



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de  
la Recherche Scientifique



Université Abou-Bekr Belkaid -Tlemcen-

Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre

Laboratoire de recherche de physiologie, physiopathologie et biochimie de  
la nutrition

Mémoire

pour l'obtention de diplôme de master en biologie

Option : physiologie et physiopathologie cellulaire

THÈME

Etude *in vitro* de l'activité anti-hémolytique, anti-  
inflammatoire, anti-oxydante des tanins de l'écorce  
de la clémentine

Soutenue le : 08-07-2020

présenté par:

- Aissi Sonia
- Aba Lemya

**Devant le jury composé de :**

Présidente:	Mme Germouche B	Maitre de conférences	université Tlemcen
Examineur:	Mme LOUKIDIB	Maitre de conférences	université Tlemcen
Promotrice:	Mme BEKHTI SARI F	Maitre de conférences	université de Tlemcen

Année universitaire: 2019-2020

# *Remerciements*

**A**u terme de ce travail, nous tenons à remercier Allah le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté, et la patience pour bien terminer ce travail. En second plan, nous tenons à remercier nos respectueux professeurs tout au long de notre parcours d'étude. Nous exprimons notre gratitude à notre encadreur *Mme BEKHTI Fadia* pour ses précieux conseils, sa présence et son aide durant toute la durée de travail. Nos profonds remerciements pour les membres des jurys d'avoir bien voulu accepter de faire partie de notre commission d'examen. Enfin nous remercions tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour réussir à terminer notre mission.

*Aba.Lemya et Aissi. Sonia*

## *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail mes chers parent en premier lieu pour leurs soutient et leur sacrifices.

A mes chers frères Abdellatif, Abdallah, Mohammed et Sofiane.

A ma très chère sœur Naima, son mari Mohammed et leurs enfants Brahim, Fatima EL zahra, Youcef et Meriem.

A mes chers oncles, tantes, cousins et cousines.

Un merci tout particulier à l'épouse de mon frère Nawel et ma cousine Asma qui ont ma soutenir avec leurs conseils.

A mes chers collègues, et surtout ma chère binôme Sonia qui a eu patience de me supporter durant ce mémoire, et qui m'a soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus.

A tous les membres des familles ABA et SEFAOUI.

Enfin à tout qui garder la bougie de science allumée...

*Lemya*

***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail en particulier :*

*A mes très chers parents qui ont toujours été un soutien moral et un modèle de labeur et de persévérance ;*

*Ma mère : la plus précieuse, tu nous as toujours soutenues durant toute notre vie, tu n'as jamais cessé de nous encourager et de nous conseiller, ces caractères font de toi une maman exemplaire, adorable et aimable.*

*Mon père : Ta sagesse et franchise font de toi un père aimable, un grand merci pour toi car c'est grâce à ton soutien que j'ai pu terminer ce travail et mes études, tu été toujours avec moi et tu seras toujours là pour moi, avec mes vœux que tu sois toujours fière de nous*

*Que dieu vous garde le plus longtemps possible et j'espère que vous trouverez dans ce travail toute ma reconnaissance et mon amour*

*A mes cher sœur : Sarah et Rania pour leurs patience et leurs soutien qui ma porté au cours de mes années d'étude*

*A mes amis Khadija, Zineb, Bouchra qui ont été toujours là pour moi, c'était un grand plaisir de vous rencontré et un grand merci à mon binôme Lamia qui ma supporté au long de ce travail*

*Enfin Je remercie tous qui nous ont poussés dans la bonne voie, celle du travail et de la patience et tous ceux qui me connaissent de près ou de loin*

*Sonia...*

## **Table des matières**

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

## Partie1 : Synthèse bibliographique

I. Les agrume .....	1
I.1. Généralités sur les agrumes :.....	1
I.2.Origine du mot agrume : .....	1
I.3.Aire d'origine et histoire de la diffusion des agrumes:.....	2
II. L'orange : .....	2
II.1 L'origine du mot orange : .....	2
II.2 Origine et histoire de l'orange :.....	3
II.3 Les espèces et les principales variétés : .....	3
III.Clémentine :.....	4
III.1.Généralité : .....	4
III.2.Historique de la clémentine : .....	5
III.3.Origine génétique : .....	5
III.4. Développement et diversification : .....	5
III.5. Taxonomie botanique de la clémentine : .....	6
III.6. Descriptions botanique des clémentiniers :.....	6
III.7.Composition d'un fruit de clémentine : .....	6
III.8.Valeur nutritionnelle de la clémentine :.....	7
III.9. Quelques variétés de clémentine: .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
III.10.Bienfaits de la clémentine :.....	10
IV.Les composées phénoliques.....	10
IV.1.Generalities des polyphénols : .....	10
IV.2.Classification des polyphénols :.....	11
IV.3.Propriétés thérapeutiques des polyphénols : .....	11
IV.4.Tanins :.....	12
1. Généralité sur les tanins :.....	12
2.Classification des tanins : .....	12

a) Tanins hydrolysables :.....	13
b)Tanins condensés :.....	13
c)Tanins complexes : .....	14
d)Les phlorotanins : .....	14
3.Propriétés physicochimiques : .....	14
4.Activités therapeutiques des tanins : .....	15
<b>V.Constituants du sang physiologie et de l'hémolyse sanguine.....</b>	<b>15</b>
V.1 Composées biochimiques du sang :.....	15
V.2. Les constituants du sang : .....	16
V.3.Les éléments figurés (Globules rouges) :.....	17
□ Stabilisation membranaire des globules rouges :.....	17
V.4.Hémolyse et anémie hémolytique : .....	17
V.5.Les signes cliniques :.....	18
V.6.Les anti-hémolytiques : .....	18
V.7.Réaction anti-inflammatoire: .....	19
1.Définition de processus inflammatoire :.....	19
2.Signes cliniques de l'inflammation :.....	20
3.Les médiateurs chimiques de l'inflammation : .....	21
4. L'inflammation et inhibition de la dénaturation protéique : .....	21
5.Agents anti- inflammatoires : .....	21
A)Les anti-inflammatoires stéroïdiens :.....	21
B)Quelques anti- inflammatoires stéroïdiens :.....	22
C)Anti-inflammatoires non stéroïdien :.....	22
6. Plantes à activité anti-inflammatoire:.....	23

## **Partie 2: Matériel et méthodes**

I. Extraction sélective des tanins :.....	25
I.1 Préparation du matériel végétal : .....	25
I.2.Préparation des extraits de peau sèche de clémentine : .....	25
I.3.Optimisation des paramètres d'extraction de la matière grasse par SOXLHET : .....	25
I.4.Phase d'extraction des tanins :.....	26

I.5. Protocole d'extraction sélective des tanins :.....	28
II. Test de cytotoxicité : .....	29
II.1.Principe :.....	29
II.2. Préparation des dilutions de l'extrait (tanins) et de l'acide gallique : .....	29
II.3.Préparation de la suspension des globules rouges humain :.....	29
III. Test anti-hémolytique.....	30
III.1. Principe :.....	30
III.2. Mode opératoire : .....	30
IV. Test anti inflammatoire .....	31
IV.1. Principe : .....	31
IV.2. Mode opératoire :.....	31
V. Détermination de l'activité anti radicalaire par piégeage due radical DPPH .....	32
V.1. Principe :.....	32
V.2. Mode opératoire : .....	33

### **Parite 3: Résultats et interprétation**

I. Test de cytotoxicité :.....	35
II. Evaluation de l'activité anti-hémolytique in vitro par la méthode de stabilité membranaire des globules rouge : .....	36
III. Étude d'activité anti-inflammatoire in vitro sur des tanins :.....	39
IV. valuation de l'activité anti radicalaire par piégeage de radical DPPH :.....	40
Discussion .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Conclusion	
Résumé	

### **Liste des figures**

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
---------------	-------------

<b>Figure 1</b> : Pourcentages de la production mondiale des principaux groupes d'agrumes commercialisés pour l'année 2012	<b>01</b>
<b>Figure2</b> : Origine et géographiques et diffusion des agrumes dans le monde	<b>02</b>
<b>Figure 3</b> : Photo de fruit <i>Citrus sinensis</i>	<b>03</b>
<b>Figure 4</b> : Hybridation entre certain espèce d'oranges	<b>05</b>
<b>Figures 5</b> : Fleurs,aquartier et arbre clémentinier	<b>06</b>
<b>Figure 6</b> :Shématisation de la structure de la clémentine	<b>07</b>
<b>Figure 7</b> :Les principales classes de polyphénols	<b>11</b>
<b>Figure 8</b> : Types de tanins	<b>12</b>
<b>Figure 9</b> : Structure de tanin hydrolysable	<b>13</b>
<b>Figure 10</b> : Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés	<b>13</b>
<b>Figure 11</b> : Les trois principaux phlorotanins	<b>14</b>
<b>Figure 12</b> : Schématisation du sang après centrifuge à gauche et composition du sang à droite	<b>16</b>
<b>Figure 13</b> : Classification des anémies hémolytiques	<b>18</b>
<b>Figure 14</b> : Les différentes causes de l'inflammation et ses conséquences pathologiques	<b>19</b>
<b>Figure 15</b> : Les médiateurs sécrétés lors de lésion tissulaire	<b>21</b>
<b>Figure 16</b> : Axe hypothalamo -hypophyse –surrénalien	<b>22</b>
<b>Figure 17</b> : Schéma représentant l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens	<b>23</b>

<b>Figure 18:</b> Photographe de la clémentine à gauche, écorce de clémentine séchée à droite	<b>25</b>
<b>Figure 19 :</b> Schématisation de l'appareil de SOXLHET	<b>26</b>
<b>Figure 20 :</b> Macération du tourteau à gauche, filtration après macération à droite	<b>26</b>
<b>Figure21 :</b> Evaporation par la rotavapeur	<b>27</b>
<b>Figure 22 :</b> Lavage par le dichlorométhane à gauche, lavage par l'acétate d'éthyle à droite	<b>27</b>
<b>Figure 23 :</b> La démarche d'extraction des tanins à partir d'une écorce de clémentine	<b>29</b>
<b>Figure 24:</b> (A) Teste cytotoxicité à différentes concentrations de tanin sur les globules rouges  (B) Test de cytotoxicité à différentes concentrations d'acide gallique sur les globules rouges	<b>30</b>
<b>Figure 25 :</b> Test de cytotoxicité des tanins et d'acide gallique à différentes concentrations dans la plaque ELIZA	<b>31</b>
<b>Figure 26:</b> (A) Différentes concentrations des tanins incubés avec globules rouges  (B) Lecteur de plaque ELIZA	<b>32</b>
<b>Figure 27:</b> Réaction du DPPH <sup>+</sup> avec un antioxydant	<b>35</b>
<b>Figure28 :</b> Effet des différentes concentrations dans sur la cytotoxicité des globules rouges	<b>35</b>
<b>Figure29 :</b> Comparaisons des différentes concentrations en acide gallique et tanins sur la cytotoxicité des globules rouges	<b>36</b>
<b>Figure30 :</b> Effet des différentes concentrations des tanins sur le taux d'hémolyse	<b>37</b>

<b>Figure 31:</b> Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et les tanins	<b>37</b>
<b>Figure 32:</b> Comparaison de taux d'hémolyse entre le dichlofénac et tanins	<b>38</b>
<b>Figure 33:</b> Comparaison du taux d'hémolyse entre le diclofenac, l'acide gallique et les tanins	
<b>Figure 34:</b> Taux d'inhibition de la dénaturation protéique par les tanins	<b>38</b>
<b>Figure35 :</b> Comparaison du taux d'inhibition de la dénaturation protéique entre le dichlofénac et les tanins	<b>39</b>
<b>Figure36 :</b> Réduction de l'absorbance en fonction du temps	<b>40</b>

## Liste des tableaux

Tableau	Page
---------	------

<b>Tableau n°1</b> : Principales variétés d'orange	<b>04</b>
<b>Tableau°2</b> : Taxonomie de Clémentine	<b>06</b>
<b>Tableau n°3</b> : Valeur nutritive de la clémentine (pour 100g de clémentine)	<b>08</b>
<b>Tableau n°4</b> : Caractéristique de quelque type de clémentine	<b>09</b>
<b>Tableau n°5</b> : Mesures d'éléments constitutives du sang	<b>16</b>
<b>Tableau n°6</b> : les médiateurs activant les signes inflammatoires	<b>20</b>
<b>Tableau n°7</b> : Action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes	<b>22</b>

## **Liste des abréviations**

<b>FAO :</b>	Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
<b>Ag :</b>	Antigène
<b>UV :</b>	Ultraviolet
<b>BSA :</b>	albumine de sérum bovin
<b>DPPH :</b>	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle
<b>ACTH :</b>	adrénocorticotrophine
<b>CRH :</b>	corticotropin-releasing -hormone
<b>(COX 1):</b>	cyclooxygénase 1
<b>(COX 2):</b>	cyclooxygénase 2
<b>ATP:</b>	adénosine triphosphate
<b>NADPH:</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>GRH :</b>	gonadotropines hypophysaires
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> :</b>	acide phosphorique phosphate d'hydrogène
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> :</b>	ion dihydrogéné orthophosphate
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> :</b>	l'ion bicarbonate
<b>NaCl:</b>	chlorure de sodium
<b>AC :</b>	absorbance du contrôle
<b>At :</b>	absorbance du test
<b>DO :</b>	densité optique
<b>HCl :</b>	acide chlorhydrique
<b>GRh :</b>	globule rouge humain

# Introduction

## Introduction

---

Depuis une trentaine d'années, la production mondiale des agrumes a eu un accroissement extrêmement rapide. Les principaux pays producteurs sont : les Etats-Unis, Brésil, Espagne, Italie, Palestine, Japon, Australie, Union sud-africain et les pays de littorale méditerranéenne (*Forelicher, 2010*). L'agrumiculture en Algérie remonte à une époque lointaine à partir de XIV<sup>ème</sup> siècle à l'arrivée des musulmans d'Andalousie. La production algérienne d'agrumes pour l'année 2016 estimée de 13724000 tonnes, avec une 1025.5 milles tonnes d'orange. Elle occupe la 2<sup>ème</sup> place dans la région nord-africaine et la 4<sup>ème</sup> dans la région méditerranéenne selon des études préliminaires pour l'année 2016 (*FAO, 2016*).

Les écorces des agrumes, sont les parties non comestibles des agrumes et constituent les déchets d'agrumes. Les écorces d'agrumes sont très riches en composés bioactifs, particulièrement les composés phénoliques et flavonoïdes naturels à haute propriétés pharmacologiques comparés à la portion comestible (*Ma et al, 2009*). Ils sont utilisés aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie sous forme d'infusion en générale, pour traiter certaines maladies graves telles que les cancers, les crises d'épilepsie, hypertension...etc (*Iserin, 2001*).

La clémentine est un type d'agrumes apparu lors d'un croisement naturel entre un mandarinier et un orange à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle originaire d'Afrique du nord puis s'est diversifié par sélection clonale de mutant somatique (*Chahidi, 2008*). Riche en molécules organiques impliquées dans le développement, la croissance et maturation tissulaire. Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude phytochimique de ses agrumes et leurs vertus thérapeutiques en raison de leurs richesses en substances actives issues de métabolisme secondaire (*Iserin, 2001*). Ceci est notamment le cas des polyphénols végétaux qui sont largement utilisés en thérapeutique comme anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires, ils sont une autre source importante pour une grande variété d'antioxydants naturels. Parmi ces polyphénols, les tanins sont très riches en groupement hydroxyle capable de piéger les radicaux libres ce qui leur confère une activité antioxydante. Ces composés présents dans les écorces des fruits de quelques plantes constituent une source intéressante en composés bioactifs qui méritent des investigations. L'écorce de la clémentine est riche en tanins ce qui constitue d'elle une source de composé bioactif permettant la valorisation de l'écorce (*Gulçin et al., 2010*).

L'objectif de la présente étude est d'extraire les tanins de l'écorce de la clémentine (*Citrus clementina*) afin d'évaluer leurs activités anti-hémolytiques, l'anti-inflammation et anti-radicalaire.



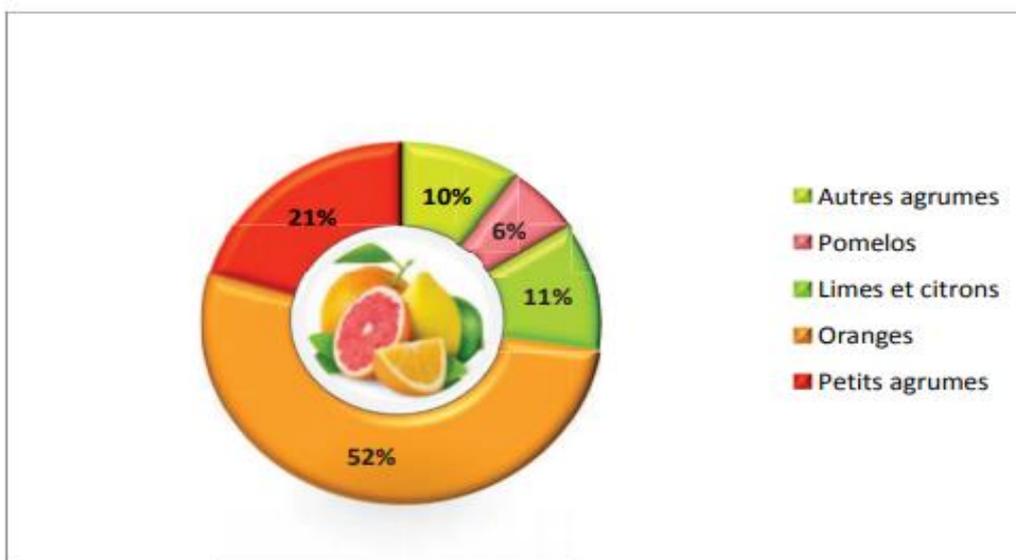
# Synthèse Bibliographique

## I. Les agrumes :

### I.1. Généralités sur les agrumes :

Les agrumes représentent une source important pour l'humanité, qu'il s'agisse du point de vue nutritionnel, économique ou culturel. De puis plusieurs millénaires, ils ont investi le monde, la religion, la médecine et la vie culinaire avant d'envahir le monde(*Tanaka, 1977*)

Les agrumes sont des fruits présentant la première production fruitière mondiale (115 millions de tonnes par an) en 2007 (source FAO). Cette production n'arrête d'augmenter au cours des dernières décennies, les importants producteurs sont le Brésil (20 MT), le bassin méditerranéens (20 MT), la Chine (19,6 MT) et les USA (10MT) (*FAO, 2014*).



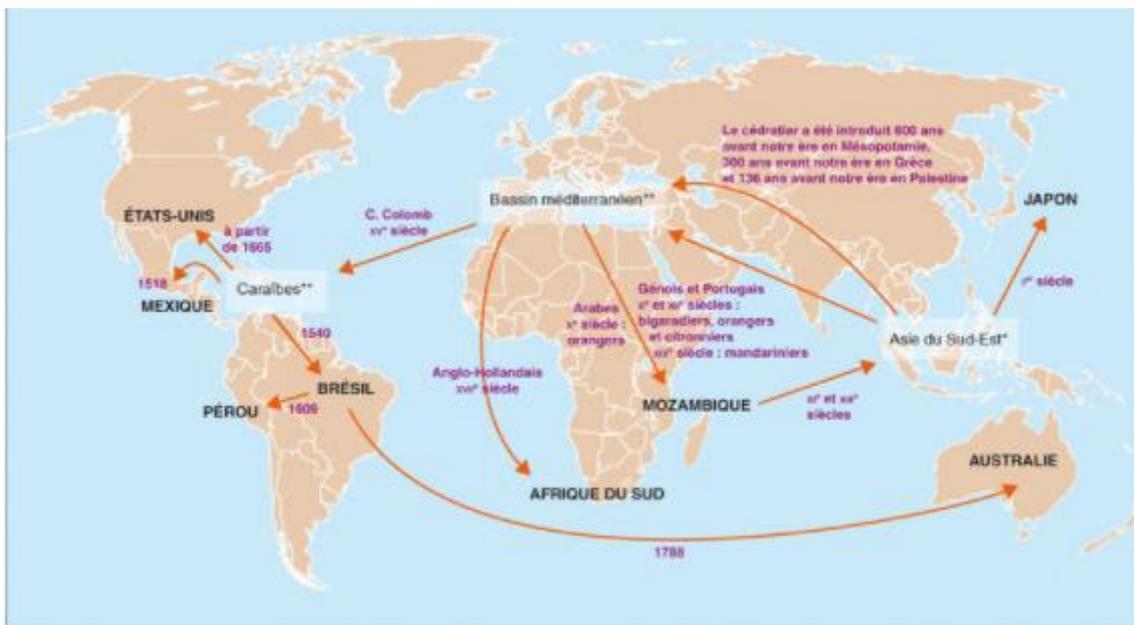
**Figure 1 :** Pourcentages de la production mondiale des principaux groupes d'agrumes commercialisés pour l'année 2012 (*FAO, 2014*).

### I.2. Origine du mot agrume :

Le mot « agrumes » en français, dérive du latin acrumen qui désignait les fruits acides (*Couplan, 2012*). Les agrumes également connus sous le nom « citrus » (*liu et al., 2012*). Appelés aussi hespéridés sont des petits arbres, dont la taille peut varier de 2 à 10mètres de haut, produisant des fruits caractérisés par une surface de peau (zest) riche en glandes à huiles essentielles et une pulpe organisée en quartiers comprenant des pépins(*Bénédicté & Michel, 2004*). Le genre citrus a été créé par Carl Linneaus en 1753 (*Xianonengli, 2010*) puis a été diversement écrit comme comprenant de 1 à 162 espèces, les autres génotypes proviennent de l'hybridation entre ses vraies espèces (*Liu et al, 2012*).

### I.3. Aire d'origine et histoire de la diffusion des agrumes:

Les agrumes qui sont des zones d'Asie tropicale et subtropicale, ont été distribués au cours des siècles dans différentes régions du monde. Leur apparition dans le bassin méditerranéen est très ancienne et remonte aux échanges entre l'Orient et l'Occident occasionnés par les négoce qui ont accompagné la route de la soie bien avant l'ère chrétienne. Ultérieurement, les contacts établis par les navigateurs du XV<sup>e</sup> siècle ont conduit à amplifier la propagation de ces arbres qui ont souvent été ensuite redistribués vers les zones tropicales d'Afrique et d'Amérique à partir l'Europe (*Aubert, 1997*).



**Figure2 :** Origine géographique de diffusion des agrumes dans le monde (*Jacquemonde, 2013*)

## II. L'orange :

### II.1 L'origine du mot orange :

Le mot « orange » viendrait lui du mot nar, parfum, puis naranga en sanscrit, repris en langue perse puis en arabe, d'où naranja en espagnol ou arancia en italien (à la suite de la disparition du « n » initial du fait de l'utilisation de l'article « un'arancia»). C'est vers 1350 que le nom « orange » est apparu dans la langue française certainement influencé par le nom de la ville d'Orange. C'est d'ailleurs le fruit qui donna son nom à la couleur et non l'inverse (*Chevalier, 1947 ; Curk, 2014*).



**Figure 3** : photo de l'orange « *Citrus sinensis*. »

<https://www.aujardin.info/plantes/citrus-sinensis.php>

### **II.2 Origine et histoire de l'orange :**

L'orange est apparu au XIII<sup>e</sup> siècle. L'oranger (*Citrus sinensis*) est originaire de Chine, il est cultivé en Asie depuis plus de 40000 ans. On peut distinguer deux grands chemins de distribution de ce fruit en Europe, la route méditerranéenne fut empruntée à l'époque des croisades (XI<sup>e</sup> siècle-XIII<sup>e</sup> siècle) par l'orange amère ou bigarade transmis par les Perses aux Arabes, ce fruit fut implanté en Andalousie, Sicile et València d'où il se diffusa vers le reste de l'Europe. A la fin du XV<sup>e</sup> siècle, les navigateurs portugais découvrirent l'orange douce en Chine et la rapportèrent en Europe (*Liu et al, 2012*).

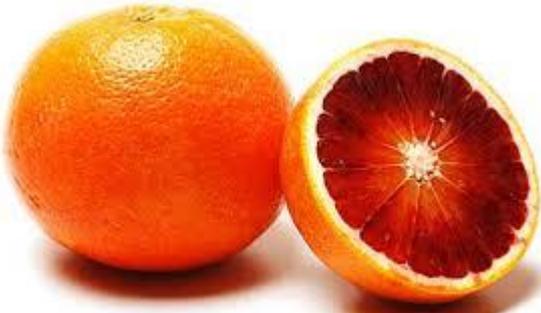
### **II.3 Les espèces et les principales variétés :**

L'orange fait partie du genre *Citrus* de la famille des Rutaceae. Le genre *Citrus* contient deux espèces d'orange. La première, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, correspond aux oranges douces, la deuxième *Citrus aurantium* L correspond aux oranges amères. Ces dernières sont également appelées bigarades, elles sont peu comestibles et leur utilisation est principalement réservée à la production de marmelades ou d'huiles essentielles (*Kimballi, 1999*).

## Synthèse bibliographique

---

Tableau n°1 : Principales variétés d'orange.

<p style="text-align: center;"><b>Les oranges blondes(11)</b></p> 	<p>Orange a chair fine, d'un calibre moyen, sans pépins, très juteuse et parfumée (<i>Fanciullino et al., 2008</i>)</p>
<p style="text-align: center;"><b>Les oranges navals(12)</b></p> 	<p>Est un fruit caractérisé par la présence d'une petite excroissance « ombilic » ou « navel » en anglais dans leur partie inférieure est quasi absence de pépins. Ces oranges sont les plus consommées en fruits de bouche. Elles sont moins juteuses que la plupart des autres variétés et elles développent une certaine amertume lors du pressage ce qui peut les rendre impropres à une production de jus (<i>Kimballi, 1999</i>).</p>
<p style="text-align: center;"><b>Les oranges sanguines(13)</b></p> 	<p>Caractérisées par leur chair colorée due à des pigments rouges, des anthocyanes, il s'agit des oranges faiblement acides, encore appelées oranges douceâtres. Ces oranges sont consommées en fruits de bouche. Les principales variétés des catégories navels, blondes, sanguines et douceâtres (<i>Berlint, 2016</i>)</p>

### III. Clémentine :

#### III.1.Généralité :

Le clémentinier est un arbuste fruitier de type agrume de famille des orangeries, son nom latin *Citrus clémentina* (*swingle, 1967*). Le climat méditerranéen convient à la culture des clémentiniers car elles exigent une température douce (*Mutin, 1969*). La clémentine est le fruit star de la saison entre l'automne et l'hiver de novembre jusqu'à janvier (*Poulain, 2013*).

## III.2. Historique de la clémentine :

Apparu à la fin du XIX siècle à Misserghin, petit village situé à une vingtaine de kilomètres au sud Ouest d'Oran en Algérie, faite par le père Clément Rodier (Vincent Rodier 1839-1904) dans le jardin de l'orphelinat de La père du Saint-Esprit à Misserghin (*Hodgson, 2007*). La première description officielle de clémentine est publiée en 1902 par le professeur Louis Charles Trabut dans la revue Horticole française (n°10 du 16 Mai 1902) en la classant avec les orangers et nommé en hommage à son découvreur (*Jacquemond, 2013*).

## III.3. Origine génétique :

La clémentine résulte d'une rencontre entre un grain de pollen et un ovule, la mandarine est le parent femelle de cet hybride et le pollinisateur est un orange type (*Citrus sinensis* Osb), un pollinisateur produit des millions de grains de pollen génétiquement différents et un arbre mère porte des millions d'ovules génétiquement différents. Le fruit de clémentine est sans pépin donc stérile, sa multiplication se fait essentiellement par multiplication végétative (greffage) (*Fantaine, 2016*). Tous les clémentiniers cultivés aujourd'hui dans le monde sont donc des individus multipliés par greffage ou des bouturages successifs à partir de l'arbre unique de frère clément (*Jacquemond, 2013*).

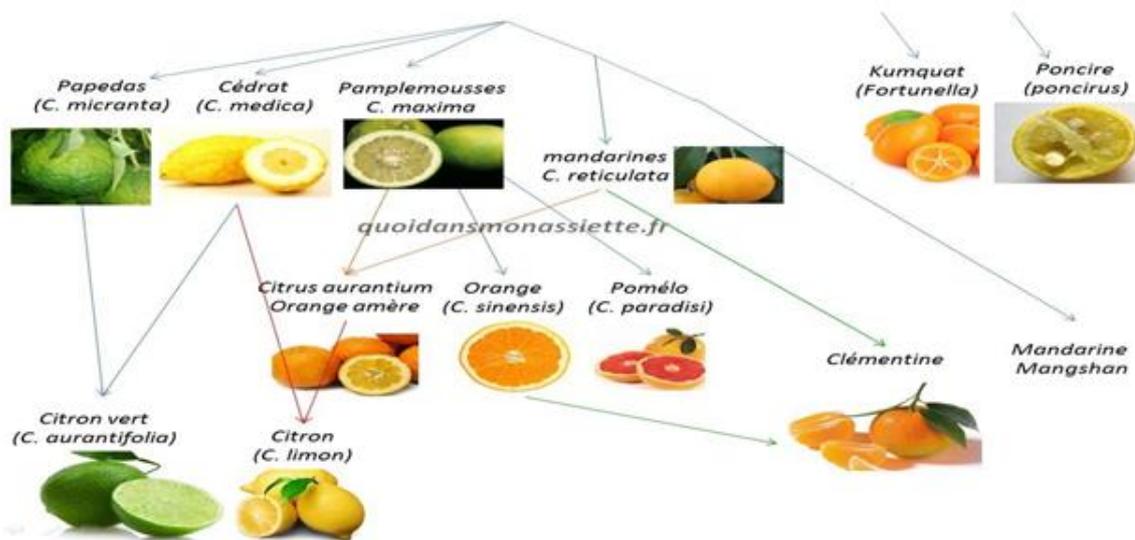


Figure 4: Hybridation entre certaines espèces d'oranges (*Barkley et al, 2006*)

## III.4. Développement et diversification :

En 1925, la clémentine est cultivée dans les champs d'Oran puis dans la plaine de la Mitidja, en 1990. Elle est cultivée à la coopérative des agrumes de Boufarik, puis aux Halles de Paris et s'étend à l'ouest de la Méditerranée (Alger, Tunisie, Maroc, Espagne, Italie) (*Jacquemond, 2013*). Le rendement de récolte des clémentiniers en Algérie a été de 100 000 tonnes en 2007 (*Biche, 2012*), aujourd'hui la production de clémentines est de près de 4 millions de tonnes,

## Synthèse bibliographique

---

dont la majeure partie est commercialisé sur les marchés intérieurs de pays producteur. La production mondiale de clémentine atteint 15,4 millions de tonnes en 2010 et c'est propager en chine, japon, brésil, Turquie et plus récemment aux Etats-Unis (*Spreen, 2010*).

### III.5. Taxonomie botanique de la clémentine :

Règne :	Végétal
Classe :	Eudicolèdones
Sous classe :	Rosidées
Famille :	Rutacées
Sous famille :	Aurantioideae
Genre :	Citrus
Espèce :	Clémentina

**Tableau°2 :** Taxonomie de Clémentine (*Breto et al, 2001*).

### III.6. Descriptions botanique des clémentiniers :

Arbre fruité de taille plus élevé de 3 mètres environ et d'apparence d'un mandarinier mais avec des feuillages plus foncé de longueur de 14 cm. La floraison ce fait à la période entre printemps/été avec des fleurs de couleur blanche. Le fruit de clémentinier est un fruit vert à maturité qui ne devient orange que sous l'effet de la baisse de température hivernale, de poids de 60g, de peau qui se détache facilement et qui contient des grosses glandes à essence coloration rouge vif. La pulpe à coloration très douce même avant maturité, chaires juteuse acidulé, parfum de mandarine légèrement musqué et absence des pépins (*Trabut, 1926*).



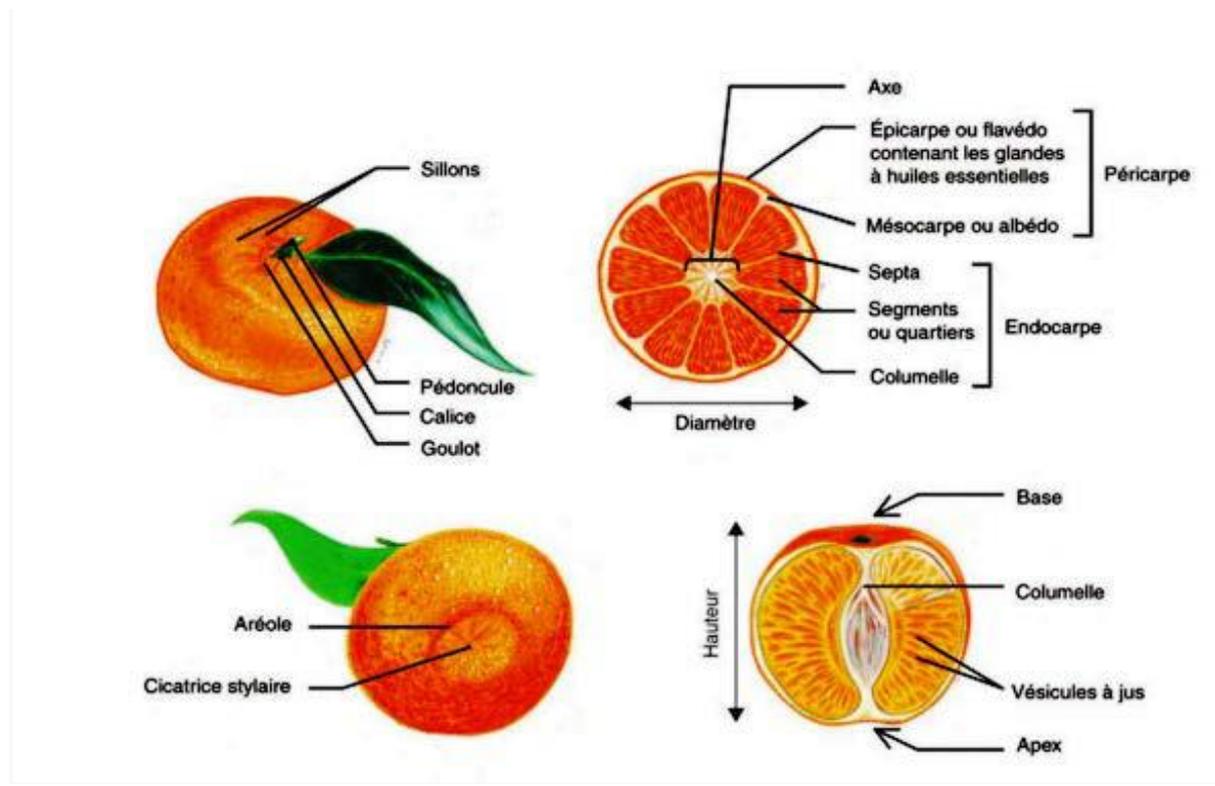
**Figures 5:** Fleurs,aquartier et arbre clémentinier

### III.7.Composition d'un fruit de clémentine :

## Synthèse bibliographique

Les clémentines sont composées de deux régions morphologiquement distinctes principales :

- Le péricarpe (pelure ou zeste) : constitué de l'exocarpe (flavédo) la partie coloré externe qui prend la couleur orange foncé et le mésocarpe (albédo) la couche blanche de la peau.
- L'endocarpe (pulpe) : qui est la partie comestible du fruit, composé de segments et de locule ovarien enfermé dans une membrane loculaire et remplis de vésicules de jus (*Domingo et al, 2007*).



**Figure 6 :** Schématisation de la structure de la clémentine(*Curk, 2013*)

### III.8.Valeur nutritionnelle de la clémentine :

La pulpe de fruit est composée de 85 à 90% , le reste sont des composés organiques des sucres solubles, des acides organiques dont la vitamine C, des acides aminée, pectine et des composées secondaires (flavonoïdes, anthocyanes, caroténoïdes) et de minéraux (*Genord, 2001*).

## Synthèse bibliographique

---

**Tableau n°3:** Valeur nutritive de la clémentine (pour 100g de clémentine) (*Tighilet, 2014*).

Elements nutritifs	valeur nutritive
Teneur en eau (%)	86.9
Energie (cal)	46
Glucides (g)	10.5
Protéines (g)	0.7
Lipides (g)	0.2
Calcium (mg)	26
Fer (mg)	0.35
Potassium (mg)	145
Sodium (mg)	Traces
Provitamines A (IU)	330
Thiamine B (mg)	0.03
Vitamine C (mg)	41
Polyphenol= totaux (mg)	190

\*UI Unité International

### III.9. Quelques variétés de clémentine :

Tableau n°4 : Caractéristique de quelque type de clémentine.

Types	Caractéristiques
<p data-bbox="395 479 635 517">Clémentine Nules</p> 	<p data-bbox="852 479 1410 629">Défecté en Espagne en 1953, de taille relativement importante, écorce épaisse, facile à pelé, chaire juteuse, gout équilibré acide/sucré.</p>
<p data-bbox="395 736 635 775">Clémentine Nour</p> 	<p data-bbox="852 736 1410 842">Cultivé au Maroc, écorce rugueuses qui ce détache facilement, saveur doucement sucré</p>
<p data-bbox="395 1005 635 1043">Clémentine Caffin</p> 	<p data-bbox="852 1005 1394 1111">De couleur rouge vif tendant vers le rouge, très juteuse, gout acidulé, peu ou pas de pépins</p>
<p data-bbox="379 1274 651 1312">Clémentine Orogrós</p> 	<p data-bbox="852 1274 1394 1424">Découvert en 1996 par Vincent Arnault en Espagne, fruit orange vif avec reflet rougeâtre, facile à cueillit avec chaire juteuse</p>
<p data-bbox="347 1554 683 1592">Clémentine Hermandina</p> 	<p data-bbox="852 1554 1394 1637">Peau mince très fine, pratiquement sans pépins avec écorce orange foncé</p>

### III.10. Bienfaits de la clémentine :

Les éléments nutritifs et non nutritifs dans les agrumes leurs attribues des vertus protectrices contre un certain nombre de maladie tel que les maladies cardiovasculaire, le cancer, les maladies neuro-dégénératives..etc. Les études ont montré une association entre l'apport de vitamine C (500mg/jour) et la protection contre la mortalité cardiovasculaire qui est provoqué par un niveau élevé de lipoprotéines de basse densité (LDL) (*Yaich, 2014*). La prévention des cancers grâce aux effets protecteurs de la vitamine C et les citroflavonoïdes qui ont démontré 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 anti-tumorales. La consommation régulière des agrumes peut aider à fournir suffisamment de folate nécessaire à réduire le risque de mal formation congénitale (tube neurale). Ainsi, un rôle à prévenir des anémies car la vitamine C augmente l'absorption du fer non hémique et des maladies asmathiques car la vitamine C représente une substance anti-oxydante présente dans le liquide de surface des voies pulmonaires protégeant ainsi contre l'oxydation. Effets anti-mutagène photo-protecteur contre les rayons UV à l'origine des différentes mutations de l'ADN (*Economos et al, 1999*). Un rôle dans la production régulière des larmes pour éviter le séchage oculaire des yeux avec la vitamine E et C et la vitamine A contre la dégradation des fonctions visuelles (*Ounnoghene, 2007*). On peut citer aussi les maladies neuro-dégénératives comme l'Alzheimer lié à l'âge car les clémentines sont riches en polyphénols et vitamines à caractères anti-inflammatoire et antioxydant (*Lecerf, 2014*).

### IV. Les composées phénoliques

#### IV.1. Généralités des polyphénols :

Les polyphénols sont des molécules aromatiques, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton. Ils forment une immense famille de plus de 8000 composées (*Bahorun, 1997*). L'élément structural fondamentale qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique lié au moins un groupe hydroxyle (*Ikbal, 2006*). Localisés essentiellement dans les tissus épidermiques des végétaux et appartient à leurs métabolisme secondaire, les polyphénols peuvent intervenir dans l'aspect de physiologie de plante : lignification, régulation de la croissance et l'interaction des plantes avec leurs environnements biologique et physique (résistance au UV, aux bactéries et aux insectes) en plus d'améliorer les critères de qualité (couleur, astringence, amertume et qualité nutritionnel) (*Jacques et al, 2005*).

## IV.2. Classification des polyphénols :

Les polyphénols sont divisés en différentes classes selon leurs structures chimiques de base (*Asensi et al., 2011*) :

- Les acides phénoliques : Sont les composés les plus simples et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (*Boubekri, 2014*) .
- Les flavonoïdes : Sont largement présentes dans les plantes notamment les fruits et légumes plus de 4000 types de flavonoïdes différents été identifié : flavonol, flavonone, anthocyanine, isoflavone (*Herto , 1993 ; Bruneton, 1999*).
- Les tanins et lignines et plus rarement les coumarines, les stilbenes (*Boubekri, 2014*).

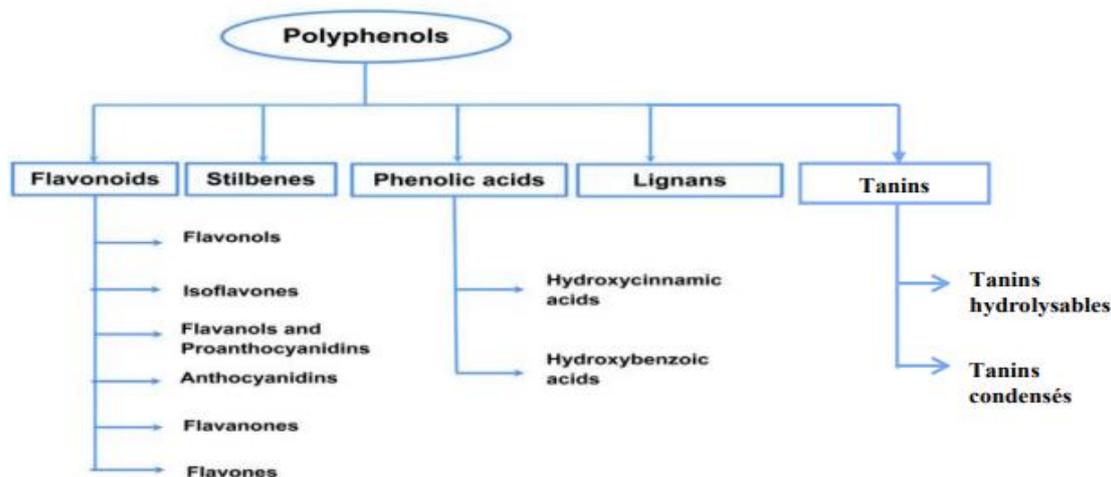


Figure 7 : Les principales classes de polyphénols (*Olivier et al., 2016*)

## IV.3. Propriétés thérapeutiques des polyphénols :

Les polyphénols possèdent une large activité biologique in vitro (Antibactériennes, Anticancérogène, Anti-inflammatoire... etc.) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques. Les polyphénols présentent ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires (*Sabihi, 2013*). Ces composés jouent un rôle important dans la qualité alimentaire des fruits et une molécule déterminante de saveurs (les tanins sont l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs et les flavones donnent la saveur sucrée). Ainsi, ils pourraient constituer une alternative à l'utilisation des additifs alimentaires synthétiques (*Druyne et al, 1999*), activité antigrippale et anti-herpétique grâce aux nombreux groupes hydroxyle sur les phénols responsables de leurs activités antivirales (*Iqbal et al, 2006*).

## IV.4. Tanins :

### 1. Généralité sur les tanins :

Les tanins occupent une position de premier plan parmi les polyphénols végétaux, non seulement en raison de leurs présences répandue dans le règne végétal, mais aussi en raison de leurs importances technologiques, écologiques et médicale (*Seth, 2000*). Les tanins sont un groupe de composés phénoliques polymères avec un poids moléculaire de 500 à 3000 dalton, présents dans la nature, trouvé dans presque toutes les parties de la plante (tige, feuille, fruit ou graine). Les tanins possèdent la propriété de tanner la peau en cuire, c'est à dire la rendre plus dure et imputrescible en se fixant sur les protéines (*Cown, 1999*). La structure chimique des tanins leur confère une capacité très développée à se fixer sur toute sorte de molécules essentiellement protéines (*Zimmer, 1996*). A ce jour, plus de 1000 molécules de tanins ont été identifiés. Ils sont des métabolites secondaires des plantes supérieures qui jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les prédateurs (*Blain, 1998*).

### 2. Classification des tanins :

Selon une définition classique, les tanins végétaux sont commodément subdivisés en tanins condensés (appelés proanthocyanidines) qui sont d'origine flavonoïde et en tanins hydrolysables qui sont caractérisés par un groupement central (dans la plupart des cas D -glucose) dont les fonctions hydroxyles sont estérifiées à l'acide gallique (*Gross, 1999*).

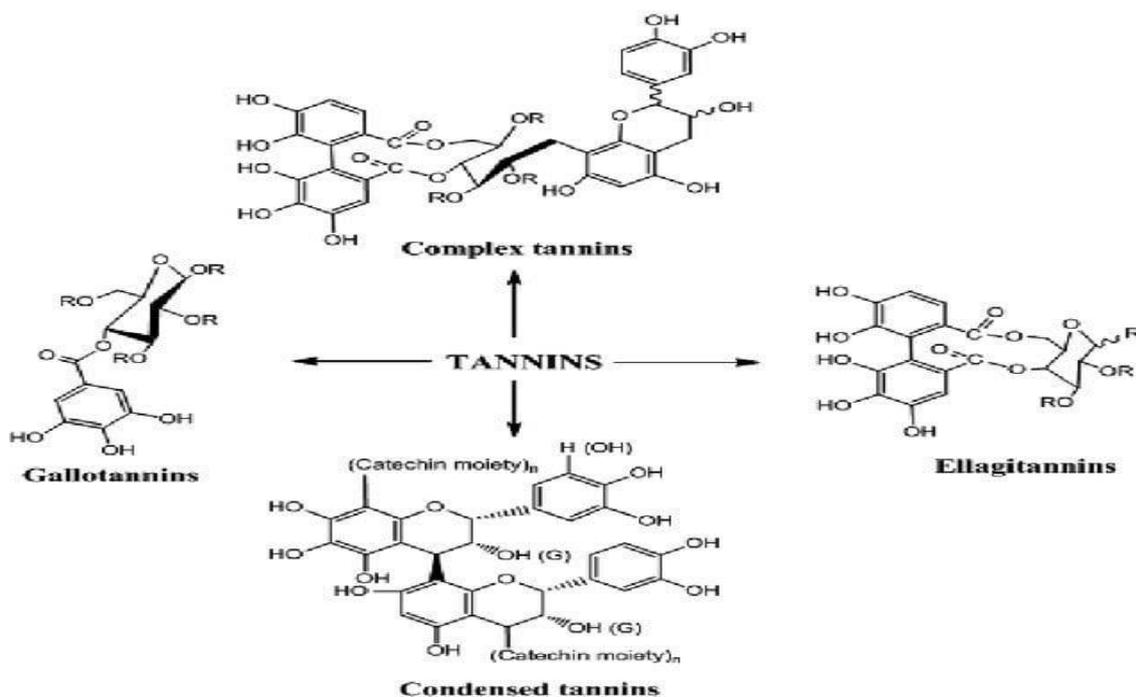


Figure 8 : Types de tanins ( *Khanbabee, 2001* )

### a) Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont généralement présents en faible quantité dans les plantes (*Shwangzaw, 2016*). Ils sont des esters de sucre simple (glucose ou xylose). L'hydroxyle des groupes de ces glucides sont partiellement ou totalement estérifiés avec des groupes phénoliques comme l'acide gallique (gallotannins) ou acide ellagique (ellagitanins) ce qui les subdivise en deux sous classes :

- Soit l'acide gallique, on parle alors de tanins galliques
- Soit l'acide ellagique, qui est un dimère d'acide gallique, on parle alors de tanins ellagiques (*Zimmer, 1996*).

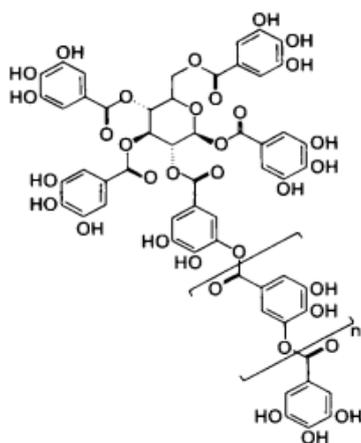


Figure 9: Structure de tanin hydrolysable(*Jansman, 1993*)

### b) Tanins condensés :

Les tanins condensés sont très abondant dans certain organes végétaux consommé par l'homme par exemple les fruits : pomme, prune, fraise ou des boissons fermentés ou non (thé, vin, cidre) (*Jacque, 2005*) . Ce sont des oligomères ou des polymères de 2 à 50 unités flavonoïdes qui sont jointes par liaisons carbone-carbone (*Kumarashok et al, 2012*). Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistant à l'hydrolyse et les attaques chimiques fortes.

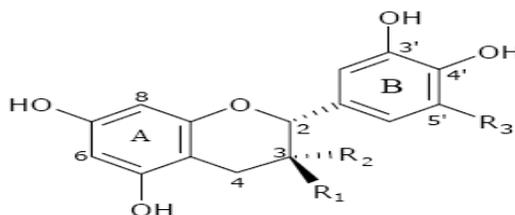


Figure 10: Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés (*Perret, 2000*)

### c) Tanins complexes :

Les tanins complexes sont définis comme des structures complexes qui comportent des éléments structurels de différents groupes de tanins avec autres macromolécules. En effet, ce sont des tanins formés par une unité (gallotanins ou ellagitanins) connectés à une unité flavonoïde par une liaison C-glycosidique (*Rasines-Perea, 2019*).

### d) Les phlorotanins :

Une autre classe a été identifiée récemment c'est les phlorotanins qui se trouvent exclusivement chez les algues brunes comme : *Bifurcaria, Carpophyllum, Cystophora, Cystoseira, Eisenia, Fucus et Sargassum spp* (*Schmauch*) qui ne possèdent pas les groupes ortho-phénolique typiques des tanins condensés et hydrolysables (*Ragan et al., 1984 ; Frutos, 2004*).

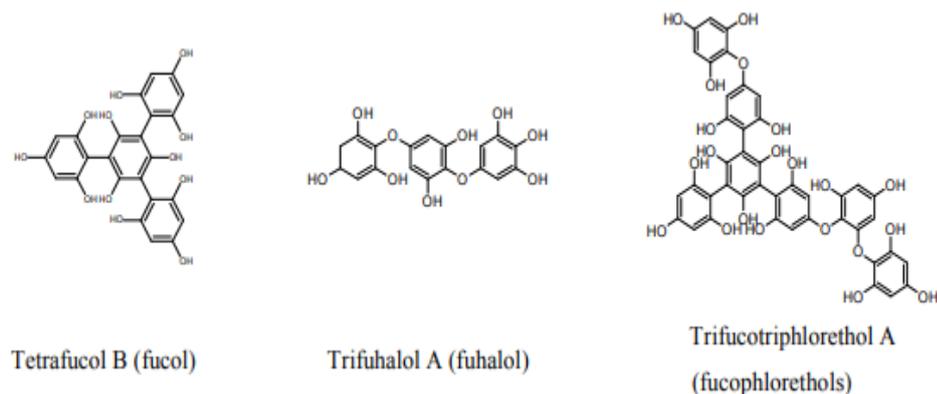


Figure 11: Les trois principaux phlorotanins (*Schmauch, 2010*)

### 3. Propriétés physicochimiques :

- ✓ Les tanins se dissolvent dans l'eau sous forme de solution colloïdale, mais leurs solubilités varient selon leur degré de polymérisation, ils sont solubles dans les alcools et l'acétone (*Blain, 1998 ; Makkar, 2000*).
- ✓ Les tanins hydrolysables et tanins condensés peuvent être distingués à base de leur comportement en milieu acide à chaud. Cette réaction peut être utilisée pour l'étude structurale de ces derniers. Par exemple, le traitement par vanilline chlorhydrique, les tanins condensés se transforment en pigment rouge par les formes dimères des oligomères « prothancianidines ». Leurs multiples groupes phénoliques hydroxyle conduisent à la formation de complexes avec les protéines, avec des ions métalliques et avec d'autres macromolécules comme les polysaccharides (*Jacques et al., 2009*).
- ✓ Avec les sels ferriques les tanins galliques et éllagiques donnent une coloration bleu sombre et avec l'iode de potassium l'acide gallique donne une coloration rose.

## Synthèse bibliographique

---

- ✓ Les tanins se fixent à la quasi-totalité des protéines formant ainsi des complexes insolubles à pH physiologique (pH=7,4) (*Zimmer, 1996*).
- ✓ les dérivés de l'acide tanique peuvent former des liaisons avec l'ADN induisant ainsi des modifications conformationnelles (*Harvey, 1992*).

### 4. Activités thérapeutiques des tanins :

Dans ces dernières années plusieurs œuvres ont démontré que les tanins ont de multiple activité biologique notamment : cardio-protectrice, anti-inflammatoire, anti-cancérigène, anti-hypertensive, anti-coagulant, antiviral et anti- bactérienne avec des propriétés anti-oxydante et anti-radicalaire. Les tanins sont également capables de réduire le risque de maladie transmise par zoonose (*Redondo, 2014*). Les ellagitanins inhibe l'adsorption d'une cellule à une autre et inhibe la transmission et la multiplication des virus aussi l'effet astringent des tanins précipitent les protéines membranaires affectant ainsi la perméabilité cellulaires. Les tanins sont également utilisés dans la subjection de l'insuffisance veineuse, dans les troubles de l'érythisme cardiaque et les troubles de sommeil (*Mamadou, 2002*). Les tanins diminuent les dommages causés sur l'ADN. Cette substance inhibe 97.7% de peroxydation lipidique des acides linoléiques et réduit le pouvoir métallique et l'activité des ions (*Gulcin, 2010*). L'action cytoprotectrice des proanthocyanidines est supérieure à celle des vitamines C , B et béta-carotène(*cowan,1999*).Cependant, les tanins ont d'autres applications industrielles tel que : la préservation des filets de pêche, la protection des métaux, mis en fabrication de plastique et préparations des huiles de perçage (*Mamadou, 2002*).

### V. Constituants du sang physiologie et de l'hémolyse sanguine

#### V.1. Composées biochimiques du sang :

Le sang est un tissu conjonctif spécialisé qui renferme la plus grande partie d'éléments que l'on retrouve dans les diverses parties de l'organisme principalement: l'eau (91.5%), les protéines plasmatiques (7%) (albumine, globuline, fibrinogènes), autres solutés (1.5%) présentés en électrolytes : cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) et anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ), nutriments qui sont le produit de la digestion(acides aminés, glucose, acide gras, glycérol, vitamines et minéraux), gaz (oxygène, dioxyde de carbone, azote). Enfin des substances régulatrices (hormones et enzymes) et quelques déchets qui prennent routent vers des cellules sécrétrices (urée, acide urique, créatinine, créatine, bilirubine, ammoniacque) (*Derrickso, 2017*).

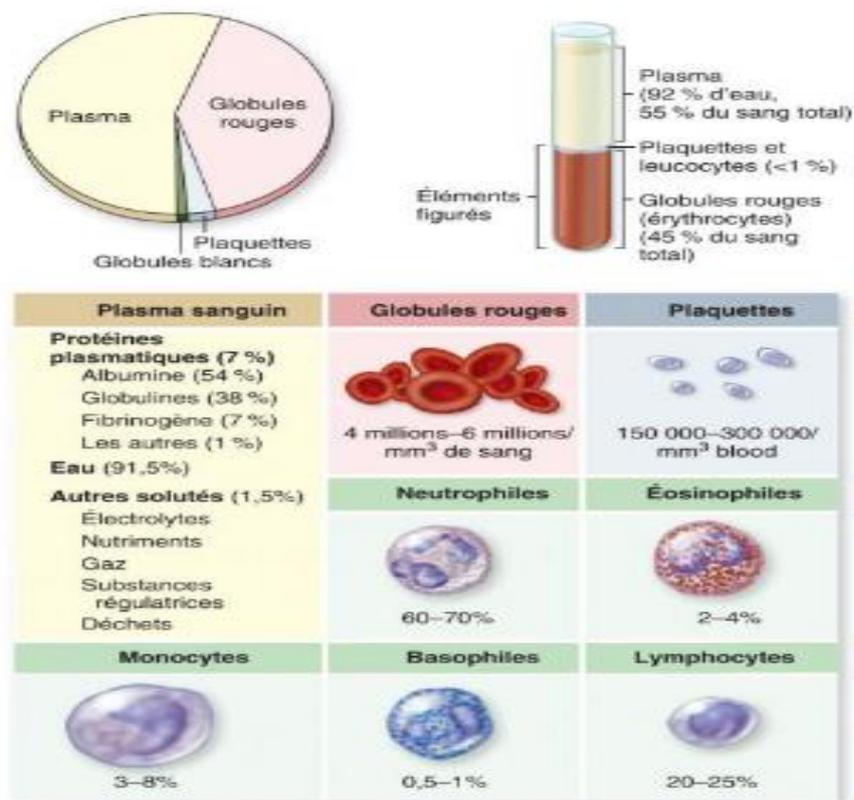
## Synthèse bibliographique

### V.2. Les constituants du sang :

La centrifugation est un procédé physique utilisée pour accélérer la séparation d'éléments du sang selon leurs densités (selon **tableau n°5**)(Rouger, 2011). Le sang est collecté dans des tubes avec un anticoagulant permettant d'avoir un culot de globules rouges. Au-dessus du culot se trouve une couche leuco-plaquettaire (leucocyte+plaquettes) et la fraction de surnageant correspond au plasma (figure).

**Tableau n°5:** Mesures d'éléments constitutives du sang (Rouger, 2011)

	Volume moyen *10 <sup>15</sup> /litre	Diamètres (µm)	Densité (g/ml)
Plasma			1.026
Plaquettes	9	2-4	1.058
Leucocytes	230-470	7.5-30	1.062-1.089
Erythrocytes	87	7	1.100



**Figure 12:** Schématisation du sang après centrifugation et les composés du sang (Beckmann, 2018)

## Synthèse bibliographique

---

### V.3. Les éléments figurés (Globules rouges) :

Appelés encore les érythrocytes. Ce sont des cellules de forme bi-concave anucléée qui représentent 45% du volume sanguin, fabriqué par la moelle osseuse, mesurant entre 7 à 8 $\mu$ m de diamètres. Constituées essentiellement de protéine et lipide, membrane sans organites avec un cytosquelette adjacent, d'hémoglobine contenant du fer qui transporte l'oxygène et enzymes glycolytiques. Le nombre moyen des érythrocytes est situé entre 4 à 5\*10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup> (35 à 50% de volume sanguin) circulant pendant 120 jours. Un nombre de 200\*10<sup>9</sup> cellules/jour sont éliminées après avoir remplis leurs rôles par les cellules phagocytaires de la rate, du foie et de moelle osseuse. Les érythrocytes sont utilisés comme modèle simplifié des membranes plasmiques des mammifères. Leurs rôles et de transporter l'oxygène et le dioxyde de carbone assurant ainsi la production d'ATP, NADH H<sup>+</sup> et NADPH<sup>+</sup> (*Burnat, 1998 ; Beckmann, 2018*)

#### ❖ Stabilisation membranaire des globules rouges :

La stabilisation membranaire est un processus de maintien de l'intégrité des membranes biologiques tels que les érythrocytes et les membranes lysosomales contre osmose et les lyses induites par la chaleur. Les membranes biologiques ont des structures asymétriques qui sont thermodynamiquement stables et métaboliquement actives qui forment des frontières fermées entre les différents compartiments qui se composent principalement des protéines et des lipides. Certains critères peuvent affecter l'état physique général de la membrane biologique telle que la température, les ions environnementaux. De nombreux stabilisateurs des membranes (acide méfénamique, laphénylbutazone...) et déstabilisateurs (Vitamine A, des sels biliaires...) pourraient agir sur l'intégrité et la fluidité des membranes cellulaires (*Thinakaran et Dharman, 2014*).

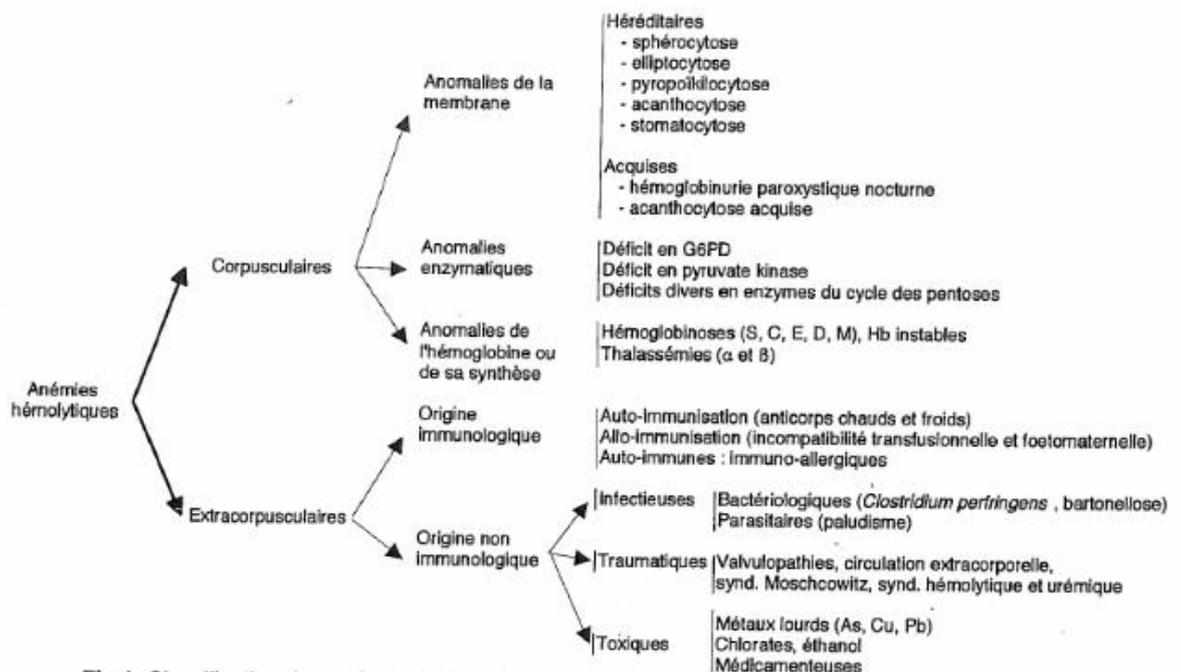
### V.4. Hémolyse et anémie hémolytique :

L'hémolyse représente l'ensemble des phénomènes qui président à la destruction érythrocytaire et la mort des hématies après 120 jours de circulation et récompensé par production identique par la moelle osseuse. Elle est pathogène lorsque cette destruction est précoce (*Burnat, 1998*). Alors que l'anémie hémolytique est une anomalie de la membrane érythrocytaire observée dans un frottis sanguin. Elle se traduit le plus souvent par une hémolyse chronique, définie aussi par un taux d'hémoglobine inférieur à 130g/l chez l'homme et 120g/l chez la femme ou un déficit enzymatique et un déficit en glucose 6 phosphatent déshydrogénase (G6PD) (*Costello, 2010*). On trouve plusieurs types d'anémies hémolytiques par exemple:

- Anémie hémorragique : perte de 10% du volume circulant (soit environ 500ml chez l'adulte)

## Synthèse bibliographique

- Anémie auto-immune due à la fixation d'auto anticorps à la surface des globules rouges.
- Agression des globules rouges par des antigènes(Ag) externe par exemple les produits à usage industriel, domestique ou alimentaire par le plomb ou le cuivre qui provoque une surcharge dans le foie provoquant ainsi une crise hémolytique, le chlorate qui provoque une hémolyse par oxydation, l'éthanol, le saturnisme qui bloque l'activité enzymatique et aussi les toxines médicamenteux tel que sulfamide, quinone, phénytoïne ou toxine d'origine animal (venin de serpent et d'araignée) ou végétale (champignon toxique)(*Burnat et al.,1998*) ( *Figure 13* )



**Figure 13** : Classification des anémies hémolytiques (*Burnat, 1998*).

### V.5. Les signes cliniques :

Lésion osseuse, lithiase vésiculaire, tachycardie, ulcère des jambes rencontré dans les anémie hémodynamique et diminution de activité rénale et plasmatique par une hémoglobinurie et un plasma de couleur rosé et un taux inférieur à 200mg/l chez individu atteint d'une hémoglobinémie (*Burnat, 1998*).

### V.6. Les anti-hémolytiques :

Les médicaments anti-hémolytiques sont des substances qui présentent la capacité à retarder ou à inhiber la lyse des globules rouges tel l'acide folique. Un complément de fer, des corticoïdes et des suppléments de vitamine B peuvent être utilisés pour traiter les anémies hémolytiques. Il y'a presque autant de traitements qu'il y a de causes. La corticothérapie est une thérapie à base d'anti-hémolytique auto-immune, le danazole et plusieurs types de compléments, ....etc. (*David,2009*). Ces dernières années, le domaine de la recherche de

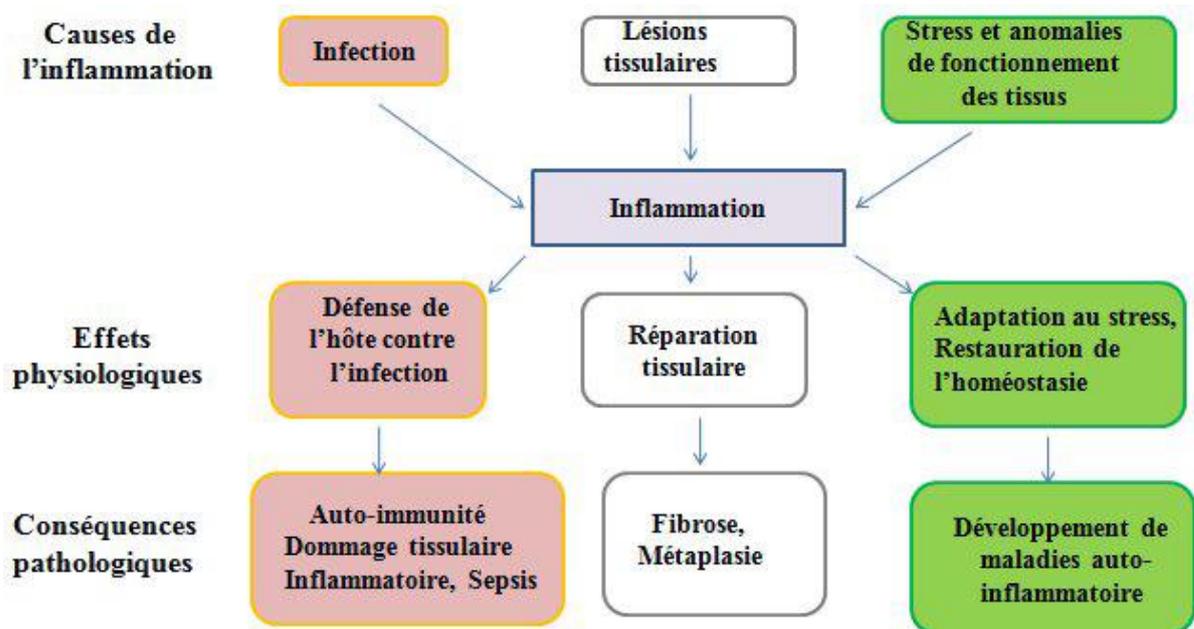
## Synthèse bibliographique

nouvelles substances anti-hémolytiques d'origine végétale s'est bien développé, des résultats satisfaisants en été attribués aux plantes telles que les feuilles et tige de *ammoide*, racine *berberis vulgaris*, fruit de *Detilfera* et d'autres plantes à effet anti-hémolytique.

### V.7. Réaction anti-inflammatoire :

#### 1. Définition du processus inflammatoire :

L'inflammation est la première réaction de défense de l'organisme face à un pathogène, elle désigne l'ensemble des réactions de système immunitaire déclenché dans un organisme ou un tissu vivant suite à un stimulus nocif ou une agression d'origine physique (chaleur, froid, UV, rayon X), chimique (toxine, caustique, venin), infectieuse (bactérie, viral, parasitaire, fongique) ou endogène et immunologique (maladie immunitaire, allergie, cancer) (Weill et al, 2003). La réponse anti-inflammatoire a pour but d'éliminer l'agent agresseur, détruire les tissus lésés et réparer les dégâts. Elle varie selon l'intensité et en durée, dans les cas graves l'inflammation peut conduire au décès si la réaction inflammatoire est exagérée ou n'est pas suffisante (Cybéle, 2015). L'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme via la circulation sanguine et causée des dommages irréversibles locaux ou généralisés (Nathan, 2002) démontrés ci-dessus :



**Figure 14:** Les différentes causes de l'inflammation et ses conséquences pathologiques (Medzhitov, 2008)

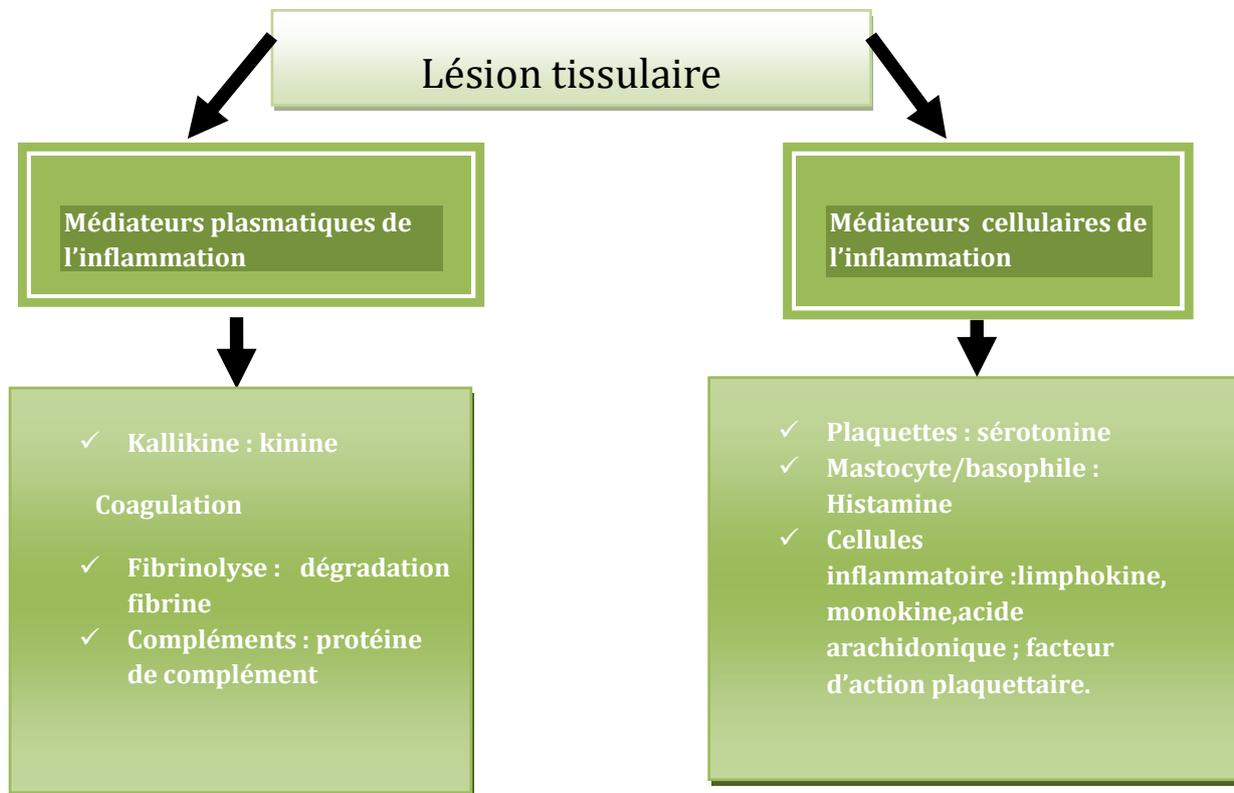
### 2. Signes cliniques de l'inflammation :

Les signes cliniques cardinaux d'inflammation locaux sont : la tuméfaction, hyperhémie, rougeur, hyperthermie, vasodilatation veineuse, la douleur et la formation d'abcès qui vise à isoler la réaction et éliminer les corps étrangers (*Galanaud, 2001*). Les signes généraux : fièvres, asthénie, anorexie, myalgies, torpeur ...etc, parfois elle peut être dangereuse : occlusion ou rupture d'une artère au cours d'une vascularité (*Muster, 2005*). L'ensemble des perturbations biochimiques dues à une réaction inflammatoire est sur le plan systémique lié à : la voie d'activation des compléments, la coagulation, la fibrinolyse, l'activation de l'axe corticosurrénal (protéines inflammatoires) et de nombreuses substances libérées localement : histamine, sérotonine, kinines, prostaglandine, thromboxane, leucotriènes...etc (*Engler, 1993*).

**Tableau n°6 :** Les médiateurs activant les signes inflammatoires.

Vasodilatation	Histamine, prostaglandine, kinines
Augmentation de perméabilité vasculaire	Histamine, sérotonine, leucotriène
Douleur	Prostaglandine, bradykinines
Fièvre	IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, prostaglandine
Chimiotactisme et activation des leucocytes	TNF $\alpha$ , IL-1, leucotriène, thrombine
Destruction et lésion tissulaire	NO, cytokine lymphocytaire, radicaux libres, enzymes lysosomale

### 3. Les médiateurs chimiques de l'inflammation :



**Figure 15 :** Les médiateurs sécrétés lors de lésion tissulaire.

### 4. L'inflammation et inhibition de la dénaturation protéique :

La modification des protéines par des médiateurs de l'inflammation peut mener à leur dénaturation ce qui peut potentiellement rendre ces protéines non fonctionnelles. On observe souvent des protéines modifiées dans les patients présentant la maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, et le cancer (Roy et al., 2013). La dénaturation des protéines rend ces derniers antigéniques. De ce fait lançant une immuno-réaction et produisant les changements biochimiques tissulaires, qui mène finalement au rhumatisme articulaire et provoqué par un changement dans la structure de l'immunoglobine (Fuchs et Packer, 2005).

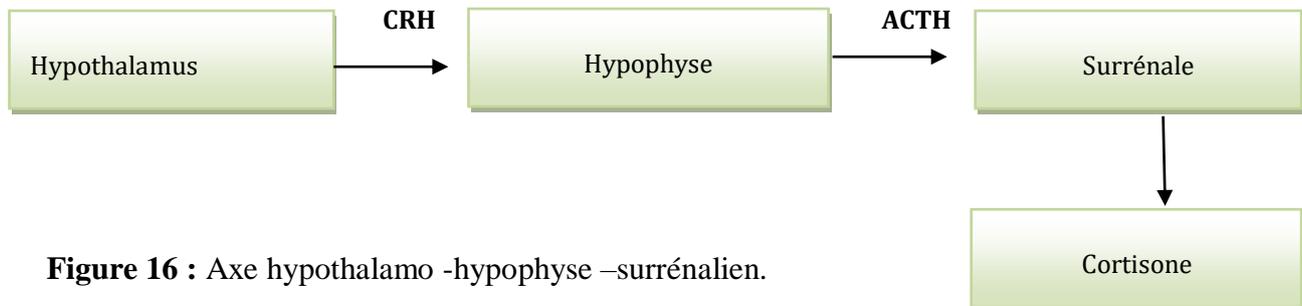
### 5. Agents anti- inflammatoires :

#### A. Les anti-inflammatoires stéroïdiens :

Les glucocorticoïdes sont synthétisés naturellement par les glandes surrénaliennes dérivées du cholestérol dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse. Ils ont une activité prédominante comme le cortisol (figure 16), soit une activité minéralocorticoïdes comme aldostérone. C'est en 1948 que les propriétés anti inflammatoire de ces substances sont utilisées pour la première fois dans la

## Synthèse bibliographique

thérapie humaine (*Wechsler, 1997*). Capable d'inhiber les réactions inflammatoires grâce à leur action sur les vaisseaux par diminution de la vascularisation et l'anti-prolifération des monocytes, macrophages, lymphocyte, plasmocyte, fibrose et inhibe le phénomène cellulaire précoce et tardif, leurs actions inhibe divers cytokines et enzyme à médiation inflammatoires (*Muster, 2005*).



**Figure 16 :** Axe hypothalamo -hypophyse –surrénalien.

### B. Quelques anti- inflammatoires stéroïdiens :

**Tableau n°7:** Action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes (*cybelé, 2015*).

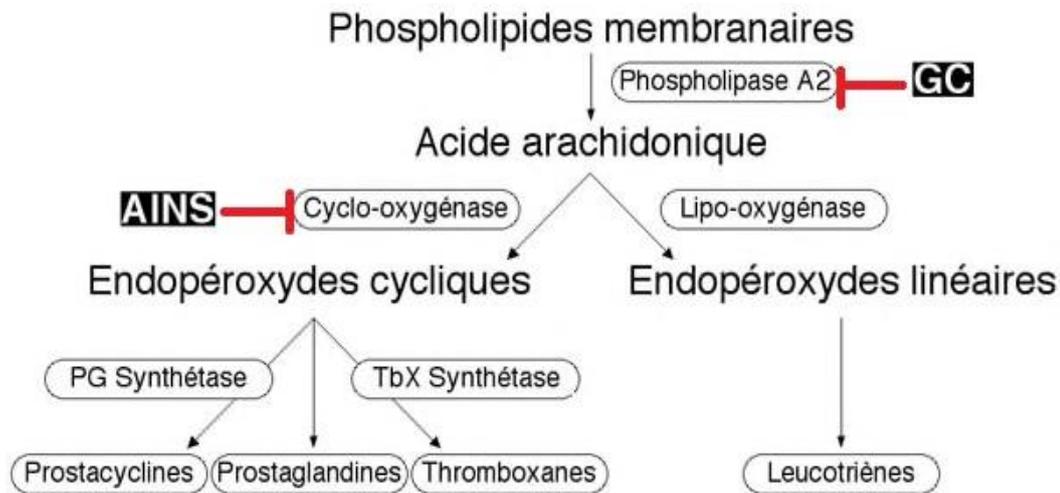
Glucocorticoïdes	Pouvoir anti-inflammatoire	Durée d'action
Cortisone	0,8	Moins de 12h
Hydrocortisone	1,0	Moins de 12h
Prednisone/Prednisolone	4,0	12a36h
Méthylprednisolone	5,0	12a36h
Triamcinolone	5,0	12a36h
Dexaméthasone	30,0	Plus que 48h
Bétaméthasone	35,0	Plus que 48h

### C. Les anti-inflammatoires non stéroïdien :

Depuis 1963 les composées non stéroïdiennes étaient dotées de propriétés anti-inflammatoires contre les manifestations de la réaction inflammatoires thermorégulateur (chaleur), analgésique (douleur), hypo-vascularité (rougeur). La plupart sont bénins mais d'autres peuvent avoir des conséquences graves (*Pillon, 2014*). Leurs propriétés pharmacologiques est d'inhiber la synthèse de prostaglandine par inhibition de façon irréversible les cyclo-oxygénase 1 (COX1) une enzyme clé dans la synthèse de prostaglandine et de biotransformation de l'acide arachidonique en eucasanoïde et inhibe le cyclo-oxygénase 2 (COX2) présente dans le siège inflammatoire pour un effet anti-thrombotique (*Vergne et al., 2000; Soubrier et al., 2013*). En 1971 il a été démontré que l'aspirine et l'indométacine inhibe

## Synthèse bibliographique

les cyclo-oxygénase, les Zyleuton et les Ténidap inhibiteur de la lipo-oxygénase. (Malaise, 1996).



**Figure 17:** Schéma représentant l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Bacchi et al, 2012)

### 6. Plantes à activité anti-inflammatoire:

La plupart des espèces végétales possèdent des vertus thérapeutiques en raison de leurs richesses en substances actives issues de métabolisme secondaire, certains composés phytochimiques ont des propriétés anti-inflammatoires utilisés dans la phytothérapie. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase par exemples le rhizome et le curcuma qui sont des inhibiteurs de synthèse d'acide arachidonique. Les racines de réglisse (*Glycyrrhi Zaglabra*) et feuille de cassis (*Riber Nigrum*) reconnue pour traitement symptomatique des manifestations articulaires douloureuses en raison de leurs richesses en flavonoïdes. Les huiles essentielles peuvent combattre les infections comme la lavande (antiseptique et anti-infectieuse), le basilic (anti-bactérien), l'eucalyptus (neutralisation des virus aussi bien que les bactéries), le thym (fort utilisé contre les douleurs). Dans notre alimentation, les fruits et les légumes sont riches en éléments anti-inflammatoires comme : le citron, la figue, le basilic, le persil, la courgette, la grenade, la carotte, le noix de coco, la patate douce, l'algue, la ciboulette ....etc (Chevallier, 2004 ; Tétaux, 2005 ; Heymonet, 2013)

# Matériel et Méthodes

Le travail expérimental que nous avons réalisé a été effectué au sein du laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition (**PPABIONT**), Faculté des sciences de la nature et de vie et des sciences de la terre et de l'univers (SNV/STU), Université de Tlemcen.

### **I. Extraction sélective des tanins :**

#### **I.1 Préparation du matériel végétal :**

Notre sujet apporté sur l'étude de l'activité anti-hémolytique, antioxydante et anti-inflammatoire de l'écorce de la clémentine (*citrus clementina*). Le matériel végétal (clémentine) est nettoyé, l'écorce est séparée, séchée à température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant 15 jours.



**Figure 18:** Photographie de la clémentine à gauche, écorce de clémentine séchée à droite.

#### **I.2. Préparation des extraits de peau sèche de clémentine :**

Après séchage à l'air libre, l'écorce est broyée à l'aide d'un mixeur électrique puis tamisée par un tamis.

#### **I.3. Optimisation des paramètres d'extraction de la matière grasse par SOXLHET :**

La poudre d'écorce de clémentine est mise dans des cartouches en cellulose. Un volume de 200 ml d'hexane est mis dans un ballon puis placé dans la chauffe ballon. 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.

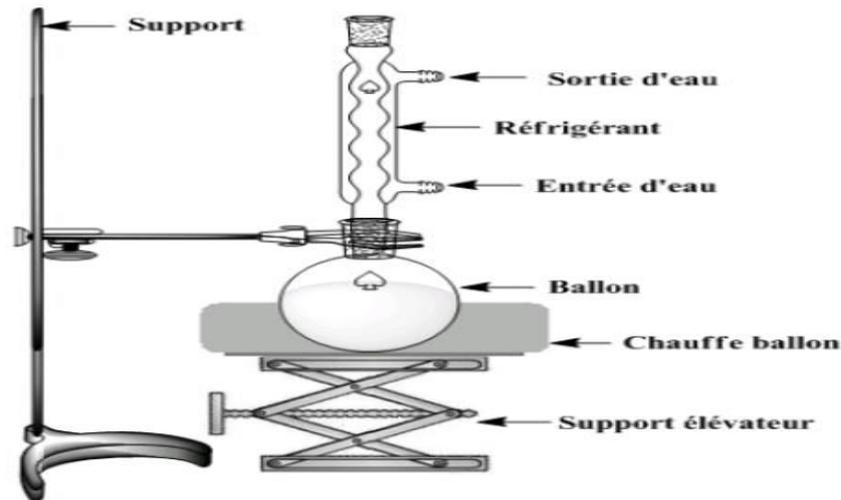


Figure 19 : Schématisation de l'appareil de SOXLHET

#### I.4.Phase d'extraction des tanins :

L'extraction des tanins est obtenue en suivant 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 50ml d'acétate d'éthyle.

Le mélange des phases acétate éthylique récupéré et évaporé à sec 54°C dans l'étuve durant une nuit complète.

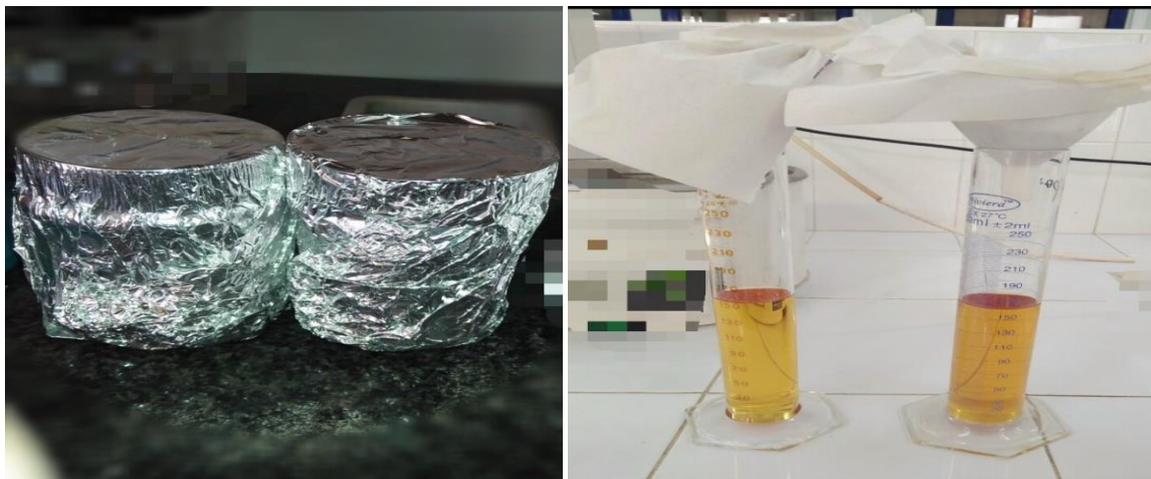


Figure 20 : Macération du tourteau à gauche, filtration après macération à droite.

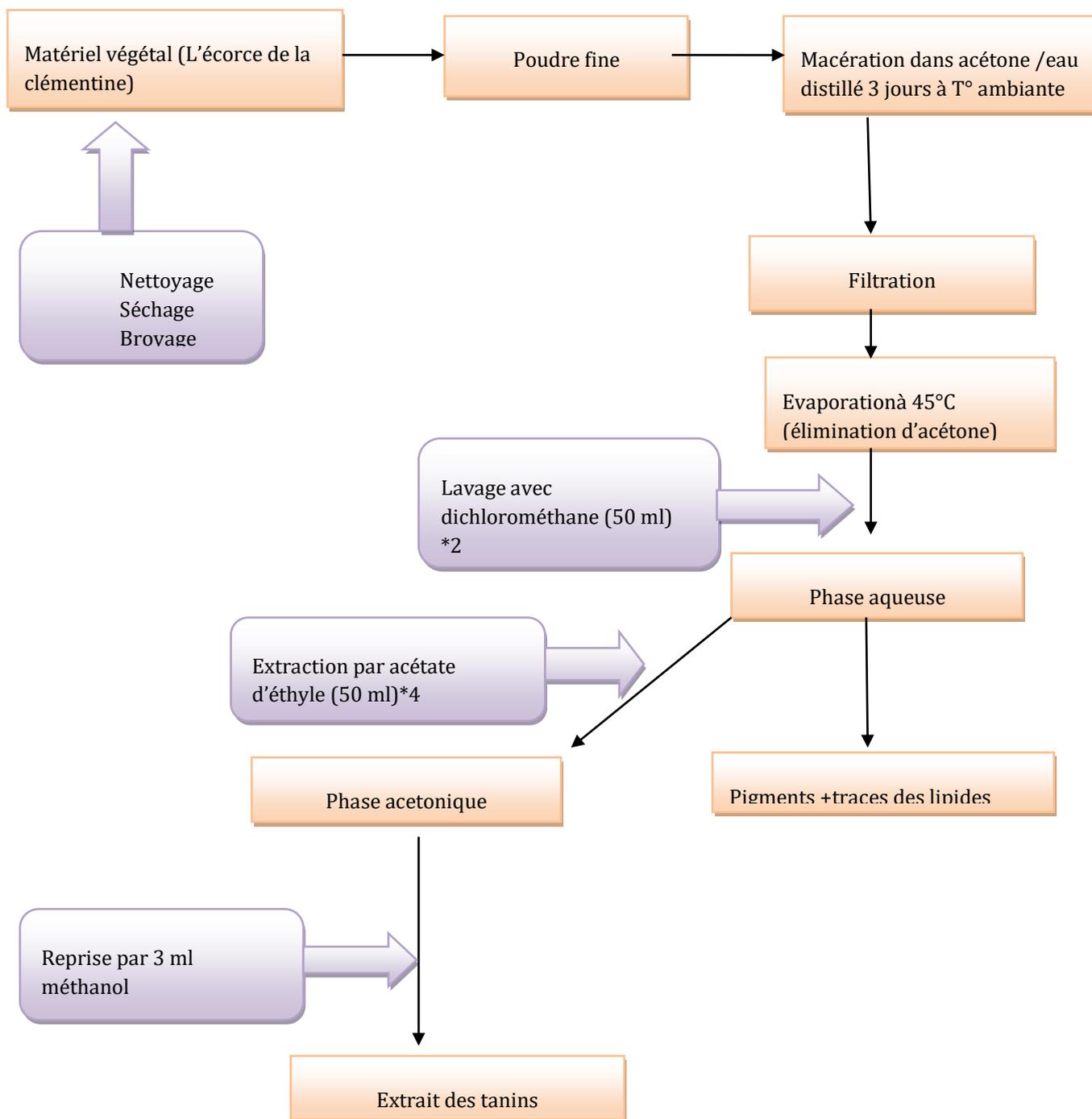


**Figure21** : Evaporation par la rotavapeur .



**Figure 22** : Lavage par le dichlorométhane à gauche, lavage par l'acétate d'éthyle à droite.

**I.5. Protocole d'extraction sélective des tanins :**



**Figure 23 :** La démarche d'extraction des tanins à partir d'une écorce de clémentine

## II. Test de cytotoxicité :

### II.1.Principe :

Le test de cytotoxicité est une méthode colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité des cellules au sein d'un échantillon. Cette technique permet de déterminer la mortalité cellulaire induite par un composé particulier à des concentrations différentes.

### II.2. Préparation des dilutions de l'extrait (tanins) et de l'acide gallique :

A partir d'une solution mère de tanin sont préparées plusieurs dilutions (1500, 750, 375, 187, 94, 47 $\mu$ g/ml).

Les mêmes procédures sont établies avec l'acide gallique

### II.3.Préparation de la suspension des globules rouges humain :

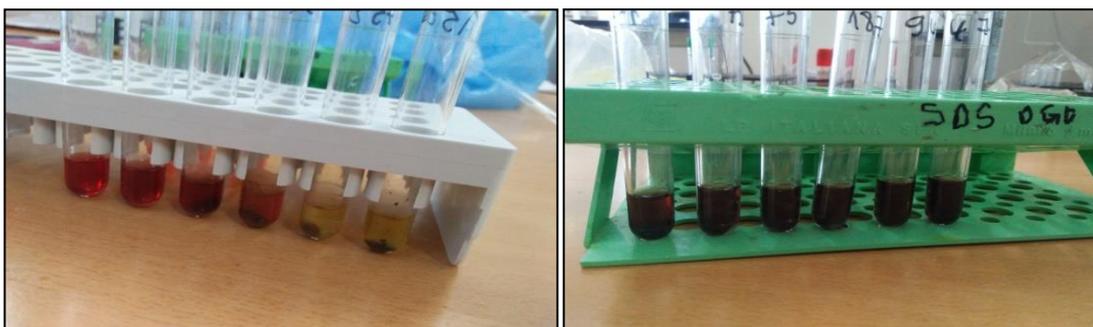
Après prélèvement sanguin chez un individu sain. Le sang est collecté dans des tubes à héparines puis centrifugé à 3000tours/ minute pendant 10minutes. Le plasma est éliminé tandis que le culot est lavé successivement 3 fois avec l'eau physiologique. La suspension érythrocytaire est diluée à 10% .

Une Prise de 800 $\mu$ l des extraits à différentes concentrations sont introduites dans des tubes à hémolyse dont les quelles est ajouté 200 $\mu$ l de globules rouges à 10% .Les tubes sont ensuite incubés.

Après incubation, les tubes sont centrifugés à 3000tours/minute pendant 10minutes. La lecture de la densité optique est réalisée à 560 nm contre le blanc. Dans les mêmes conditions et la même démarche expérimentale préparée :

Un control positif : 200 $\mu$ l de globule rouge avec 800 $\mu$ l d'eau distillé.

Un control négatif : 200 $\mu$ l de globules rouges avec 800 $\mu$ l d'eau physiologique.



(A) (B)

**Figure 24:** (A) Test de cytotoxicité à différentes concentrations de tanin sur les globules rouges

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



**Figure 25 :** Test de cytotoxicité des tanins et d'acide gallique à différentes concentrations dans la plaque ELIZA

**Calcul:**

$$\text{Pourcentage d'hémolyse(\%)} = \left( \frac{At}{Ac} \right) * 100$$

Avec :

Ac : Absorbance du contrôle

At : Absorbance du test

**III. Test anti-hémolytique**

**III.1. Principe :**

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des extraits à empêcher l'hémolyse des globules rouges et la libération d'hémoglobine.

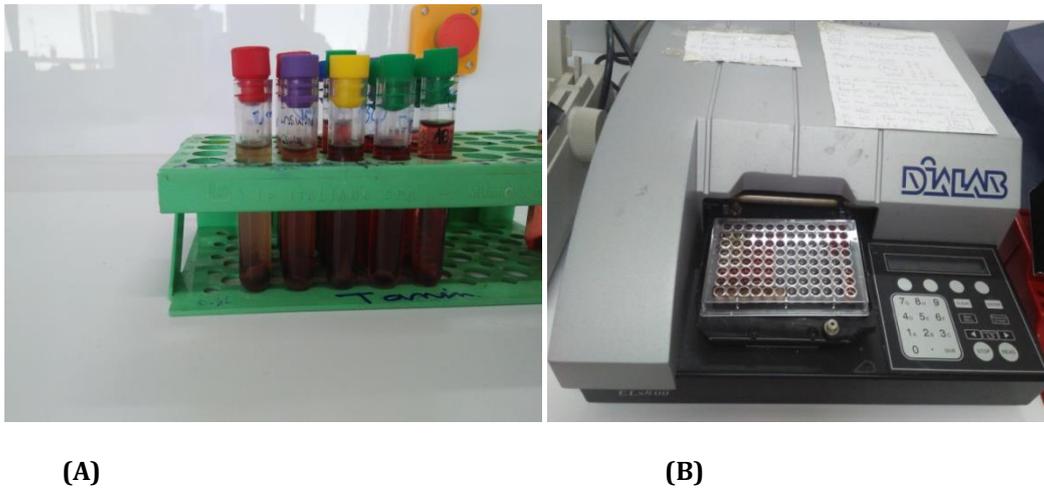
**III.2.Mode opératoire :**

Le sang est prélevé, centrifugé à 3000 tours/minutes puis lavé 3 fois avec l'eau physiologique. Des solutions mères sont préparées comme suit :

- 0.3g d'extrait des tanins dans 1ml d'eau physiologique
- 0.3g d'acide gallique dans 1ml d'eau physiologique
- 0.3g de dichlofenac dans 1ml d'eau physiologique

Chaque tube de la solution mère est dilué afin d'obtenir les différentes concentrations (15, 30, 75, 150 et 300 µg/ml). Un volume de 1.5ml de solution NaCl (0.9%) à pH=7.5 et 2ml de solution NaCl (0.36 %) sont ajoutés pour chaque dilution. Enfin, 0.5ml d'une solution de globules rouges à 10% sont introduites dans chaque tube. Les tubes sont incubés à 56 °C pendant 1 heure

suivie d'une centrifugation à 2500 tours /minutes pendant 5 minutes. La lecture est effectuée dans un lecteur de plaque à 560nm.



**Figure 26: (A)** Différentes concentrations des tanins incubés avec globules rouges  
**(B)** Lecteur de plaque ELIZA

Calcul :

$$\text{Pourcentage de stabilité membranaire(\%)} = \frac{Ac - At}{Ac} * 100$$

Ou :

At : Absorbance du teste

Ac : Absorbance du contrôle (eau physiologique)

## IV. Test anti inflammatoire

### IV.1. Principe :

L'activité anti-inflammatoire *in-vitro* a été évaluée par la dénaturation du BSA, les molécules anti-inflammatoires ont la capacité de réduire le taux de la dénaturation de de la protéine. Ainsi, la protection contre la lyse des membranes et évalué l'altération quantitative ou qualitative des cellules impliquées dans l'inflammation (Geuzgouz, 2018).

### IV.2. Mode opératoire :

La méthode d'inhibition des protéines consiste à préparer quatre solutions :

1-Solution d'essai : (0,5ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine.

2-Solution contrôle test : (0,5ml) composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA à 5% et 0,05 ml d'eau distillée.

3-Solution contrôle : (0,5ml) composé de 0,45 ml d'eau distillée et 0,05 ml d'extrait avec une concentration de 250pg/ml.

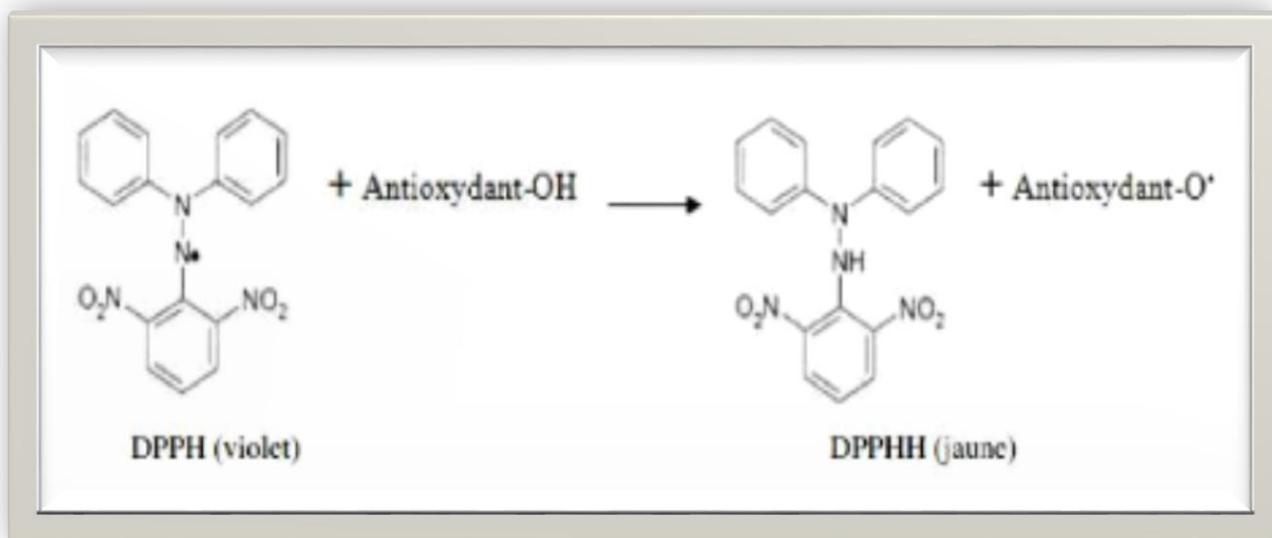
4-Solution standard test : (0,5ml) composée de 0,45 ml de solution aqueuse de BSA à 5% et 0,05 ml de la solution standard diclofénac sodium avec une concentration de 250pg/ml.

Toutes les solutions au-dessous ont été ajustées à  $\text{pH}=6,3$  par une solution HCL (1N). Ensuite les échantillons ont été incubés à  $37^\circ\text{C}$  pendant 20 min. La température a été par la suite augmentée pour garder les échantillons à  $57^\circ\text{C}$  pendant 3 min. Après refroidissement des tubes, 2,5 ml de la solution phosphate saline à  $\text{pH}=6,3$  a été ajoutée aux solutions ci-dessous. L'absorbance a été lue par un spectrophotomètre UV-visible à **416nm**.

## V. Détermination de l'activité anti radicalaire par piégeage due radical DPPH

### V.1. Principe :

Le composé chimique(DPPH) ou le 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphényle- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation, structure et activité antioxydante des composés phénoliques (**Cristina et al., 2009**). Le pouvoir anti radicalaire a été évalué en fonction du temps, la disparition du radical stable DPPH• par spectrophotométrie d'absorption UV-visible à 515 nm (**kalthoum, 2006**). En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH.(2,2 diphényle 1 picrylhydrazyl) de couleur violette se réduit en 2,2 diphényle 1 picryl hydrazine de couleur jaune (**Maataoui et al, 2006**). Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piégeage selon la réaction schématisée dans la figure.



**Figure 27:**Réaction du DPPH•+ avec un antioxydant (**Parejo et al, 2002**).

## V.2. Mode opératoire :

Un volume de 50 $\mu$ l d'extrait dilué dans du méthanol à différentes concentrations (0.062, 0.125, 0.5, 1,2 et 4mg/ml) est introduit dans des cuves et mélangé avec 1.95ml de DPPH. Après agitation par un vortex, les cuves sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30minutes, La lecture est effectuée par la mesure d'absorbance à 515 nm par un spectrophotomètre (**Sanchez-Moreno *et al.*, 1998**).

# Résultats et Interprétation

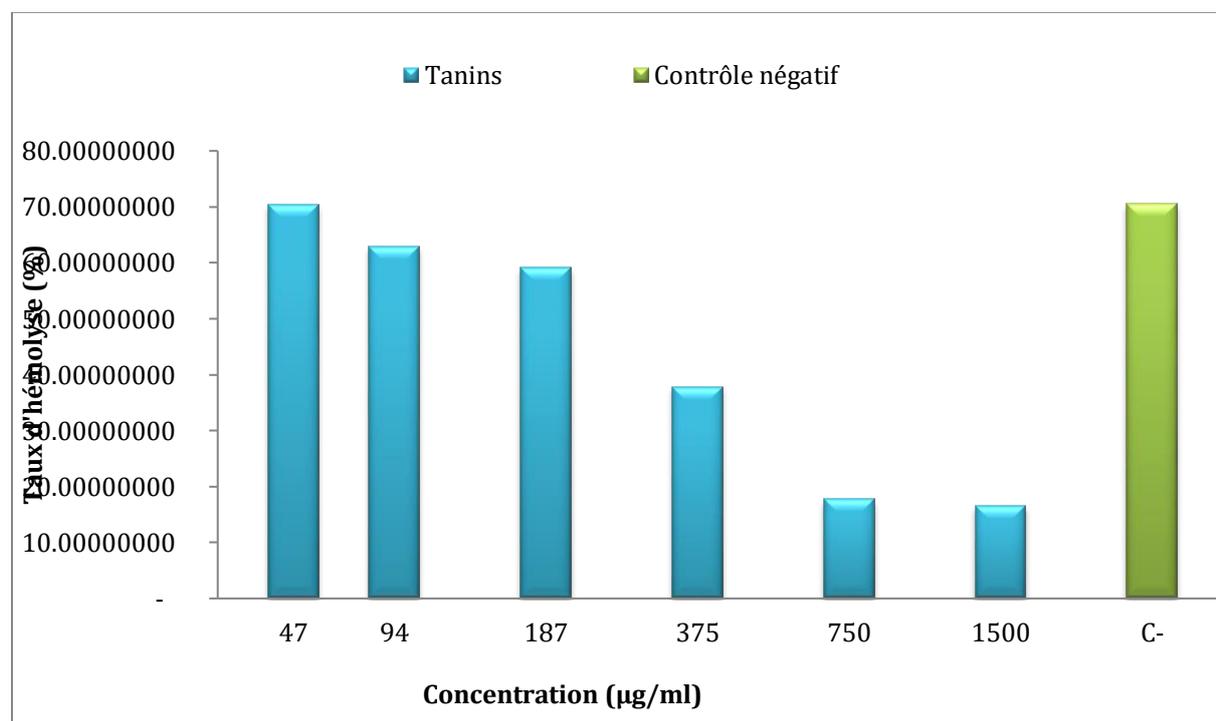
## Résultats et interprétation

### Étude des activités biologiques *in vitro* de l'extrait des tanins :

#### I. Test de cytotoxicité :

Le test de cytotoxicité a été réalisé *in vitro* sur les globules rouges humaine (GRH) traité par différentes concentrations d'extrait de tanins issue de l'écorce de clémentine en comparaison avec des molécules de référence et un contrôles négatif constitué de solution de globules rouge avec de l'eau physiologique et un contrôle positif de globule rouge avec eau distillé, en mesurant ainsi l'absorbance d'hémoglobine échappé de globules rouges.

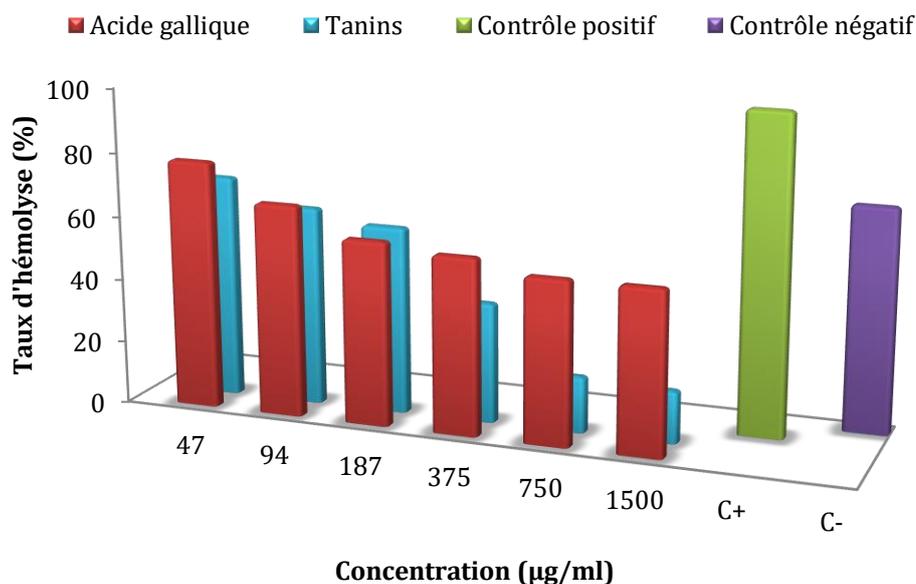
Les résultats obtenus pour le pourcentage d'hémolyse sont illustrée dans la (**Figure 28**)



**Figure 28** : Effet des différentes concentrations dans sur la cytotoxicité des globules rouges.

Selon les résultats obtenus dans la (**Figure 28**), le taux d'hémolyse varie est inversement proportionnel aux concentrations des tanins. Le taux d'hémolyse est de 70.42 % pour la concentration 47µg/ml de tanins. Ce taux diminue jusqu' à 16.46 % à différentes concentrations 1500 µg/ml de tanins. Toutes les concentrations en tanins (allant de 47 à 1500 µg/ml) présentent un taux d'hémolyse diminué comparés au contrôle négatif.

## Résultats et interprétation



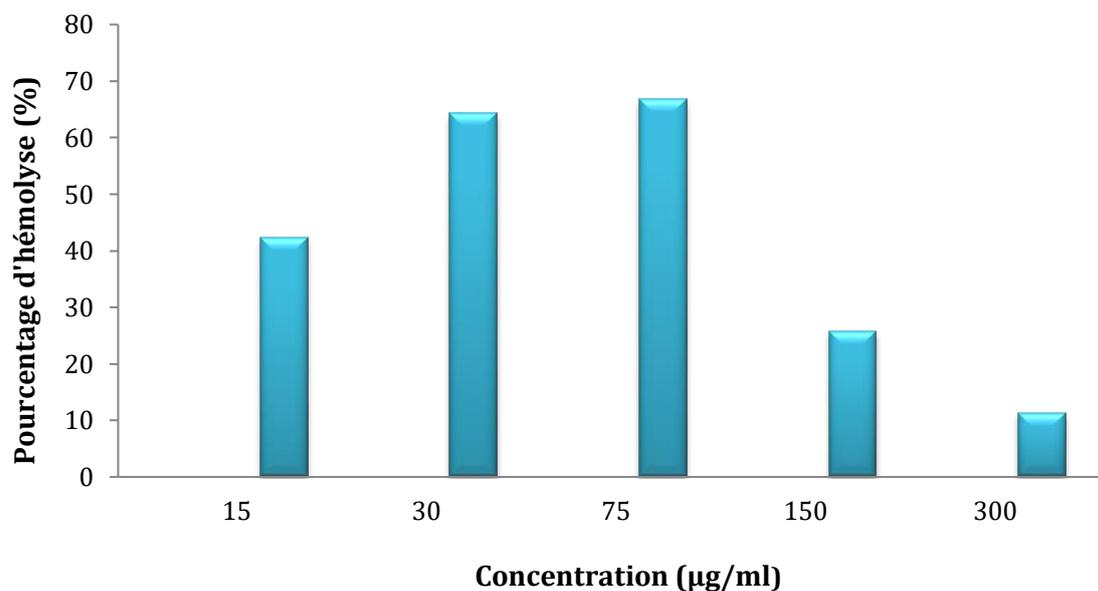
**Figure 29 :** Comparaisons des différentes concentrations en acide gallique et tanins sur la cytotoxicité des globules rouges.

La **figure 29** représentée montre le pourcentage d'hémolyse à différentes concentrations d'échantillon de tanin en comparaison avec les molécules de références qui sont l'acide gallique et les contrôles : positif (globule rouge + eau distillé) et contrôle négatif (globule rouge+ eau physiologique). Selon les résultats obtenus, le pourcentage hémolytique en présence de tanin est diminué comparé à l'acide gallique et ce quel que soit la concentration.

### **II. Evaluation de l'activité anti-hémolytique in vitro par la méthode de stabilité membranaire des globules rouge :**

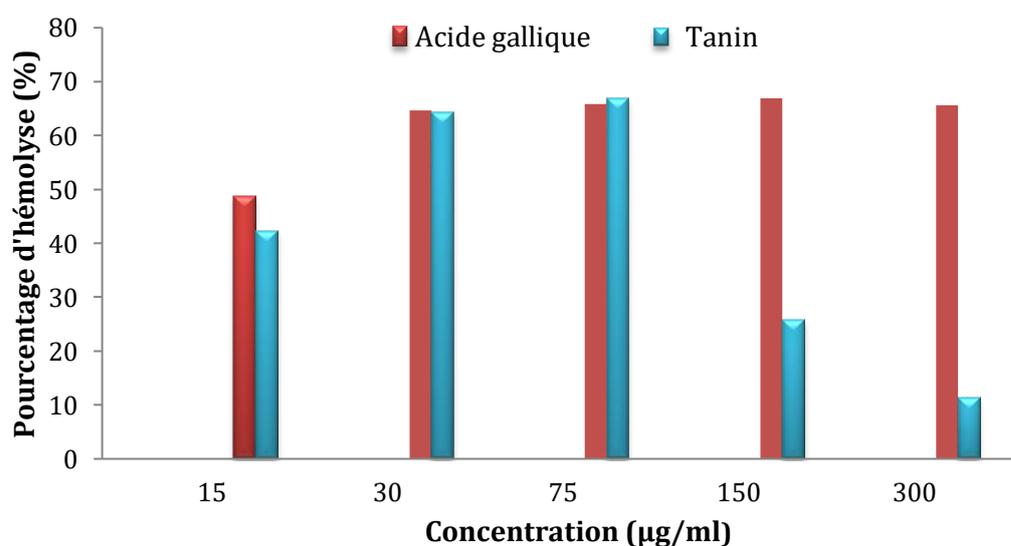
L'étude de l'activité anti-hémolytique *in vitro* a été réalisée selon la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains (GRh). L'évaluation de la stabilité membranaire a été déterminée par la mesure de la libération d'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration d'extraits et les comparants à des molécules de référence sont le diclofénac sodique comme étant un médicament anti-inflammatoire et l'acide gallique qui est un composé phénolique contenant dans des plantes médicinales. Les résultats obtenus sont présenté selon les graphes suivant :

## Résultats et interprétation



**Figure30** : Effet des différentes concentrations des tanins sur le taux d'hémolyse.

La **figure30** montre le pourcentage d'hémolyse par rapport à différentes concentrations de tannin. On remarque qu'à la concentration 15 µg/ml l'hémolyse est de 42.23% puis elle augmente à son maximum 66.85% à 75 µg/ml après cela elle diminue pour les concentrations 150 et 300 µg/ml pour atteindre 16.42%.

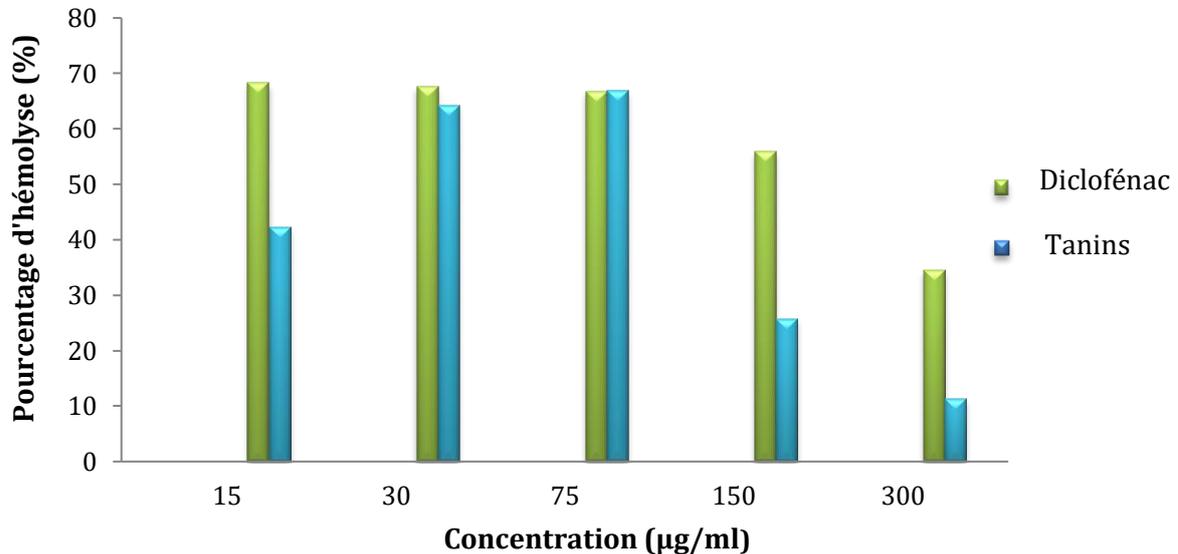


**Figure 31**: Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et les tanins.

Les résultats démontrent l'effet hémolytique des tanins comparativement avec l'acide gallique à différentes concentrations. D'après ces résultats, le pouvoir anti-hémolytique de

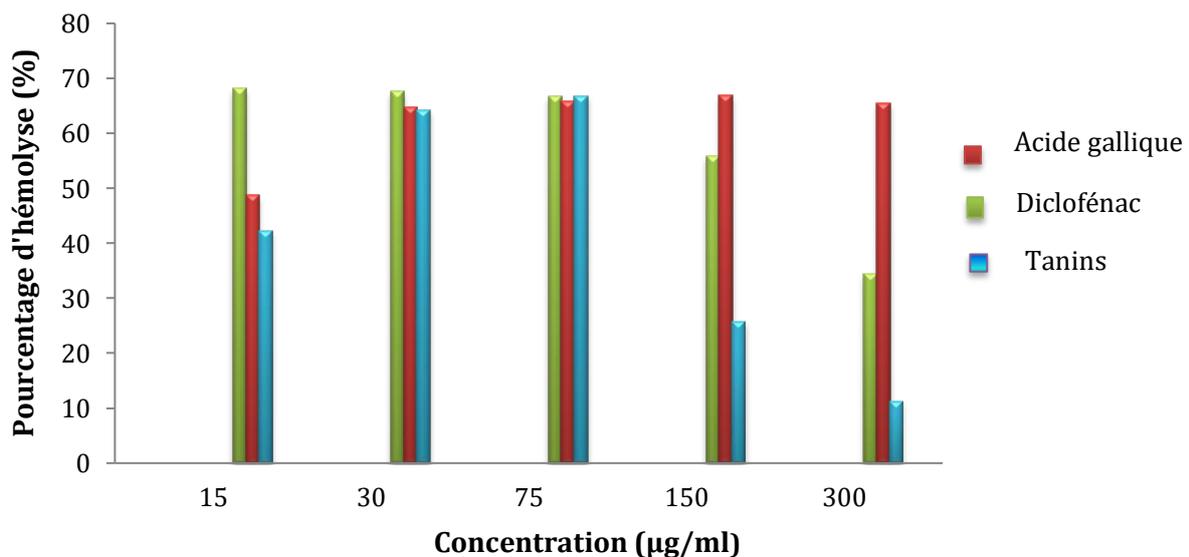
## Résultats et interprétation

l'acide gallique et moins important que celui des tanins puis ce que le pourcentage d'hémolyse de l'acide gallique est plus élevée que celui des tanins. Ceci étant observé pour les concentrations 15, 30, 150 et 300 µg/ml.



**Figure 32:** Comparaison de taux d'hémolyse entre le dichlofénac et tanins.

La **figure32** nous a permis de comparer l'hémolyse des globules rouges à différentes concentrations entre les tanins et le dichlofénac. Les résultats montres un taux d'hémolyse diminué pour les tanins comparé au diclofénac et ce pour toutes les concentrations.



**Figure 33:** Comparaison du taux d'hémolyse entre le diclofenac, l'acide gallique et les tanins

## Résultats et interprétation

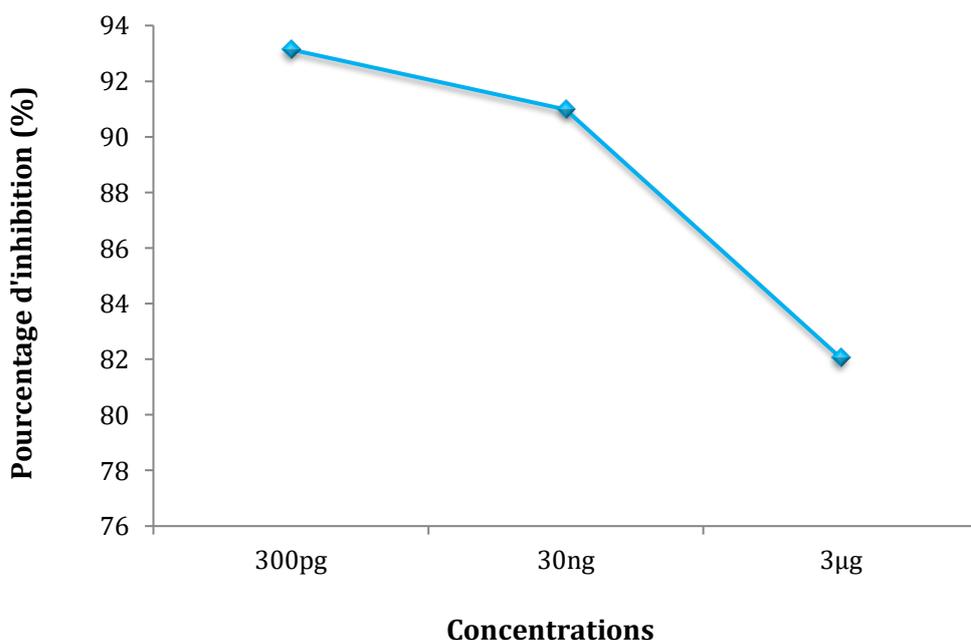
---

La **figure 33** ci-dessus comprend les deux molécules de référence (Acide gallique et diclofénac) comparées à l'échantillon étudié qui est le tanin. D'après ce graphe on remarque que les tanins ont une très bonne protection contre l'hémolyse comparé au diclofénac et acide gallique. L'effet anti-hémolytique des tanins atteint un summum à la concentration de 300  $\mu\text{g/ml}$ .

### III. Étude d'activité anti-inflammatoire in vitro sur des tanins :

L'étude de l'activité anti inflammatoire in vitro d'extrait de tanin a été réalisée en utilisant la méthode d'analyse de stabilité ou destruction protéique en utilisant l'albumin BSA qui une protéine globulaire la plus abondante dans le plasma qui change de conformation à Ph de 7 à 2 et sous l'effet de l'augmentation de température ,pour suivant ainsi le pourcentage d'inhibition à 416 nm en comparaison avec une molécule de référence le dichlofénac . Le principe de ce test est basé sur le contact des protéines membranaire avec les extraits des tanins à différentes concentrations dans une solution isotonique et le suivie de la concentration des cellules hémolysées.

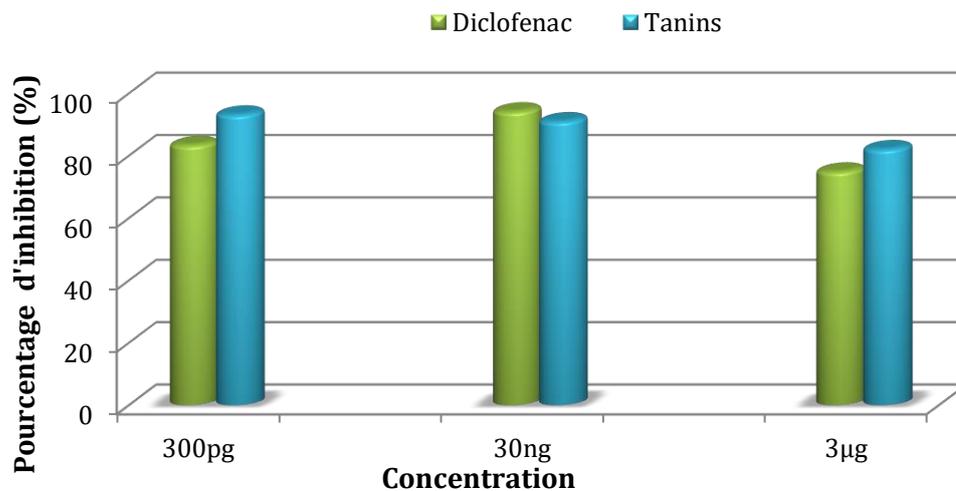
Les résultats obtenus sont schématisé dans les graphes suivants :



**Figure 34:** Taux d'inhibition de la dénaturation protéique par les tanins

La **figure34** montre le pourcentage d'inhibition de la dénaturation membranaire par rapport à différentes concentrations de tanin (300 pg, 30ng, 3 $\mu\text{g}$ ). D'après nos résultats (**Figure46**), le pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique est inversement proportionnel à la concentration en tanins. Il est de (300 Pg) pour la concentration de de tanins et diminue jusqu'à (3 $\mu\text{g}$ ).pour une concentration plus élevé.

## Résultats et interprétation



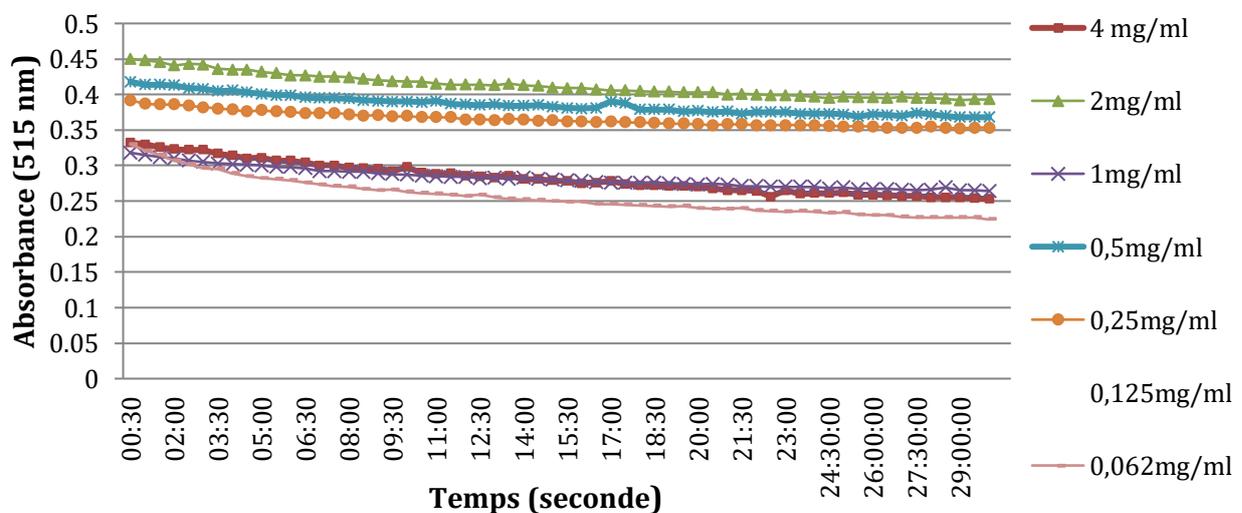
**Figure35** : Comparaison du taux d'inhibition de la dénaturation protéique entre le dichlofénac et les tanins

La **figure 35** comporte les différentes concentrations de tanin en comparaison avec le dichlofénac vis-à-vis de d'inhibition de la dénaturation protéique. Les tanins présentent un meilleur taux d'inhibition à la concentration de 3µg (82.05 %) et 300 pg (94.14 %) en comparaisons avec le dichlofénac.

#### IV. Evaluation de l'activité anti radicalaire par piégeage de radical DPPH :

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode de radical 2,2,diphényl-1picrylhydrazyle (DPPH). Son principe est de mesuré l'absorbance et la réduction de DPPH en présence d'un antioxydant à une longueur d'onde de 515 nm

Les résultats obtenus de l'activité anti-radicalaire des tanins sont présenté dans la **figure 48**



**Figure36** : Réduction de l'absorbance en fonction du temps

## Résultats et interprétation

---

La **figure 36** montre l'absorbance à 515nm en fonction du temps de différentes concentrations de tanin avec le DPPH. A partir de toutes les concentrations de tanins étudiés (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 mg/ml) les résultats montrent que l'absorbance diminue respectivement en fonction du temps. La plus faible absorbance atteinte est observé pour la plus faible concentration (0.062mg/ml) de tanin.

# Discussion

## Discussion

---

L'extraction est une étape très importante avant toute analyse quantitative ou qualitative. Les tanins sont extraits de l'écorce de la clémentine grâce à la polarité des solvants. L'acétone et l'acétate d'éthyle ont permis l'extraction sélective des tanins de l'écorce la clémentine. L'action cytotoxique et anti-hémolytique *in vitro* de notre extrait a été évaluée par l'utilisation du modèle érythrocytaire. Ce dernier est facile à isoler du sang de plus sa membrane possède une grande similitude avec d'autres membranes cellulaires. Les érythrocytes représentent donc un outil précieux pour l'étude membranaire (**Shobana et Vidhya, 2016**). Les GR exposés à des substances nuisibles tel que le milieu hypotonique mènent à une accumulation excessive de liquide dans la cellule ce qui provoque la rupture de la membrane et la libération d'hémoglobine (**Labu et al., 2015**).

Afin d'étudier l'effet des différentes concentrations de tanin d'écorce de la clémentine sur les globules rouges, le test de cytotoxicité *in vitro* est réalisé.

L'évolution de l'effet hémolytique est évaluée par rapport à un témoin négatif et un autre positif contenant respectivement des globules rouges avec eau distillée et globules rouges avec eau physiologique. Nos résultats ont montré que la protection de l'hémolyse est croissante avec la quantité de tanin qui atteint une protection maximale avec un taux d'hémolyse de 16.46% à la concentration 1500µg/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 érythrocytaire (**Verbois, 2002**).

Le test anti-hémolytique permet d'apprécier la concentration optimale qui protège au mieux de l'hémolyse. Nos résultats ont démontré une protection maximale des globules rouges à la concentration de 300µg/ml de tanins. Le diclofénac et l'acide gallique représentent deux molécules de référence à effet anti-hémolytique. L'acide gallique (acide 3, 4, 5-trihydroxybenzoïque), est un acide polyphénolique naturel retrouvé dans les noix de Galle, le sumac, l'écorce de chêne, les feuilles de thé, de raisin et dans le vin. Il possède des propriétés pro-apoptotiques et anti-inflammatoires (**Yon et al., 2013**). Le diclofénac représente un anti-inflammatoire non stéroïdien testé comme traitement pour syndrome d'Hrvin-grass avec une efficacité de 58% sur l'inflammation (**Weber 2012**). Nos résultats ont montré une protection maximale du diclofénac contre l'hémolyse qui est de 34.39% à la concentration 15µg/ml alors qu'elle est de 48.76% pour l'acide gallique à la concentration 300µg/ml. Comparé à ces deux molécules de référence, les tanins de l'écorce de la clémentine présentent une meilleure protection des globules rouges de l'hémolyse qui ne dépasse pas 11.32% d'hémolyse. L'incorporation des composés phénoliques de l'extrait dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier défensif de la cellule (**Louerred et al., 2016**). Concernant l'activité anti-inflammatoire est réalisée selon le principe de stabilité membranaire et a permis de suivre l'évolution du processus inflammatoire sur le BSA (bovine sérum albumine). Nos résultats ont montré que les tanins ont une forte capacité anti-inflammatoire qui varie de 93.13- 90.99 à 82.05% pour les concentrations respectives (300pg,

## Discussion

---

30ng,3µg). Le dichlofenac présente une activité anti-inflammatoire qui varie de 83.33-94.14 et 74.87% pour les mêmes concentrations de tanins. Ce qui démontre une meilleure activité anti-inflammatoire des tanins de l'écorce de la clémentine comparée au diclofenac.

La dénaturation des protéines est à l'origine des maladies inflammatoires par la production d'auto-antigènes (*Williams et al., 2008*). La dénaturation consiste à la modification des liaisons électrostatiques, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (*Manvarmital et Desai, 2014*)

Concernant l'étude de l'activité anti-radicalaire, le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle soit indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire ce radical. La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde(*Hadouchi et al.,2016*).

Le pouvoir anti radicalaire a été évalué en suivant la disparition du radical stable DPPH par spectrophotométrie d'absorbance en fonction du temps (*Mrabet, 2006*). Pour nos résultats obtenus, l'absorbance diminue en suivant une ligne descendante pour toute les concentrations de la solution tanin et DPPH. La concentration qui représente l'efficacité anti-radicalaire maximale est celle de 0.062 mg/ml suivie par une moindre capacité à 2 mg/ml et 0.5mg/ml. Selon Gheffour, 2015, l'évaluation de l'activité anti oxydante montre que les tanins possèdent une capacité de piégeage de radical libre DPPH intéressante.

Conclusion

## Conclusion

---

L'écorce de clémentine est une source en différents composés phénoliques particulièrement les tanins. Les tanins en général sont connus pour leur effets bénéfiques sur la santé de part leur action, anti-hémolytique, anti-inflammatoire et antioxydante.

Tout d'abord le test de cytotoxicité réalisé sur les hématies a bien montré que les tanins de l'écorce de la clémentine possèdent une moindre toxicité que l'acide gallique et une protection maximale contre l'hémolyse qui ne dépasse pas les 16.46% à la concentration 1500 µg/ml.

Ensuite, les tanins de l'écorce de la clémentine permettent une bonne stabilisation de la membrane des érythrocytes particulièrement lorsqu'elles sont soumises à l'hypotonie et à la chaleur. L'effet anti-hémolytique des tanins est excellent dépassant celui du diclofenac et de l'acide gallique.

Concernant l'effet anti-inflammatoire, les tanins ont un impact très distinct dans la protection contre la dénaturation des protéines. En effet un grand pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA allant jusqu'à 93.13%.

Enfin, l'activité antioxydante des tanins évaluée par méthodes de DPPH a montré un effet maximal à une concentration de 0.062 mg/ml.

Les résultats prometteurs et très encourageants de cette étude méritent des investigations *in vivo*.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

1. AUBERT B et GVILLIN ., 1997 – Pépinière et plantation d'agrumes réf : C1663 Montpellier : CIRAD, 184 p. (Techniques : CIRAD) ISBN 2-87614-269-4AUBERT
2. AUG CHEVALLIER., 1947 - Mandarine et orange 301-302 pp 495-498
3. BACCHI S.,PALUMBO P., 2012 – Clinical pharmacology of non stéroïdien anti inflammatory drugs,. A review 11(1) :52-64
4. BACKMEN E., VIGNAU J J.,PETITGUYOT J., 2018 – Science fondamentale, Bibliothèque national ., Paris p123-158
5. BAHRUN T., 1997 – Substance naturelle active la fabrication marinière une source d'approvisionnement,. Potentiel food agriculture spécial 83-95
6. BARKLEY N A., ROOSE M L., KRUEGER R., FREDERICI R ., 2006 – Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection sequence repeat marker (SSR) 1519-1531
7. BERLINT CECILIA., 2016 – Etude de l'influence de l'emballage et de la matrice sur la quantité du jus d'orange
8. BLAIN-JEAN C., 1998 – Nutritional and toxicological aspectation tanin,. Ecole national vétérinaire Marcy étoile de Lyon ., France
9. BOUBEKRI C.,2014 – Etude de l'activité anti oxydante des polphenol extrait de *Solanummelongena* par technique électrochimique
10. BRETO P., PINA A ; ASINS J .,2001 – The diversification of citrus clémentina hortextan a végétativel propagated crop spicies pp285-293 vo:l 21
11. BRUNTON J.,1999 – Pharmacognosie, phytochimie, plante médical (3eme édition). Edition Tec et Lavoisier,. Paris 1120p
12. BURNAT P., CEPPA F.,1998 - Les anémies hémolytique,. Lyon pharmaceutique 49 :10-22.
13. CHAHIDI B., EL-OTMANI M.,JACQUEMEND C.,TIJANE M., 2008 - Utilisation de caractère morphologique, physiologique et marquer moléculaire pour évaluation de la diversité génétique trois cultivar de clémentine,. Vol 331 p112
14. CHEVALIER L C., ROUZET C .,SEGARRA .,2004 – Médicament à base de plante.
15. COSTELLO R., COSTELLOR V B., 2010 – Anémie hémolytiques en réanimation chez adulte. Springer verlag. France, Paris
16. COWN MARJORIE., 1999 – Plant products as antimicrobial agents. Journal American society for microbiology

## Références bibliographiques

---

17. CURK F., HUSSAIN S ., PAILLY O., GILLETISON,. 2013 – Performance evaluation of commun clementine on various citrus rootstocks. Vol150 pp278-282
18. CYBELE KIRASSIAN,. 2015 – Thèse présenté par université Claude Bernard,. Thèse de grade vétérinaire , Lyon
19. DAVID DS,. 2009 – Anémie et médicaments ., Revu française d'allergologie 1348-1349
20. DERRICHSO-TORTORA .,2017 – Anatomie et physiologie 5éme édition ;. Edition américaine pp668
21. DOMINGO J., CERCOS M ., JOSE M., MIGUEL A .,2007 – Plant physiologie de la fructification des agrumes. Journal brésilienne de physiologie végétale vol190
22. ECONOMOS C ., CLAY WD ., 1999 – Nutritional and health benefits of citrus. Energy 62.(78) 37
23. FAO ., 2014 – FAOSTAT <http://faostat3.FAO.org/home/E>
24. FAO STAT,. 2016 – citrus fruit fresh and processed statistical bulletin
25. FUCHS J et PAKER L,. 2005 – Environmental stressors in health and disease :Tyler et Francic e-libray
26. GALANAULD P., EMILIE D,. 2001 Les syndromes inflammatoires materno-foetal physiologie et physiopathologie de l'inflammation, Paris
27. GENORD FLORIDE,. 2011 - Etude des effets des facteurs de l'environnement sur la concentration en caroténoïde dans la pulpe de clémentine (*citrus clémentina*)
28. GREGORY SCHAUCH,. 2010 – Interaction tanin protéine en œnologie
29. GROSS G ., 1999 – Biosynthesis, biodegradation and cellular localization of hydrolysable tannin recent advances in phytochemistry vol34 , photochemicals in human health protection nutrition and plant defenses pp 185-213. Press New York.
30. GULCIN I,. HUYUT Z B,. ELMASTAS M,. HASSAN Y .,2010 – Radical scavenging and anti-oxydant activity of tannic acid,. Arabian journal of chemistry 3, 43-53
31. HADDOUCH T ., CHAOUCH M,. HALLA N,. 2016 – Screening phytochimique, activité anti oxydante et pouvoir hémolytique de quatre plante sahariennes d'Algérie.
32. HERTOOG M G ., FESTENS E J ., HOLLMAN P C.,KATAN M B,. 1993 – Dietary anti oxidant flavonoïde and risk of coronary heart disease , the zutphen dearly study lancet 1993,342:1007 -1011

## Références bibliographiques

---

33. HERVASL P.,FRUCTOS G., RAMOS F ,.GIRALDEZ A?. MANTECON R ,. 2004 – Interaruminal administration of two dose of quebracho tannin to sheep effect on rumen degradation, and total tract digestibility, fiscal recovery and toxicity. Journal of animal and feed science 13,2004.120
34. HEYMONET CLAUD ,. 2013 Les plantes visent anti inflammatoire utilisé en phytothérapie. France
35. IQBAL A., FATRUK A.,OWAIS M ,.2006 – Modern phytomédecine.
36. ISERIN P., 2001 – Encyclopédie des plantes médical, identification, préparation de soin .Edition Larousse 2001 pp335
37. JACQUEMOND C ,. CURK F., HEUZET M ,. 2013 –Les clémentinier et autre petit agrumes,. Edition Quac .R.D 10.78026 Versailles cedex, France pp 32
38. JACQUES J., ANNIE M., FLEURIET C., ALLZMZND J ,.2005 - Les composés phénoliques des végétaux. Imprimé en Italie ISBN2-8807/625-6
39. JASMAN ,. 1993 – Tanins in feed stuffs for simple stomached animal nutrition .Review
40. JEAN-BLAIN C ,. 1998 – Aspect nutritionnel et toxicologique des tannins. Remed édition : 149 911-920
41. JULIEN F., AZAS N ,. JA NSEN O., ANGENOT L., 2005 – Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis*,. DOI:10.1016/J.JEP 2005.12.030
42. KHANBABAEE K., VANREET,. 2001 – Tannin classification and definition natural report product,. Depart of chemistry. University of Vard South Africa
43. KIMBALL,. 1999 - Citrus processing , a complete guide, second edition KIMBALL D A, E D Gartherburg an aspen publication.
44. LECERF M J ,.2014 – Agrume et prévention des maladies neurodégénératif ,. Article de synthèses Publier 25 March 2014 84-88
45. LOERRED Y ,. HADIR et KAIDHARCHE,.2016 – Etude de peroxydation lipidique chez une plante médicinal *Haloxylon*. Journal of bioresource valorisation 1 (1).28-33
46. MA Y Q ,. CHEN J C., LIU D H et YE X-Q ,.2009 – Stimulat extraction of phenolic coumpound of citrus peel extract : Effet of ultrasound, ultrasonics sono chmestry 16:57-62
47. MALAISE M ,. 1996 – Revue anti inflammatoire non stéroïdien,. Agrès par chef de service au niveau de service pharmacologique1996, 51 :1 :123-125

## Références bibliographiques

---

48. MAMADOU BIAYE ,. 2002 – Action pharmacologique des tanins. Thèse doctorat en pharmacie,. Université Cheik Aanta Diop n°101
49. MANAVAR,. MITAL DESAI N ,. 2014 – In vitro anti inflammatory and anti arthric activity of fruit of *Vermonia anthelmintica* , . The journal of pharmaceutical rechearch pp 186-188
50. MEDZHITOV RUSLAN,. 2008- Origin and physiological roles of inflammation,. Nature 24;454(7203):428-35,. DOI:10.1038/nature07201
51. MIGEUL A,. ORTEGA A ,. FEDDI F ,. 2011 – Natural polyphénol in cancer therapy,. Received 26 jul 2011 accepted 11 oct 2011, Puplished 5 dec 2011 pp 197-216
52. MUKKARR P S,. 2000 – Quantification of tainins in foliage, oint FAO/IAE of nuclear technic in food and agriculture animal production and health substance program (Autria) PP40
53. MUSTER D ,. 2005 –Médicament de l’inflammation, anti inflammatory drugs,. France 21-29,2005 DOI : 10.1016
54. NATHAN,. 2002- Point of control inflamation, Nature,520 pp846-852
55. OLIVER S ,. VOITTORIO ,. CILLOE G et BOYER C ,. 2016 - Enhacing therapic effects of polyphenol with macromolecule,. Polymer chestry 7(8),1529-1544
56. PERRET C ,. 2001 Analyse de tannin inhibiteur de la stilbéne oxydase produite par *Potrytis cinerea*,. Thèse doctorat, Université de Neuchatel pp186
57. PILLON FRANCOIS ,. 2014 – Les anti infmamatoire non stéroïdien ;. Pharmacie – service pharmacologique, Lyon France n°534
58. RODONDO M,. PABLO A ,. DOMINGUEZ E ,. FERNANDEZ M,. 2014- Perspective in the use of tanin as alternative to antimicrobial growth profactor in poultry 27 March 2014
59. ROUGEER P,. LEFRERE JJ,. 2011 – Transfusion sanguine. Paris
60. SETH M ,. CHAND S,. 2000 – Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillius awarmori* , optimisization of process parameters, process biochemique,36(1-2):39-44
61. SOUBRIER M,. ROSENDAUM D ,. TATAR Z ,. DUBOST J,.2013 – Anti inflamatoire non stéroïdien et vaissaux. France.
62. SWINGEL WT ,.1967 – The botany of citrus and its wild relations, Industry 1-190-422,1967,. Univestity of California

## Références bibliographiques

---

63. TANAKA, 1997 - Fundamental discussion of citrus classification stud citrologia 14:1-6
64. TETAUX MAX et DANIEL SCIMECA, 2005 – Votre santé par les huiles essentielles(1) :62-70
65. THINAGARAN R et DHARMAU M, 2001- Phytochemical screening *in vitro* and inflammatory activity of trigonella foenicum graecum leaves extract, International journal of pharmaceutical science 157-161
66. TISSOT P, 1939 – Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée pp765-784
67. TRABUT L, 1926 - *Revue de botanique appliquée et agriculture coloniale bulletin n°60 août 1926 «des hybrides de citrus nobilis la clémentine » pp484-489*
68. VERBOIS SYLVIE, 2002 – Plantes et herbes aromatiques saveur et vertus, Edition Fernand Lanore 1, rue Palatine-75006 Paris.
69. WECSHLER D, WECSHLER M, 1997 – *Adult intelligence, Cal revised manual physiologie du corpl, New York*
70. WEILL D, BATTEUX F, DHAINAUT J, 2003 – *Immunopathologie et réaction inflammatoire, Edition de boeck université (Paris)2003,12-23*
71. [www.jardinier-malin.fr](http://www.jardinier-malin.fr)
72. YAICH, GANA H, PAQUOT M, ATTIA H, 2014 – *Effet des conditions d'extraction sur la composition et les activités anti oxydantes des ulvane de algues.*
73. YON C, CHUNG S, 2013 – *l'acide gallique, acide polyphénolique naturel, induit l'apoptose et inhibe l'expression des gènes pro inflammatoires dans les Synoviocytes fibroblastiques de polyarthrite rhumatoïde, Volume 80, May 2013 pp 271-278*
74. YOQIU L, HEYIN E, 2012 – *History global distribution and nutritional importance of citrus fruits, DOI.org/10.21273/JASHS.135.4.341.x*
75. 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*
76. ZIMMER N, CORDESS R, 1996 – *Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants production animals, Anim93.167-179,1996*

## Résumé :

La clémentine est un fruit du bassin méditerranéen, riche en composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques. L'écorce est la partie où les polyphénols se retrouvent en grande quantité en particulier la classe des tanins. Le but de ce travail est d'étudier *in vitro* l'activité anti-inflammatoire, anti-hémolytique et anti-radicalaire des tanins de l'écorce de la clémentine. Les tests *in vitro* étudiés sont : anti-hémolytique, anti-inflammatoire et anti-radicalaire réalisés respectivement sur les globules rouges, le sérum albumine bovine et le DPPH. Les résultats ont montré que les tanins possèdent une forte capacité à protéger l'éclatement des globules rouges comparé à l'acide gallique et au diclofénac notamment pour la concentration 1500µg/ml. Ils ont un rôle protecteur pour les protéines membranaire particulièrement pour la concentration 300µg/ml. Enfin l'effet anti-radicalaire des tanins de l'écorce de la clémentine est le plus élevé à la concentration 0.062 mg/ml. A la lumière de ces résultats, les effets protecteurs (anti-hémolytique et anti-inflammatoire) des tanins méritent des investigations *in vivo*.

**Mots clés :** *Citrus clémentina*, l'écorce, anti-hémolytique, anti-inflammatoire, antioxydant, Tanins.

## Abstract:

Clementine is a fruit from the Mediterranean pond, rich in phenolics compounds to which various biological activities are attributed. The bark is the part where polyphenols are found in large quantities, especially the class of tannins. The aim of this work is to study the anti-inflammatory, anti-hemolytic and anti-radical activities of tannins from the bark of clementine. The *in vitro* tests studied are: anti-hemolytic, anti-inflammatory and anti-radical carried out respectively on red blood cells, bovine serum albumin and DPPH. The results showed that the tannins have a strong ability to protect the bursting of red blood cells compared to gallic acid and diclofenac especially for the concentration 1500µg / ml. They have a protective role for membrane proteins, particularly for the concentration 300 µg / ml. Finally, the anti-radical effect of the tannins in the bark of clementine is highest at the concentration 0.062 mg / ml. In the light of these results, the protective effects (anti-hemolytic and anti-inflammatory) of the tannins deserve *in vivo* investigation

**Key words:** *Citrus Clementina*, bark, anti-hemolytic, anti-inflammatory, anti-oxidant, tannins.

## ملخص

كليمونتين هو ثمرة من حوض البحر الأبيض المتوسط، غنية بالمركبات الفينولية التي تعزى إليها الأنشطة البيولوجية المختلفة. اللحاء هو الجزء الذي يوجد فيه مادة البوليفينول بكميات كبيرة، وخاصة فئة التانينات. الهدف من هذا العمل هو دراسة النشاط المضاد للالتهابات و مضاد للدم ومضاد الأكسدة للتانينات من لحاء الكليمونتين. الاختبارات المخبرية التي تمت دراستها هي: مضاد للدم ومضاد للالتهابات تم إجراؤه على التوالي على خلايا الدم الحمراء وألبومين المصل البقري. أوضحت النتائج أن التانينات لديها قدرة قوية على حماية انفجار خلايا الدم الحمراء مقارنة بحمض الغاليك و ديكلوفيناك، خاصة بالنسبة للتركيز 1500 ميكروجرام / مل. لديهم دور وقائي لغشاء بروتينات، خاصة بالنسبة للتركيز 300 ميكروغرام / مل. وأخيرًا، يكون التأثير المضاد للأكسدة للتانينات من لحاء الكليمونتين أعلى عند التركيز 0,062 مجم / مل. في ضوء هذه النتائج، تستحق الآثار الوقائية (المضادة للإنحلال والمضادة للالتهابات) للتانينات تحقيقات في الجسم الحي.

**الكلمات المفتاحية:** *Citrus clémentina* , لحاء , مضاد انحلال الدم , مضاد التهاب , مضاد أكسدة , التانينات.