA est notée pour la concentration **1 mg/ml** des polyphénols combinés au TBHP par rapport au polyphénol non combinés.

Pour les tanins les résultats des marqueurs du stress oxydant (MDA) n'ont montré aucune différence significative entre tanins combinés au TBHP et tanins non combinés pour les concentrations **(4, 2, 0.125, 0.062) mg/ml**. Cependant une diminution significative est notée lorsque les tanins sont combinés au TBHP comparée aux tanins non combinés et ceci pour les concentrations **(1 et 0,5) mg/ml**.

Les concentrations en MDA plasmatiques sont significativement augmentées pour les érythrocytes en présence de TBHP. 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 (**Dwight & Hendry, 1995**).

Les résultats des teneurs du GSH montrent des variations en fonction des concentrations en polyphénols mais aussi sa combinaison avec le TBHP. Les faibles concentrations en polyphénols non combinés au TBHP **(0,062) mg/ml** augmentent les teneurs en GSH comparé aux concentrations élevées en polyphénols combinés au TBHP.

Les teneurs érythrocytaires élevées en GSH pourraient être expliqués par le fait que le GSH réagit en synergie avec les polyphénols contre les radicaux libres générés par le TBHP afin de les neutraliser. Donc, les polyphénols empêchent la diminution de GSH. Autrement dit, ils ont un effet scavenger, c'est à dire au lieu que les radicaux libres produits par le TBHP se neutralisent par le GSH, ils vont plutôt être captés par les polyphénols (**Haleng et al., 2007**).

Les résultats des teneurs du GSH montrent en présence de tanins des fluctuations en fonction des concentrations en en tanins mais aussi sa combinaison avec le TBHP. Les faibles concentrations en tanins non combinés **(0,25 ; 0,125 ; 0,062) mg/ml** augmentent les teneurs en GSH comparées aux tanins combinés au TBHP. A l'inverse les tanins combinés au TBHP

augmentent les teneurs en GSH pour les concentrations les plus élevées (0,5 ; 1 ; 2 et 4) mg/ml et ceci pour les mêmes comparaisons. Nos résultats démontrent que les tanins présentent une activité anti oxydante très élevée en augmentant le taux du GSH.





L'écorce de la clémentine est une source importante de différents composés phénoliques en particulier les polyphénols, citroflavonoïdes et les tanins connus pour leur effets bénéfiques sur la santé ayant aussi un intérêt biologique dans différents domaines : agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique et autres.

Le but de cette expérimentation est d'évaluer l'activité antioxydante des polyphénols, des tanins et des citroflavonoïdes de l'écorce de clémentine *in vitro* par le dosage des paramètres de stress oxydatif : MDA et GSH. Les globules rouges sont utilisés comme modèle cellulaire dans ce travail.

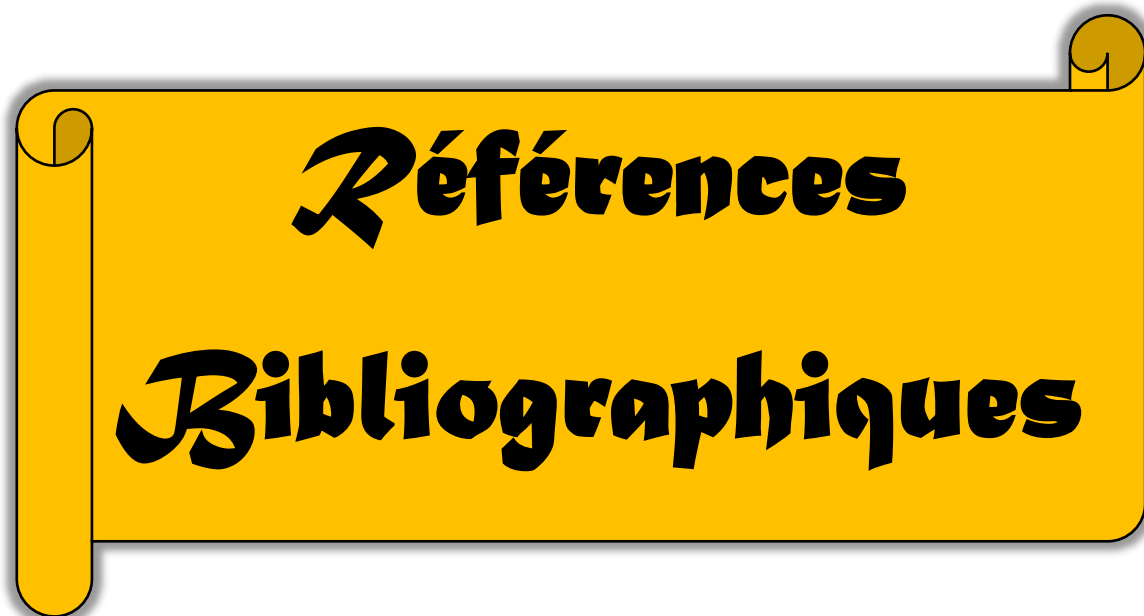
Grâce au test de cytotoxicité sur les hématies, la toxicité des extraits (polyphénols, tanins et citroflavonoïdes de l'écorce de clémentine) a été mise en évidence. Les résultats obtenus ont démontrés que :

- Les polyphénols sont toxiques à fortes doses dont la concentration de **2 mg/ml** présente le taux d'hémolyse le plus élevé, cependant le taux d'hémolyse le plus bas pour les polyphénols (**45%**) est rencontré pour la concentration de **0,062 mg/ml**.
- Les tanins ont démontré une diminution de la perméabilité des globules rouge dont Le taux d'hémolyse le plus bas pour les tanins est (**29 %**) rencontré pour la concentration de **0.25 mg/ml**.
- Concernant les citroflavonoïdes, les résultats montrent qu'ils sont les moins toxiques à des faibles concentrations avec un taux d'hémolyse de **24.50%**.

Concernant le stress oxydatif nos résultats ont montré que :

- Les fortes concentrations en polyphénols (**2 ; 4**) mg/ml induisent une diminution des taux du MDA (**15 ; 12**)  $\mu\text{mol /l}$  respectivement.
- Les faibles concentrations en polyphénols (**0,062**) mg/ml augmentent les teneurs en GSH.
- Les faibles concentrations en tanins (**0,25 ; 0,125 ; 0,062**) mg/ml augmentent les teneurs en GSH.
- Des concentrations élevées des tanins (**2 ; 4**) mg/ml induisent une diminution des taux du MDA (**6,2 ; 6**)  $\mu\text{mol/l}$  respectivement.

A la lumière de ces résultats, les fractions extraites de l'écorce de la clémentine peuvent être considérées comme des agents antioxydants naturels pouvant donc constituer une alternative pour le traitement de diverses maladies liées au stress oxydatif. Plutôt que jeter les l'écorce de la clémentine il serait intéressant de valoriser ses composants bioactifs.



**Références**  
**Bibliographiques**

### A

- ❖ **ACHAT S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse de doctorat. Université A. Mira-Bejaia. Algérie.
- ❖ **Acworth I.N., Bailey B Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G.P., Rice-Evans C. (1995)** The handbook of oxidative metabolism, Ed. ESA Inc, Chelmsford, Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, Arch. Biomed. Biophys. 322 (2) : 339–346.
- ❖ **Aderdour, T., Handaji, N., Brhadda, N., Arsalane, N., El Aouad, B. A., Label, K., ... & Benyahia, H. (2015).** Effet de l'irradiation par rayon gamma sur la variabilité de certains critères de qualité chez la clémentine Marisol. International Journal of Innovation and Applied Studies, 13(1), 152-162.
- ❖ **ALAM M.K., RANA Z.H et ISLAM S.N. (2016).** Comparison of the proximate composition, total carotenoids and total polyphenol content of nine orange-fleshed sweet potato varieties grown in Bangladesh. Foods. 5(3): 1-6.
- ❖ **ARABBI P.R., GENOVESE M.I.S. et LAJOLO F.M. (2004).** Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. J. Agric. Food Chemistry. 52 : 1124-1131.
- ❖ **Athamena, S. (2009).** *Etude quantitative des flavonoïdes des graines de Cuminum cyminum et les feuilles de Rosmarinus officinalis et l'évaluation de l'activité biologique* (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).
- ❖ **ATROUZ O.M. (2009).** The Antioxidant activity and polyphenol contents of different plants seeds extracts. Pakistan Journal of Biological Sciences. 12(15): 1063- 1068.

### B

- ❖ **BARHE A. et TCHOUYA G.R.F. (2016).** Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from Hibiscus Sabdariffa L., Glycine max L.

Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. *Arabian Journal of Chemistry*. 9: 1-8.

- ❖ **Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018).** Overview of polyphenols and their properties. In *Polyphenols : Properties, recovery, and applications* (pp. 3-44). *Woodhead Publishing*.
- ❖ **Benfdila, T., & Ingrachen, N. (2018).** *Propriétés biochimiques et biologiques du fruit Diospyros kaki (Plaquemine)* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- ❖ **Berger, M.M. (2005).** canoxydatif damage betreatednutritionally? *Clinical nutrition*, 24:172-183.
- ❖ **Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt K V (2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany*, **91**, 179-194.
- ❖ **BONARSKA-KUJAWA D., PRUCHNIK H., OSZMIANSKI J., SARAPUK J. et KLESZCZYNSKA H. (2010).** Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics*; 6(1), 58–67.
- ❖ **Boots A.W., Haenen G.R.M.M., Bast A., 2008.** Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, 585: 325-337.
- ❖ **BOUCHACHIA, A. (2017).** *Mesure de la vitamine C et de l'activité anti-radicalaire et anti-oxydante des citroflavonoïdes de l'écorce du citron* (Doctoral dissertation).
- ❖ **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales, 3<sup>e</sup> édition, Edition Lavoisier TEC et DOC.pp56-66.
- ❖ **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Ed. Technique et Documentation. 3<sup>e</sup>me Ed, Paris. France. 1120p.
- ❖ **Bulmus V, Woodward M, Li L, Murthy N, Stayton P, et Hoffman A (2003).** A new pHresponsive and glutathione-reactive, endosomal membrane disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of Controlled Release*, 93(2), 105-120.

## C

- ❖ **Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S., 2002.** Recent aspects of oxidative DNA damage

: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem.*, 383(6), p. 93.

- ❖ **Chahidi, B., El-Otmani, M., Jacquemond, C., Tijane, M. H., El-Mousadik, A., Srairi, I., & Luro, F. (2008).** Utilisation de caractères morphologiques, physiologiques et de marqueurs moléculaires pour l'évaluation de la diversité génétique de trois cultivars de clémentinier. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 1-12.
- ❖ **Chaudhuri S., Banerjee A., Basu K., Sengupta B. et Sengupta P.K.,2007.** Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*; 41(1), 42-48.
- ❖ **Chu W L, Lim Y W, Radhakrishnan A K and Lim P E (2010).** Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10 (53), 2-8.
- ❖ **Cook MS, Evens MD, Dizdaroglu M, Lunee J (2003).** Oxidative DNA damage: mechanisms on mutation and disease. *FASEB J*, 17(10), 1195-1214.
- ❖ **Cotelle N., 2001.** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr.Top.* Page: 569-590.
- ❖ **Cotelle, N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*, 1: 569-590.
- ❖ **CURK F., HUSSAIN S., PAILLY O., GILLESTISON., 2013** – Performance evaluation of commun clementine on various citrus rootstocks. Vol150 pp278-282

## D

- ❖ **DAI J et MUMPER R.J. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15 : 7313-7352.
- ❖ **Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63, 10-19.
- ❖ **Di Taranto, C. D. G., & di Calabria, C.** Production of clementines, tangerines, mandarins and satsumas\* in 2016 Country.

- ❖ **DONG H., CHEN H-D., ZHAO Y-J et LI H-M. (2014).** Polymethoxy flavones do not exert an inducing effect on the biosynthesis and secretion of insulin by pancreatic  $\beta$ -cells. *Biomedical Reports*. 2 : 287-291.
- ❖ **Duan, L., Guo, L., Liu, K., Liu, E.-H., & Li, P. (2014).** Characterization and classification of seven Citrus herbs by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry and genetic algorithm optimized support vector machines. *Journal of Chromatography A*, 1339, 118-127.
- ❖ **Dwight J.S.J., & Hendry B.M., (1996).** The effects of tert-butyl hydroperoxide on human erythrocyte membrane ion transport and the protective actions of antioxidants. *Clinica Chimica Acta*, 249(1) : 167-181.

### E

- ❖ **Edeas, M. (2007).** Citroflavonoïdes. *Phytothérapie*, 5(4), 210-211.
- ❖ **EDZIRI H., MASTOURI M., AOUNI M et VERSHAEEVE L. (2012).** Polyphenols content, antioxidant and antiviral activities of leaf extracts of *Marrubium deserti* growing in Tunisia. *South African Journal of Botany*. 80: 104-109.
- ❖ **Ellman G.L., (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1): 70-77.
- ❖ **EVANS M., SHARMA P. et GUTHRIE N. (2012).** Bioavailability of Citrus polymethoxylated flavones and their biological role in metabolic syndrome and hyperlipidemia, readings in advanced pharmacokinetics-theory, methods and Applications. InTech, Available. 14-284.
- ❖ **EVERETTE J.D., ZELALEM A., WALKER R.B. et ISLAM S. (2014).** Antioxidant activity and phenolic content of orange-fleshed sweet potatoes. *Arkansas Environmental, Agricultural and Consumer Sciences Journal*. 34-38.

### F



- ❖ **FATIMA M., KESHARWANI R.K., MISRA K. et RIZVI S.I. (2013).** Protective effect of the aflavin on erythrocytes subjected to in vitro oxidative stress. *Biochemistry research international*; 1–7.
- ❖ **Favier A., 2003.** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, novembre-décembre, pp : 108-115.
- ❖ **FEJIE A. et CAVAR S. (2014).** Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Some Citrus. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*. 42: 1-4.
- ❖ **Fiorucci S., 2006.** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat, université de Nice-Sofia Antipolis, pp : 19-20.
- ❖ **Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M. (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr*, **61**: 549-554.

### G

- ❖ **Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J. X., & O'Brien, P. J., 2002.** Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, *177*(1), 91-104.
- ❖ **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapy* **3**, 162–169.
- ❖ **Gossiau, A., Chen, K. Y., Ho, C. T., & Li, S. (2014).** Anti-inflammatory effects of characterized orange peel extracts enriched with bioactive polymethoxyflavones. *Food Science and Human Wellness*, *3*(1), 26-35.
- ❖ **Gulçin, I., Huyut, Z.B., Elmastas, M., Hassan, Y. ET Aboul-Eein, d. (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of chemistry*. **3** : 43-53.

### H

- ❖ **HABCHI, R., ALACHAHER, N.** « Dosage des citroflavonoïdes dans le jus et la peau d'orange (Clémentine) ». Diplôme de master en Biologie, Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, 2017.
- ❖ **Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C., Chapelle J.P, (2007).** Le stress oxydant, *Rev Med Liege*; 62: 10: 628-638.
- ❖ **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., & Chapelle J.P., (2007).** Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62(10) : 628-38.
- ❖ **Halliwell B and Gutteridge J M C (2007).** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford (fourth edition). [28] Tang S Y and Halliwell B (2010). Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 1-5.
- ❖ **Hamideche, L., & Nacer Cherif, S. (2016).** *Synthèse bibliographique des effets anti-inflammatoires de la quercétine : Les mécanismes moléculaires* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- ❖ **Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- ❖ **Huang C.L., Sumpio B.E. (2008).** Mediterranean diet and cardiovascular health. *American College of Surgeons*. 207 (03) : 408–416.
- ❖ **Huang, Y.S., Ho, S.C., 2010.** Polymethoxy flavones are responsible for the antiinflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry*. 119, 868-873.
- ❖ **Huet, R. (1962).** Les flavonoïdes d'agrumes. *Fruits*, 17(6), 251-256.

## J

- ❖ **Januel C., 2003.** Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète, étude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, pp : 41-57.
- ❖ **Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G., Hara, Y. (1998).** Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal*, 7: 137-161.

### K

- ❖ **Kahkeshani, N., Farzaei, F., Fotouhi, M., Alavi, S. S., Bahramsoltani, R., Naseri, R., ... & Bishayee, A. (2019).** Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 22(3), 225.
- ❖ **KAMEL Z., ULLAH F., MUMAMMAD A., SADIQ A., AHMAD S., ANWAR Z., HUSSAIN A. et IMRAN M. (2015).** Anticholinesterase and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of *Atriplex laciniata* L.: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. *Biological Research*. 48(21): 1-11.
- ❖ **KARSHEVA M., KIROVA E. et ALEXANDROVA S. (2013).** Natural antioxidants from citrus mandarin peels. Extraction of polyphenols; effect of operational conditions on total polyphenols contents and antioxidant activity. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 48(1) : 35-41.
- ❖ **KARSHEVA M., KIROVAL E., ALEXANDROVA S. et GEORGIEVA S. (2013).** Comparison of Citrus peels as source of valuable components: polyphenols and antioxidants. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 48(5) : 475-478.
- ❖ **KESHARWANI R., SINGH D., MISRA K. et RIZVI S. I. (2012).** Plant polyphenols as electron donors for erythrocyte plasma membrane redox system: Validation through in silico approach. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2(1), 12.
- ❖ **Khanbabae, K., & Van Ree, T. (2001).** Tannins : classification and definition. *Natural product reports*, 18(6), 641-649.
- ❖ **KHENAFU, K. (2017).** *Contribution à l'étude phytochimique de quelques métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes et alcaloïdes) de la racine de Carlina acaulis L. de la région de Tlemcen* (Doctoral dissertation).
- ❖ **Kim H. j.; changw.k; Kim m. k.; Lee S. s., and ChoiB.y. 2002.** Dietary factors and gastric cancer in Korea: a case-control study. *Intrnational journal of cancer*, 97: 531-535.
- ❖ **KLIMCZAK I., MALECKA M., SLACHTA M. et GLISZCZYNSKA-SWIGLO A. (2007).** Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*.10: 313-323.

- ❖ **Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, et al., (1997).** Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 146: 223-30.
- ❖ **Koehler-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- ❖ **Kriaa, S., & Thewis, A. (1999).** Effet de l'addition des tannins de châtaigniers sur la rétention azotée et la digestibilité chez les ruminants ingérant des produits herbagers. *Tropicultura*, 16(1), 26-28.
- ❖ **Kruidenier L, Verspaget H. W (2002).** Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease — radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacologic*, 16 : 1997–2015.
- ❖ **KUMAR H., CHOUDHARY N., VARSHA. KUMAR N, SUMA N. et SETH R. (2014).** Phenolic compounds and their health benefits: A review. *Journal of Food Research and Technology*. 2(2) : 46-59.

### L

- ❖ **Ladoh Y, Dibong, Nyegue, Djembissi T, Lenta N, Mpondo, Yinyang et Wansi (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltés sur *Citrus sinensis*. *J. Appl Biosci*, 84:7636– 7643.
- ❖ **Lalas S., Athanasiadis V., Gortzi O., Bounitsi M., Giovanoudis I., Tsaknis J., Bogiatzis F. (2011).** Enrichment of table olive with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*. 127 : 1521–1525.
- ❖ **Lila, O ; Safia, T (2017).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*. Diplôme de Master en Biologie. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.
- ❖ **Lillo, C., Uunis. And Peter, R. (2008).** Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment*, 31 : 787-601.
- ❖ **Luro, F. (2015).** L'origine des agrumes : leur évolution et la naissance des espèces cultivées. *Jardins de France*, (636), 35-37.

### M

- ❖ **Ma, Y., Chen, J., Liu, D., Ye, X., 2009.** Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts : Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 16, 57-62.
- ❖ **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romande., Lausanne. pp 4-5.
- ❖ **Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002).** Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271-278.
- ❖ **Marzouk, I. (2021).** Activité antioxydante, métabolisme des composants polyphénoliques et méthodes d'étude de l'activité antioxydante .
- ❖ **McMahon, L. R., McAllister, T. A., Berg, B. P., Majak, W., Acharya, S. N., Popp, J. D., ... & Cheng, K. J. (2000).** A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*, 80(3), 469-485.
- ❖ **M'Hiri, N. (2015).** *Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise demi sanguine » et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- ❖ **MIGDAL C ET SERRES M. (2011).** Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant Reactive oxygen species and oxidative stress. *Medicine Science*. 27 : 405-412.
- ❖ **Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat, université de Louis Pasteur, Strasbourg I, pp : 37-36.
- ❖ **MILIND P et DEV C. (2012).** Orange : Range of Benefits. *International Research Journal of Pharmacy*. 3(7) : 59-64.
- ❖ **Mladěnka, P., Macáková, K., Filipský, T., Zatloukalová, L., Jahodář, L., Bovicelli, P., ... & Saso, L. (2011).** In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of inorganic biochemistry*, 105(5), 693-701.

- ❖ **Muzolf-Panek, M., Gliszczyńska-Świgło, A., Szymusiak, H., & Tyrakowska, B. (2012).** The influence of stereochemistry on the antioxidant properties of catechin epimers. *European Food Research and Technology*, 235(6), 1001-1009.

### N

- ❖ **Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goll L., Had-Aissouni L., 2005.** Stress oxydatif cerebral: les astrocytes sont-ils vulnérable aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate, Implications sur la survie neuronale, *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 :502-509.
- ❖ **NAKAJIMA V.M, MACEDO G.A. et MACEDO J.A. (2014).** Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT-Food Science and Technology*. 59 : 1205- 1212.
- ❖ **Nourooz-Zadeh J., Tajaddini-Sarmadi J., Ling K.E., & Wolff S.P., (1996).** Lowdensity lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in plasma. Relevance to determination of total plasma lipid hydroperoxide concentrations. *Biochemical Journal*, 313(3): 781-786.

### O

- ❖ **Oktay M., Gülçin İ., Küfrevioğlu Ö.İ., 2003.** Determination of in vivo antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft UndTechnologies*, 36 : 236-271.
- ❖ **OMOBA O.S., OBAFAYE R.O., SALAWU S.O., BOLIGNON A.A. et ATHAYDE M.L. (2015).** HPLC-DAD phenolic characterization and antioxidant activities of ripe and unripe sweet orange peels. *Antioxidants*. 4: 498-512.

### P

- ❖ **Parrella, E., Gussago, C., Porrini, V., Benarese, M., & Pizzi, M. (2021).** From Preclinical Stroke Models to Humans: Polyphenols in the Prevention and Treatment of Stroke. *Nutrients*, 13(1), 85.
- ❖ **PAVITHRA G.M., SABA S., ABHISHIKTHA S.N et PRASHITH K.T.R. (2013).** Antioxidant and antimicrobial activity of flowers of *Wendlandia thyrsoides*, *Olea dioica*, *Lagerstroemia speciosa* and *Bombax malabaricum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3(6) : 114-120.
- ❖ **Piluzza G., Sulas L. & Bullitta S., 2013.** Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass Forage Sci.*, 69 (1), 1-17.
- ❖ **Pincemail J, Meurisse M, Limet R et Defraigne J O (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*, 4 (5).

## R

- ❖ **RAFIQ S., KAUL R, SOFI S.A., BASHIR N., NAZIR F. et NAIK G.A. (2016).** Citrus peel as a source of functional ingredient. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 30 : 1-8.
- ❖ **RAHMAN T., HOSEN I., TOWHIDUL ISLAM M. M. et UDDIN SHEKHAR H. (2012).** Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3 :997-1019.
- ❖ **Ramful, D.; Bahorun, T.; Bourdon, E.; Tarnus, E.; Aruoma, O.i. (2010).** bioactivephenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278: 75-87.
- ❖ **RAWSON N.E., CHI-TANG H. et SHIMING L. (2014).** Efficacious anti-cancer property of flavonoids from citrus peels. *Food Science and Human Wellness*. 3 : 104-109.
- ❖ **Rejeb, I.** Study of irradiation effect on curcuma polyphenols. Diplôme National d'Ingénieur, Université du 7 novembre à Carthage, 2008.
- ❖ **RIZVI S.I., KUMAR D., CHAKRAVARTI S. et SINGH P. (2011).** Erythrocyte plasma membrane redox system may determine maximum life span. *Medical Hypotheses*, 76(4), 547–549.

- ❖ **Robards E ,1999.** Composés phénoliques et leur rôle dans les processus oxydatifs dans les fruits. *Food Chem.* (66): 401-436.
- ❖ **Robertis F A, Robertis E M H, (1995).** Cell and molecular biology, London, UK Saunders, 239-45.
- ❖ **Rufino, A. T., Costa, V. M., Carvalho, F., & Fernandes, E. (2021).** Flavonoids as antiobesity agents : A review. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 556-585.
- ❖ **Ryma, L. A. B. I. O. D. (2016).** *Valorisation des huiles essentielles et des extraits de Satureja calamintha nepeta : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide* (Doctoral dissertation, Université BADJI Mokhtar Annaba).

### S

- ❖ **Sakakibara H., Honda Y., Nakagawa S., AshidaH., Kanazawa K., (2003)** Simutaneous determination of all polyphenols in vegetables, *fruitsand teas*, *J. Agric. Food Chem.* 51 :571–581.
- ❖ **Sala A., Recio M.D., Giner R.M., Manez S.,Tournier H., Schinella G., Rios J.L., (2002)** Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*, *J. Pharm. Pharmacol.*54 :365–371.
- ❖ **Salunkhe, D. K., & Kadam, S. (1995).** Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing: CRC press.
- ❖ **Savard S., 2005.** Etude de la surexpression in vivo du monoxyde d’azote synthase endothéliale chez le rat urémique : Effets sur la dysfonction endothéliale en insuffisance rénale. Mémoire de l’université de laval, pp : 42-45.
- ❖ **Scheibmier H-d., Christensen K., Whitaker S.H., Jegaethesan J., Clancy R., Pierce J.D., 2005.** A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21:24-28.
- ❖ **SHALABY E.A et SHANAB S.M.M. (2013).** Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 7(10):528-539.
- ❖ **SIMONE S., CONIDI C., URSINO C., CASSANO et FIGOLI A. (2016).** Clarification of orange press liquors by PVDF hollow fiber membranes. *Membranes.* 6(1): 1-15.



- ❖ **Singh, A., Singh, V.K., Quraishi, M.A., 2010.** Effect of fruit extracts of some environmentally benign green corrosion inhibitors on corrosion of mild steel in hydrochloric acid solution. *Journal of Materials and Environmental Science*. 1, 162-174.
- ❖ **Soares A.F., 2005.** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : Adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat, Institut National des sciences Appliquées de Lyon, pp : 35-43.
- ❖ **Sonia, A ; Lemya, B. (2020).** Etude in vitro de l'activité anti hémolytique anti inflammatoire, antioxydante des tanins de l'écorce de la clémentine. Diplôme de master en biologie. Université Abou Bakr balkaid.
- ❖ **STALIKAS D. (2007).** Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 30 : 3268-3295.

### T

- ❖ **Tang S Y and Halliwell B (2010).** Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **394**, 1-5.
- ❖ **TEH S-S., BEKHIT A.E. ET BIRCH J. (2014).** Antioxidative Polyphenols from Defatted Oilseed Cakes: Effect of Solvents. *Antioxidants*. 3 : 67-80.
- ❖ **TRABUT L., 1926** - Revue de botanique appliqué et agriculture colonial bulletin n°60 aout 1926 « des hybrides de citrus nobilis la clémentine » pp484-489
- ❖ **Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007).** Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry*, 104(2), 466-479.

### V

- ❖ **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J.,2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.

- ❖ **Verdan A M, Wang H C, García C R, Henry W P and Brumaghim J L (2011).** Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**, 1314-1322.

### W

- ❖ **Warnimont, M. (2018).** Impact du tanin de chêne ajouté à l'ensilage d'herbe sur l'efficience azotée de vaches laitières.

### X

- ❖ **Xavier Lerverve octobre 2009.** Stress oxydant et antioxydants. Cahiers de Nutrition et de Diététique. Volume 44, N° 5, pages 219-224.

### Z

- ❖ **Zhang y, 2008** – Low concentration of condensed tannin from catch significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells biochemical and biophysical research (371):654-658.
- ❖ **Zineb, B ; Khadidja, B. (2020).** Etude in vitro de l'activité anti-hémolytique anti inflammatoire at anti radicalaire de l'extrait de l'écorce de clémentine. Diplôme de master en biologie. Université Abou Bakr belkaid.