

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et
de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de master en Biologie

Option :

Physiologie cellulaire et physiopathologie

Thème :

**Etude *in vitro* de l'activité anti-hémolytique anti-
inflammatoire et anti-radicalaire de l'extrait de l'écorce de
clémentine**

Présenté par :

BENCENOUCI Zineb & BOUGHELLAM Khadidja

Soutenu le : 08/07/2020

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme LOUKIDI B

MCA

Université de Tlemcen

Examinatrice : Mme SAKER M

MCA

Université de Tlemcen

Promotrice : Mme BEKHTI SARI F

MCB

Université de Tlemcen



Remerciements

On remercie tout avant ''Allah ''le tout puissant qui nous a procuré du courage et de la volonté pour mener ce modeste travail.

*Nous tenon vivement à remercier notre encadreur **Mme BEKHTI SARI Fadia**, maitre de conférence à la faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, département de biologie qui nous a dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nos sincères remerciements vont également à Madame **LOUKIDI Bouchra**, maitre de conférences à l'université de Tlemcen pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.*

*Nos remerciements s'étendent également à Madame **SAKER Meriem**, maitre de conférences à l'université de Tlemcen, d'avoir voulu accepter de faire partie du jury.*

*Enfin, on remercie tous ceux qui nous ont accompagnés tous ces années et qui nous ont aidés, d'une manière ou d'une autre à mener ce travail à terme ; nous disons : « **MERCI** ».*



Dédicaces

Je dédie ce modeste mémoire à :

A mes très chers parents ; exemple de labeur, d'amour et d'inlassable dévouement. En témoignage de mon amour filial et de mon infinie reconnaissance pour tous les efforts et les sacrifices déployés à mon égard. Que ma réussite soit pour vous un gage de remerciement et sincère attachement.

*A mes chers frères **Abd Halim, Farid et Sid Ahmed**; en témoignage de mes sentiments de vive affection et de profonde gratitude, avec mes souhaits de santé et de bonheur.*

*A mes chères sœurs **Amina et Fatima Zohra** pour leurs encouragements tout au long de mes études et ma vie.*

*A ma belle-sœur **Fatima** pour son encouragement précieux.*

*A mon neveu **Zakaria** et mes nièces **Hadjer, Anfel et Imen**, mon véritable faisceau d'amour et de réconfort avec toute mon affection*

*A mon binôme **Khadidja** pour sa disponibilité et son appréciable aide qui m'a permis de réaliser ce travail.*

Ainsi qu'à tous ceux ou celles qui m'ont apporté leur soutien, réconfort moral et leur contribution dans l'élaboration de ce mémoire.

Zineb





Dédicaces

Avec l'aide de dieu le tout puissant qui m'a éclairé les chemins du savoir que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie:

A ma très chère mère

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte maman, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

*A mon frère **AMINE** et ma sœur **NIDHAL** Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de réussite, de santé et de bonheur.*

*A mon binôme **ZINEB** et mes amies **SANAA**, **CHAIMAA** et **HANANE** Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

Khadidja



SOMMAIRE

Introduction

Partie I : Synthèse bibliographique.

I. L'orange:	1
I .1.Généralités:.....	1
I.2.Histoire et origine :	1
I.3.Description botanique de l'Oranger :	2
I.4. Composition chimique et valeur nutritinnelle del'orange :	2
II.Clémentine:	3
II.1.Généralités:.....	3
II.2.Histoire et origine :	3
II.3.Structure de la clémentine:	4
II.4.Systématique et description botanique :.....	5
II.4.1.Systématique :	5
II.4.2.Description botanique :.....	5
II.5.Composition chimique et valeur nutritionelle :.....	6
II.6.Productiont mondiale et nationale :	6
II.7.Variétés de la clémentine :	6
II.8.Les bienfaits de la clémentine :	7
III-L'hémolyse:	8
III.1.Les caractéristiques des globules rouges:	8
III.2.Role des globules rouges :.....	8
III.3.L'hémolyse :.....	9
III.4.Types d'hémolyse :	9
III.4.1.L'hémolyse extravasculaire :.....	9
III.4.2.L'hémolyse intravasculaire :	9
III.4.3.L'hémolyse pathologique :.....	10
III.5.Les anémies hémolytiques :	10
III.6.Les anti-hémolytiques :	11
IV. L'inflammation :	13
IV.1. Définition et Généralités :	13
IV.1.1. Facteurs étiologiques :.....	13

IV.1.1.1. Facteurs exogènes :	13
IV.1.1.2. Facteurs endogènes :	14
IV.2. Les cellules de la réponse inflammatoire :	14
IV.3. Médiateurs de la réponse inflammatoire :	15
IV.3. Types d'inflammation :	16
IV.3.1. L'inflammation aiguë :	16
IV.3.2. L'inflammation chronique :	16
IV.4. Anti-inflammatoires :	17
IV.4.1. Généralité et mode d'action :	17
V. Stress oxydatif :	19
V.1. Définition :	19
V.2. Les types des radicaux libres : on distingue deux types des radicaux libres :	20
V.2.1. L'espèce réactive oxygène (ERO) :	20
V.2.2. Les espèces réactives d'azotés (RNS) :	22
V.3. Conséquences du stress oxydant :	22
V.4. Les antioxydants :	23
V.4.1. Les antioxydants endogènes :	24
V.4.2. Les antioxydants exogènes :	25
V.4.2.1. Les vitamines :	25
V.4.2.2. Les oligoéléments :	25
V.4.2.3. Les composés phénoliques :	26
V.4.2.3.1. Définition :	26
V.4.2.3.2. Classifications des polyphénols :	27

Partie II : Matériel et méthode

<i>I</i> . Matériel végétal :	27
<i>II</i> . Préparation des extraits des peaux sèches de la clémentine :	27
II.1. Le séchage :	27
II.2. Le broyage et le tamisage :	27
<i>III</i> . Extraction des polyphénols totaux :	27
III.1. Principe de dégraissage d'échantillon :	27
III.2. Mode opératoire :	27
<i>III</i> .3. Macération :	28
<i>III</i> .4. L'évaporation :	28

IV. Détermination de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire et antioxydante de l'extrait de l'écorce de clémentine :.....	28
IV. 1. Préparation de la suspension de globules rouges :.....	28
IV .2. Test de cytotoxicité :	29
IV.1.1 .Principe :	29
IV .1.2 . Mode opératoire :.....	29
IV.2 .Test de l'activité anti-hémolytique <i>in-vitro</i> de l'extrait :.....	29
IV 2.1. Principe :	29
IV.2.2.Mode opératoire :.....	29
IV.3.Test de l'activité anti-inflammatoire :.....	30
IV.3.1.Mode opératoire :.....	30
IV .4 .Test de l'activité anti radicalaire :	31
IV .4 .1. Principe :	31
IV .4 .2.Mode opératoire :.....	31

Partie III : Résultats et interprétations

I .Test de cytotoxicité :.....	32
II. Evaluation de l'activité anti-hémolytique, <i>in vitro</i> , des extraits par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges:	33
III.Activité anti-inflammatoire :.....	36
IV. Test anti-radicalaire :	37
IV.1.Piégeage DPPH :	37

Discussion

Conclusion

Références bibliographiques

La liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

BSA : sérum bovin albumine

CAT: catalase

COX : cyclo oxygénase

CSF: colony stimulating factors

DPPH : diphénylpicrylhydrazyl

ED : eau distillée

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

g: Gramme

GPx : Glutathion peroxydase

GR : Globule rouge

GSH : glutathion réduit

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HOCL : acide hypochloreux

HB: Hémoglobine

IC 50 : concentration efficace à 50%

IL: interleukines

INF: interféron

Kcal: Kilo calories

mg: milligramme

MGG: May Grunewald Giemsa

mg/ml : Milligramme par millilitre

nm : nanomètre

O₂ : oxygène

O₂•- : anion super oxyde

O₂¹ : L'oxygène singulet

OH• : radical hydroxyle

ONOO⁻ : peroxydite

PH : Potentiel d'hydrogène

PPA : protéine phase aigue

RNS : espèces réactives d'azotés

SOD: super oxyde dismutase

TGF: transforming growth factor

TNF: tumor necrosis factor

UV: Ultraviolet

V/V : volume/volume

µg : Microgramme

µL : microlitre

%: pourcent

La liste des tableaux

<u>Tableau n° 01</u> : Principaux constituants de l'orange	2
<u>Tableau n° 02</u> : Classification botanique de clémentine.....	5
<u>Tableau n° 03</u> : Description botanique de la clémentine.....	5
<u>Tableau n° 04</u> : Valeur nutritionnelle et chimique de la clémentine.....	6
<u>Tableau n° 05</u> : Les bienfaits de la clémentine.....	7
<u>Tableau n° 06</u> : Exemple de quelque plante médicinale douée d'une activité anti-hémolytique.....	11
<u>Tableau n° 07</u> : plantes douées d'une activité anti inflammatoire.....	16

La liste des figures

Figure n° 1 : Photo du fruit citrus sinensis.....	1
Figure n° 2 : photo du fruit Citrus clémentina.....	3
Figure n° 3 : Coupe transversale d'une clémentine.....	4
Figure n° 4 : Photomicrographie des globules rouges.....	8
Figure n° 5 : la balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.....	17
Figure n° 6 : aperçu des différentes espèces réactives oxygénées (ERO) et des antioxydants régulateurs de leurs productions.....	21
Figure n° 7 : Structure du noyau phénol.....	24
Figure n° 8 : Structure chimique des acides hydroxy benzoïque (a) et Structure chimique des acides hydroxy cinnamiques (b).....	25
Figure n° 9 : Structure générale d'un flavonoïde.....	25
Figure n° 10 : structure de base tanins condensés.....	26
Figure n° 11 : L'écorce séchée.....	27
Figure n° 12 : L'écorce broyée et tamisée.....	27
Figure n° 13 : Délipidation, séchage et filtration de la poudre dégraissée.....	28
Figure n° 14 : Evaporation des solvants dans le rota vapeur.....	28
Figure n° 15 : Réduction du radical DPPH.....	31
Figure n°16 : Effet des différentes concentrations des tanins sur la cytotoxicité des globules rouges.....	32
Figure n° 17 : Comparaison des différentes concentrations en acide gallique et polyphénols sur la cytotoxicité des globules rouges.....	33
Figure n° 18 : Effet des différentes concentrations des polyphénols sur le taux d'hémolyse.....	34
Figure n° 19 : Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et les polyphénols.....	34

Figure n° 20 : Comparaison du taux d'hémolyse entre le diclofenac et les polyphénols.....	35
Figure n°21 : Comparaison du taux d'hémolyse entre le diclofenac, l'acide gallique et les polyphénols.....	35
Figure n° 22 : Taux d'inhibition de la dénaturation protéique par les polyphénols.....	36
Figure n°23 : Comparaison du taux d'inhibition de la dénaturation protéique entre le diclofenac et les polyphénols.....	36
Figure n°24 : Réduction de l'absorbance en fonction du temps.....	37

Introduction

L'homme s'intéresse aux vertus des plantes depuis longtemps principalement dans un but médicinal. Les plantes constituent la base de la médecine traditionnelle et forment une merveilleuse source de médicaments grâce à leurs richesses en métabolites secondaires utilisés comme composés bioactifs (**Ramful et al., 2010 ; Ladah et al., 2014**).

Parmi ces plantes riches en métabolites secondaires les agrumes avec tous ses espèces (l'orange, pamplemousse, mandarine, clémentine, citron, pomelo, lime...etc.) constituent une source inestimable de composés bioactifs (**Abobatta., 2019**). Il serait intéressant de souligner que les agrumes sont les fruits les plus consommés dans le monde avec une production mondiale qui se situe autour de 108 millions de tonnes d'après (**FAO 2006**).

Parmi les agrumes, l'Orange est l'agrumes le plus populaire et le plus consommé dans le monde. IL est très connu grâce à sa valeur nutritionnelle et ses propriétés médicinales. L'orange est une source importante de composés bioactifs comme les polyphénols, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les vitamines, les fibres et les minéraux (**Benamerouch et al., 2016**). Ces composés ont des effets bénéfiques sur la santé de l'homme, car ils possèdent de nombreuses activités biologiques comme l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, anti diabétique, anti-hypertensive et antivirale (**Milind &Dev, 2012**), et protège l'organisme contre les maladies dégénératives comme le cancer, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (**Manarche et al., 2004 ; Etebu et al., 2014**).

Ces composés bioactifs comme les polyphénols et les flavonoïdes se trouvent en grande proportion dans l'écorce d'orange et jouent un rôle protecteur et inhibiteur des effets néfastes des radicaux libres sur l'organisme humain (**Sultana et al., 2015**). Les polyphénols présentent une activité antioxydante très puissante parce qu'ils sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par l'organisme et ils renforcent aussi nos défenses naturelles contre le stress oxydatif.

Ils peuvent également agir comme chélateurs d'ions métalliques pro-oxydants comme le fer, le cuivre, le zinc et inhibent la production des radicaux libres. Les polyphénols empêchent l'oxydation des lipoprotéines de faibles densités et ils peuvent aussi protéger

l'organisme contre l'infarctus du myocarde ou l'athérosclérose coronarienne (**Cook & Smman, 1996**).

En plus de leur activité antioxydante, les flavonoïdes présentent une activité anti-inflammatoire très intense car ils sont capables de contrôler la formation des médiateurs biologiques responsables de l'activation des cellules endothéliales et des cellules spécialisées dans l'inflammation et d'inhiber les enzymes essentiels pour la transduction du signal cellulaire et l'activation du processus inflammatoire (**Etebu et al., 2014**).

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une valorisation de l'extrait de l'écorce de la clémentine en tant que composés bioactifs. Le but de ce travail est d'étudier *in-vitro* l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire et anti-radicalaire des extraits de l'écorce de clémentine. Ceci afin de déterminer la concentration optimale des polyphénols qui permet de protéger les globules rouges de l'hémolyse et effet anti-inflammatoire et effet anti-radicalaire optimal. Pour cela nous avons réalisé un test de cytotoxicité pour cibler les concentrations à utiliser ensuite un test anti hémolytique pour tester la capacité des extraits à empêcher l'hémolyse des GR , induite par l'hypotonie et la chaleur Le test anti inflammatoire pour tester la capacité des extraits à empêcher la dénaturation des protéines et à la fin le test anti-radicalaire en utilisant le radical DPPH pour tester la capacité antioxydant de l'extrait.

Synthèse bibliographiques

I. L'orange:

I.1.Généralités:

L'orange est un agrume, fruit savoureux et juteux avec un petit arbre à feuilles persistantes, botaniquement connu sous le nom de *Citrus sinensis* et appartenant à la famille des *Rutaceae* (Jacqemond *et al.*, 2009).

L'orange est un fruit de forme sphérique à ovale a une peau épaisse, orange rougeâtre et assez rugueuse contenant des huiles essentielles donnant une odeur caractéristique. L'orange est un fruit juteux, sucré ou légèrement acide riche en vitamine C, en polyphénols et en flavonoïdes. Ces composés biologiquement actifs préviennent l'artériosclérose, le cancer, les calculs rénaux, les ulcères d'estomac et la réduction du taux de cholestérol et de l'hypertension, ce qui favorise la santé humaine (ETEBU *et al.*, 2014).



Figure n° 01 : Photo du fruit *Citrus sinensis*.

I.2.Histoire et origine :

Le terme orange est apparu au XIII^e siècle. L'oranger (*Citrus sinensis*) est originaire de Chine ou il est utilisé comme plante médicinale. Il est cultivé en Asie de plus de 4000 ans. On peut distinguer deux grandes routes de pénétration de ce fruit en Europe. La route méditerranéenne fut empruntée, à l'époque des croisades (XI^e siècle- XIII^e siècle), par l'orange amère ou bigarade transmis par les Perses aux Arabes, ce fruit fut implanté en Andalousie, Séville et pays Valencien, d'où il se diffusa vers le reste de l'Europe. A la fin du XV^e siècle, les navigateurs portugais découvrirent l'orange douce en Chine, et la rapportèrent en Europe. Une fois implanté dans le bassin méditerranéen, l'oranger est diffusé à travers le monde par les Européens (Liu *et al.*, 2012).

I.3. Description botanique de l'Oranger :

L'oranger est un arbre au port harmonieux et de croissance rapide qui peut atteindre rapidement 7 à 8 m, ses feuilles vertes sombres persistantes, légèrement ailés, ses fleurs blanches immaculés et très parfumés; ses fruits de forme et de colorations variables en fonction des différents groupes auxquelles ils appartiennent. Ses pulpes juteuses qui diffèrent en couleur et en acidité selon les variétés.

I.4. Composition chimique et valeur nutritive de l'orange :

L'orange est une source importante de composés caractérisés par une activité antioxydante comme la vitamine C, vitamines A, les flavonoïdes, les polyphénols et les minéraux mais aussi des composants organiques, énergétiques, glucidiques.....etc. Le tableau ci-dessous résume les principaux composants de l'orange :

Tableau n° 01: Principaux constituants de l'orange (Abobatta, 2019).

Composants	Quantités	Composants	Quantités
Énergie (kcal)	43	Fer(g)	0.7
Protéine(g)	0.8	Calcium (mg)	47
Glucides(g)	11.75	Cuivre (mg)	0.045
Fibres(g)	2	Magnésium (mg)	11
Lipides(g)	0.3	Zinc (mg)	0.07
Eau (g)	90	Potassium (mg)	170
Phosphore (mg)	30	Vitamine A (µg)	11
Sodium (mg)	3	Vitamine E (mg)	0.34
Flavonoïdes (mg)	44.93	Vitamine C (mg)	60
Caroténoïdes (mg)	11.75	Vitamine B5 (mg)	0.037
Vitamine B3 (mg)	0.028	Vitamine B5 (mg)	0.025

II. Clémentine:

II.1. Généralités:

La clémentine est un agrume fruit du clémentinier (*Citrus clémentina*), un arbre hybride de la famille des rutacées, issue du croisement entre un mandarinier (*Citrus reticulata*) et un oranger (*Citrus sinensis*). La peau est brillante, de couleur orange à rougeâtre, finement granulée, ayant une épaisseur qui varie selon les clones de 2.5 à 4.5 mm. La pulpe est riche en jus, tendre et parfumée. Les fruits sont d'un poids moyen de 60g. Le bassin méditerranéen est la principale zone de production de clémentine ; l'Espagne, le Maroc, l'Algérie sont les grands pays producteurs (**Trabut, 1926**).



Figure n° 02 : Photo du fruit *Citrus clémentina*.

II.2. Histoire et origine :

La clémentine est un agrume qui est apparue à la fin du XX^e siècle et qui doit son nom au frère clément (Vital Rodier, 1839-1904). C'est le révérent père clément qui la découvrit au niveau des pépinières de l'orphelinat agricole de Messerghin près d'Oran, Algérie.

En 1902, le docteur Trabut, botaniste et médecin français affirme que le frère clément aurait identifié dans un semis de pépins de mandarinier, une plante qui semble d'origine hybride et dont certains produisent un fruit au goût nouveau et agréable (**Trabut, 1926**). A l'époque la clémentine a été considérée comme un hybride naturel entre la mandarine et le bigarade.

Toute fois, grâce à l'étude de son patrimoine génétique réalisé en 2002 par les chercheurs du station INRA en Corse, il est établie que la clémentine est en fait un croisement naturel entre la mandarine et une orange douce (**Jacquemond *et al.*, 2013**).

II.3. Structure de la clémentine:

Les fruits de citrus présentes tous la même structure anatomique (**Ramful *et al.*, 2010**). Ce sont des fruits charnus de type baie composée de deux parties : la peau également appelée péricarpe et la pulpe appelée aussi endocarpe (**figure n°03**).

La péricarpe est devisé en deux partie :

1-L'épicarpe riche en glande à huile essentiel.

2-La mésocarpe qui est aussi divisé en deux parties : le mésocarpe externe forme le « flavedo » et le mésocarpe interne forme « albedo » qui est la couche blanchâtre, spongieuse, plus ou moins épaisse et peut constituer 12 à 30% du fruits.

L'endocarpe ou « pulpe » est la partie comestible du fruit formé de segments ou « quartiers » dont le nombre varie entre 5 et 18. Les sacs à jus sont implantés autour d'un axe central et leurs vacuoles se remplissent de jus au cours du développement.

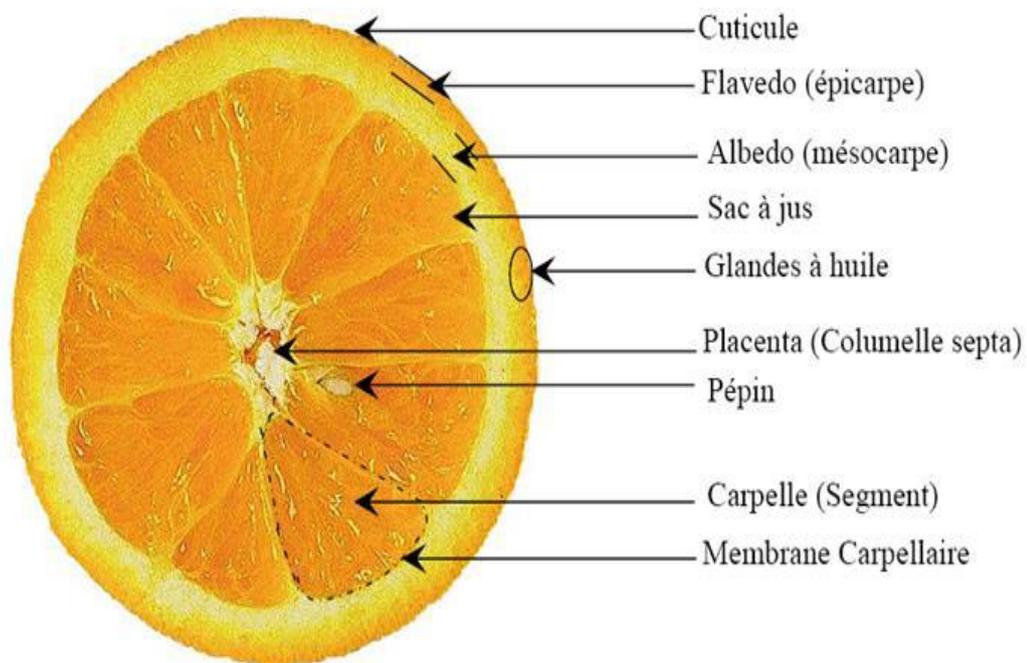


Figure n° 03 : Coupe transversale d'une clémentine (**Milind, 2008**).

II.4. Systématique et description botanique :**II.4.1. Systématique :**

La clémentine appartient à la famille des rutacées selon le tableau suivant :

Tableau n° 02: Classification botanique de clémentine (Milind & Dev, 2012)

Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Sapinales
Famille	Rutaceae
Genre	Citrus
Espèces	Clementina

II.4.2. Description botanique :

Le tableau 4 ci-dessous présente les principaux caractères botaniques de la clémentine:

Tableau n° 03: Description botanique de la clémentine (trabut, 1926).

Nom latin	<i>Citrus clémentina</i> ou <i>Citrus réticulata</i>
Origine	Croisement entre un mandarinier et un bigaradier
Couleur des fleurs	Blanc
Types de plantes	Arbre fruitier, agrume
Types de végétation	Vivace
Type de feuillage	Plus ample et plus foncé persistant
Période de floraison	De mars à juillet
Hauteur	8 m en plein terre

II.5. Composition chimique et valeur nutritionnelle :

La clémentine est un fruit hivernale par excellence, il contient des composés chimiques naturels comme les vitamines, les oligoéléments les fibres, la composition chimique de la clémentine présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau n° 04 : Valeur nutritionnelle et chimique de la clémentine (**Abobatta, 2019**).

Composants	Quantités	Composants	Quantités
Energie (k-cal)	46	Cuivre(mg)	0.035
Protéine(g)	0.8	Magnésium(mg)	12.3
Glucides(g)	11.9	Zinc(mg)	0.059
Fibrs(g)	1.7	Iode(µg)	13
Lipides(g)	0.19	Potassium(mg)	147
Eau(g)	86.6	Vitamine A(µg)	9.67
Sucre(g)	9.18	Vitamine E(mg)	0.2
Fer(g)	0.09	VitamineC(mg)	18.7
Calcium(mg)	17.9	Vitamine B9(µg)	10

II.6. Production mondiale et nationale :

La production mondiale de clémentine est d'environ 24 millions de tonnes. Les principaux producteurs sont le Brésil avec 36.6 millions tonnes ensuite les Etats unies avec 15.7 millions tonnes ensuite la Chine avec 14.4 millions tonnes suivie par l'Espagne, et le Japon (**FOA, 2018**).

L'Algérie a produit 52 millions quintaux de clémentine durant l'année 2018 selon un communiqué du ministère de l'Agriculture, du développement rural et de la Pêche Marin.

II.7. Variétés de la clémentine :

Les principales variétés de la clémentine sont (**Jacquemond et al., 2013**) :

- ❖ **Clémentine Caffin** : elle provient d'une sélection de la clémentine commune découverte au Maroc (**Caffinen, 1968**).
- ❖ **Clémentine Ragheb** : provient d'une sélection de clémentine commune découverte à la fin des années 50 par Kuneyl en Algérie dans la région Annaba.
- ❖ **Clémentine commune** : c'est le résultat d'hybridation du père clément.

II.8. Les bienfaits de la clémentine :**Tableau n° 05 :** Les bienfaits de la clémentine (ETEBU *et al.*, 2014 ; Abobatta, 2019).

<u>Propriétés-Anti cancérigènes :</u>	Les flavonoïdes peuvent empêcher le cancer par cytotoxicité sélective et par actions antiprolifératives et apoptose. Les flavonoïdes sont antimutagènes et protègent ainsi l'ADN des dommages par leur capacité à absorber la lumière ultraviolette. Ils neutralisent les radicaux libres qui favorisent les mutations.
<u>Protection cardiovasculaire</u>	Les flavonoïdes présents dans la clémentine permettent de prévenir les risques des maladies cardiovasculaires en équilibrant le bilan lipidique.
<u>Anti- -inflammatoire :</u>	Les flavonoïdes présents dans la clémentine comme l'hespéridine, la diosmine, la quercétine et d'autres ont montré une activité anti-inflammatoire dépendante de la dose en influençant le métabolisme de l'acide arachidonique et de l'histamine.
<u>Anti-hyperglycémie :</u>	Les flavonoïdes présents dans la clémentine jouent un rôle important dans la prévention de l'augmentation de la glycémie, en partie en se liant à l'amidon, augmentant la glycolyse hépatique et abaissant de la néoglucogenèse hépatique.
<u>Anti-obésité :</u>	La clémentine contient peu de calories et ne contient ni graisses saturées ni cholestérol et elle est riche en fibres alimentaires, la pectine qui est très efficace chez les personnes obèses.
<u>Antivieillessement de la peau :</u>	La clémentine est riche en vitamine E, antioxydant puissant qui permet de régénérer les cellules de peau et elle soulage les douleurs menstruelles.
<u>Anti dépressive :</u>	L'huile essentielle de clémentine atténue les tensions nerveuses ainsi que le sentiment de crainte profonde elle est considérée comme calmante du système nerveux central, combattant ainsi l'anxiété et le stress.
<u>Préserve la vue :</u>	La vitamine A présente dans la clémentine préserve la vue et protège les yeux.
<u>Santé des os</u>	Les caroténoïdes présents dans la clémentine avec une quantité non-négligeable préservent les os contre l'ostéoporose et renforcent les os.
<u>Anti- crampes</u>	Le potassium présent dans la clémentine avec une grande quantité préserve l'organisme contre les crampes et l'arthrose.

III-L'hémolyse:

III.1.Les caractéristiques des globules rouges:

Les globules rouges encore appelés hématies ou érythrocytes sont des cellules anucléés arrondies en forme de disque biconcave, de taille qui varie de 4 à 7 μ m. La forme discoïde biconcave des globules rouges favorise l'ancrage du cytosquelette, permet d'avoir une grande surface par rapport à son volume que la forme sphérique et d'avoir une grande déformabilité et élasticité qui permet le passage des globules rouges dans les capillaires qui n'ont que 0.5 à 2 μ m de diamètres (**Aguilar et Martinez., 2007**).

Ils prennent une coloration rose vif au **MGG** (May Grunwald Giemsa) au microscope optique.

Chez les mammifères, le nombre de globules rouges varie en fonction de l'âge, le sexe et l'altitude. Les globules rouges sont plus nombreux chez l'homme que chez la femme. Les gens vivants en haute altitude ont plus d'hématies que les gens vivants dans les plaines. La forme et la taille des GR sont à l'état normal très homogènes et toute variation traduit une anomalie cellulaire (**Aguilar et Martinez., 2007**).



Figure n° 04 : Photomicrographie des globules rouges.

III.2.Role des globules rouges :

La fonction principale des GR est le transport d'oxygène des poumons vers les organes.

Ils traversent les poumons où ils fixent l'oxygène (O_2) sur l'hémoglobine (HB) qui devient l'oxyhémoglobine et libèrent le CO_2 . Les globules rouges traversent les capillaires des différents organes où l'HB libère l' O_2 (désoxyhémoglobine) et se charge en CO_2 .

(carboxyhémoglobine) (**Aguilar et Martinez., 2007**). Le sang artériel de couleur rouge vif va devenir de couleur rouge plus foncée après son passage dans les tissus et libérations d'O₂.

Les globules rouges (GR) vont repartis dans la circulation veineuse, et se trouvent au niveau des capillaires veineux des poumons qui vont lui fournir de l'O₂ en échanges de CO₂.

III.3.L'hémolyse :

L'hémolyse est un processus irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent son contenu hémoglobinique dans le plasma (**Aguilar et Martinez., 2007**). Et quand leur durée de vie est moins de 100 jours plutôt que 120 jours (hémolyse physiologique) (**Thomas, 2013**).

L'hémolyse peut être causée par des facteurs intrinsèques comme l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine et des facteurs extrinsèques tel qu'une réponse anormale du système immunitaire, la formation de caillots dans les capillaires sanguins et les effets secondaires de certains médicaments (céphalosporines, la pénicilline, lévofloxacine....) (**Mintzer et Billet., 2009**).

III.4.Types d'hémolyse :

III.4.1.L'hémolyse extravasculaire :

Dans ce cas l'hémolyse s'effectue en dehors des vaisseaux. Les globules rouges sont phagocytés par les macrophages et l'hémoglobine se libère directement dans les macrophages de la moelle osseuse. Chez le sujet normal, la majorité des globules rouges sont détruites dans la moelle osseuse (minimum 50%) et le reste se répartit dans l'organisme, en particulier le foie et la rate. La phagocytose porte sur les globules rouges dont le vieillissement est traduite par la diminution du contenu enzymatique, ralentissement du métabolisme, perte de lipides membranaire, des modifications morphologiques ou la cellule a tendance à la sphéricité par réduction de la surface de la membrane, des modifications de l'élasticité et diminution de la déformation dans les globules rouges entraînant une stagnation dans les capillaires (**Aguilar et Martinez., 2009**).

III.4.2.L'hémolyse intravasculaire :

Ce mécanisme est plus rare, l'hémolyse se déroule au sein de la circulation sanguine où les globules rouges sont lysés et libèrent ses contenues dans les vaisseaux notamment l'hémoglobine qui forme un complexe avec l'haptoglobine synthétisé par le foie, ce

complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradé (**Aguilar et Martinez., 2009**).

III.4.3.L'hémolyse pathologique :

Elle est définie par la destruction précoce et exagérée des globules rouges sous l'effet d'un processus pathologique qui peut être intrinsèque ou extrinsèque. Ce processus peut être congénital ou acquis, il affecte toujours un des constituants vitaux des globules rouges (**Beaumont et Hergaux., 2009**).

L'hémolyse pathologique peut être due à deux causes principales :

- **Anomalie des globules rouges** : destruction des globules rouges due à une anomalie constitutionnel de l'hémoglobine (anomalie de structure), anomalie constitutionnel de la membrane des hématies (augmentation de la perméabilité de la membrane au Na⁺ et à l'eau) et un déficit enzymatique des globules rouges (défaut de régénération d'ATP).
- **Agression extrinsèque des hématies qui est caractérisé par** : Agression directe des globules rouge par des toxines bactériennes, Animales, chimiques ou par des parasites, rigidité anormale acquise de la membrane des globules rouges : anémies hémolytiques auto-immunes (**Marc, 2013**).

III.5.Les anémies hémolytiques :

L'anémie est une diminution du taux d'hémoglobine circulant. On ne définit donc pas l'anémie par la diminution du nombre de GR. De plus, le taux d'Hb dans le sang peut diminuer alors que le nombre de GR reste stable : c'est le cas des anémies microcytaires.

La diminution du taux d'hémoglobine peut être due :

- Soit à l'augmentation des pertes en GR. Elle seront accompagnées d'une augmentation réactionnelle du taux de réticulocytes insuffisantes pour maintenir le nombre des hématies circulantes avec cet excès de perte : ce sont **les anémie régénératives**.

- Soit une diminution de production de GR. La production de réticulocytes devient insuffisante pour maintenir le nombre des hématies circulantes dans des conditions physiologiques normales : ce sont **les anémies arégénératives**.

-Les anémies hémolytiques : Les anémies régénératives sont d'origine périphérique à l'inverse des anémies arégénératives le plus souvent d'origine centrale. C'est pourquoi elles sont les plus souvent normocytaires car il n'y a aucune anomalie de production des GR mais uniquement un excès de leur élimination. Toutefois, elle peuvent devenir macrocytaires (si elles durent trop longtemps) à cause de l'hyperréticulocytose réactionnelle (un réticulocyte ayant un volume supérieur à celui d'un GR « adulte ») **(James phillips & Adam., 2018).**

III.6.Les anti-hémolytiques :

Les traitements d'une hémolyse pathologique sont aussi nombreux qu'il y a de formes différentes d'anomalies hémolytiques. Il conviendra en premier lieu d'identifier la cause de l'anomalie.

On pourra ensuite mettre en place de manière ciblée **(Bachy et al., 2015) :**

-Une supplémentation en acide folique notamment pour les patients avec une anémie hémolytique chronique (lors des chimiothérapies par exemple).

-Une transfusion sanguine si nécessaire.

Dans certains cas, une ablation de la rate (splénectomie) sera nécessaire.

- Chez les personnes splénectomisées, on recommandera la vaccination afin de minimiser le risque infectieux chez des patients aux défenses immunitaires basses.

-Des corticoïdes, des immunoglobulines ou des immunosuppresseurs lorsque l'anémie est auto-immune ou à composante inflammatoire.

Ces dernières années, la médecine traditionnelle a tendance de traiter les anémies hémolytique par le biais d'anti-hémolytiques d'origine végétale à cause de leurs richesses en molécules bioactives et leur diverse propriété pharmacologique. Le tableau ci-dessous résume quelque plantes médicinales douées d'une activité anti-hémolytique.

Tableau n°06: Exemple de quelque plantes médicinales douées d'une activité anti-hémolytique :

Matrice végétale	Test utilisé	Référence
Feuilles de piber betel (Le bétel) (Inde)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Devjani et barkhashah 2011
Thymus partie aérienne satureioides 'Thym a feuille de sarriette) (Maroc)	Hémolyse induite par un puissant oxydant l'AAPH	Mhamed ramchoun et al/2015
Grain Brain (son de grain) (Inde)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Nabavi et al/2010
Partie aérienne de scanescen morettia (Algérie)	Hémolyse induite par le triton x- 100	Mohammadi et Atik 2014
Fruit de dactilifia du phénix (palmier) (Maroc)	Hémolyse induite par un puissant oxydant l'AAPH	Eimaddine et al 2016

IV. L'inflammation :

IV.1. Définition et Généralités :

L'inflammation est une réponse biologique complexe du système vasculaire et tissulaire contre les agents agressifs tels que les agents pathogènes, les irritants ou des cellules endommagées (**Sarkhel, 2015**). La fonction principale de l'inflammation est de résoudre l'infection ou de réparer les dommages et de revenir à un état d'hémostase, l'inflammation se manifeste par des symptômes plus ou moins difficiles comme la rougeur, la douleur, la chaleur, et la tuméfaction.

La réponse inflammatoire se déroule en quatre phases: la reconnaissance de l'agent pathogène, le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'infection, l'élimination du microorganisme et la résolution de l'inflammation. Dans le processus de défense de l'organisme, la réaction inflammatoire est bénéfique bien que souvent le dénombrement de certains médiateurs entraîne un grand nombre de conséquences délétères voir néfastes pour l'organisme (**Barton, 2008**).

IV.1.1. Facteurs étiologiques :

Des facteurs différents sont capables d'induire une réponse inflammatoire contre les lésions tissulaires et les infections par des agents pathogènes. Chacun de ces déclencheurs représente une contrainte qualitativement distincte au système immunitaire (**Barton, 2008**). Les causes de la réaction inflammatoire peuvent être d'origine exogène ou endogène.

IV.1.1.1. Facteurs exogènes :

- Agents biologiques : les virus, les bactéries, les champignons et les parasites.
- Agents physiques : la chaleur, le froid, les brûlures, les radiations, les piqûres et les coupures.
- Agents chimiques et toxiques : les toxines, venin, et les caustiques (bases et acides).

IV.1.1.2. Facteurs endogènes :

Les anomalies de vascularisations provoquées par l'ischémie, les cellules tumorales mortes, les allergènes, les anomalies de la réponse immunitaire, les réactions auto-immunes déclenchent la réaction inflammatoire (**Arib, 2015**).

IV.2. Les cellules de la réponse inflammatoire :

Dans la phase aiguë de l'inflammation, les plaquettes et les cellules granulocytaires tels que les basophiles, les mastocytes, les neutrophiles et les éosinophiles produisent et libèrent à leur tour un certain nombre de médiateurs solubles qui stimulent et régulent la réponse inflammatoire.

a) Les cellules phagocytaires :

Les cellules phagocytaires regroupent les neutrophiles qui sont les premières cellules attirées vers le lieu d'une inflammation, suivi par les monocytes qui peuvent se différencier en macrophages et en cellules dendritiques et sont recrutés par chimiotactisme dans les tissus endommagés. Pendant l'inflammation les macrophages présentent des antigènes et modulent la réponse inflammatoire en produisant des cytokines et des facteurs de croissances (**Chen et al., 2017**).

b) Les éosinophiles :

Les éosinophiles sont les cellules inflammatoires prédominantes associées avec des réponses d'hypersensibilité et l'élimination des infections parasitaires. Elles sont recrutées sur le site de l'inflammation par un certain nombre de facteurs dont l'interleukine (IL-2, IL-5, IL-16), l'histamine et quelques protéines du complément (**Germolec et al., 2018**).

c) Les basophiles et les mastocytes :

Les basophiles et les mastocytes contiennent des granules cytoplasmiques qui servent de réservoirs pour les médiateurs solubles qui fonctionnent dans de nombreux aspects de la réponse inflammatoire.

d) Les plaquettes :

Les plaquettes sont des fragments cellulaires circulants anucléés composés de cytoplasme lié à la membrane dérivé de mégacaryocytes. Ils sont rapidement recrutés sur les sites de blessure et infection et sont activés localement (**Germolec et al., 2018**).

e) Les lymphocytes :

Les lymphocytes T et B peuvent agir comme des effecteurs spécifiques de cytotoxicité ou sécrètent des anticorps ou des cytokines qui participent à des lésions tissulaires ou recrutement des cellules inflammatoires (**Germolec et al., 2018**).

IV.3. Médiateurs de la réponse inflammatoire:

- **Les cytokines :**

Les cytokines sont principalement libérées par les cellules immunitaires, y compris les monocytes, les macrophages et les lymphocytes. Les cytokines pro et anti-inflammatoire facilitent et inhibent l'inflammation, les cytokines inflammatoires sont classés comme des interleukines, colony stimulating factors (CSF), IFN, TNF, TGF et chimiokines, les cytokines modulent la réponse immunitaire à l'infection ou à l'inflammation et régulent l'inflammation elle-même via un réseau complexe d'interactions (**Chen et al., 2017**).

- **Les chimiokines :**

Les chimiokines sont définies en fonction de leur composition en acides aminés, spécifiquement la présence d'un motif de tétra-cystéine conservé. Les chimiokines inflammatoires contrôlent le recrutement d'effecteur leucocytaire dans l'infection, l'inflammation, les lésions tissulaires et les tumeurs. Comme partie intégrante du processus inflammatoire, les chimiokines dirigent la migration cellulaire, activent les macrophages et modulent la cicatrisation des plaies (**Germolec et al., 2018**).

- **Les Protéines de la phase aiguë :**

L'inflammation déclenche généralement une réponse en phase aiguë, qui entraîne des changements dans les protéines du sang appelée protéines de phase aiguë (PPA), ces protéines modifient l'homéostasie afin d'initier des processus défensifs et/ou adaptatifs qui contribuent à guérison à court terme (**Germolec et al., 2018**).

- **Le système du complément :**

Le système du complément est un réseau complexe de protéines qui participent à la réponse inflammatoire aiguë par leur activité enzymatique. Leurs effets sur la libération du médiateur, la perméabilité vasculaire et la capacité d'améliorer la phagocytose (**Germolec et al, 2018**).

IV.3.Types d'inflammation :

Les inflammations sont principalement divisées en inflammation aiguë et chronique en fonction de divers processus inflammatoires et mécanismes cellulaires.

IV.3.1.L'inflammation aiguë :

L'inflammation aiguë est une procédure courte, qui dure de quelques minutes à quelques jours, et ses principales caractéristiques sont la fuite de protéines plasmatiques et le mouvement des leucocytes dans une zone extravasculaire. Ces réactions cellulaires et vasculaires sont intermédiées par des facteurs chimiques produits à partir des cellules ou du plasma et sont responsables des symptômes cliniques classiques de l'inflammation tels que gonflement, rougeur, douleur, chaleur et perte de fonction, il y a trois étapes principales dans la réponse inflammatoire aiguë, qui incluent la circulation sanguine vers la zone enflammée, suivie d'une vasodilatation et perméabilité vasculaire avec migration des leucocytes phagocytaires vers le tissu environnant (**Arulselvan, 2016**).

IV.3.2.L'inflammation chronique :

L'inflammation chronique dans les tissus se produit généralement lorsque les réponses inflammatoires sont en absence d'un stimulus réel, ils peuvent également provenir d'agents physiques ou chimiques qui ne peuvent pas être décomposés, ainsi que d'une sorte de susceptibilité génétique, la persistance de corps étranger, des expositions chimiques continues, une inflammation aiguë récurrente ou des agents pathogènes spécifiques sont toutes des raisons cruciales de l'inflammation chronique (**Arulselvan, 2016**).

IV.4. Anti-inflammatoires:

IV.4.1. Généralité et mode d'action :

Les anti-inflammatoires appartiennent à des classes chimiques très variées et agissent de façon purement symptomatique sur la réaction aspécifique des tissus à un agent agresseur.

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) ces stéroïdes analogues ou précurseurs de la cortisone, ils sont sécrétés par les glandes surrénales. Ils ont tous une activité hormonale sur les régulations métaboliques (glucidique, protéidique et lipidique) et ils entraînent la mise au repos des surrénales par un mécanisme de freinage hypothalamohypophysaire, les glucocorticoïdes ont la capacité d'inhiber tous les phases de la réaction inflammatoire. Par leurs actions directes sur les vaisseaux, ils diminuent les phénomènes vasculaires de l'inflammation. Par leur effet antiprolifératif sur les histiocytes, monocytes, macrophages, les lymphocytes les plasmocytes, les fibroblastes et les polynucléaires neutrophiles et ils inhibent les phénomènes cellulaires précoces et tardifs de l'inflammation (**Muster, 2005**). Les glucocorticoïdes pénètrent dans toutes les cellules et se lient aux récepteurs des stéroïdes cytoplasmiques, puis ce complexe se déplace vers le noyau où il est reconnu par des séquences d'ADN spécifiques (**Dinarello, 2010**).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) demeurent une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde, en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques ou antalgiques et même pour 3 d'entre eux « aspirine, flubiprofène et ibuprofène » inhibitrices de l'agrégation plaquettaire (**Jouzeau et al., 2004**). Le mécanisme d'action des AINS repose essentiellement sur l'inhibition des enzymes COX-1 et COX-2 de la cyclooxygénase (COX), qui synthétisent des médiateurs inflammatoires appelés prostaglandines et thromboxanes (**Dinarello, 2010**).

Les effets indésirables des anti-inflammatoires synthétiques ont fait qu'un retour à la pharmacothérapie traditionnelle est très souhaitable. En effet, de nombreuses plantes ont une activité anti-inflammatoire très intense via leurs composés phénoliques (**Crosier et al., 2006**). Le tableau ci-dessous représente quelques plantes douées d'une activité anti inflammatoire.

Tableau n°7 : plantes douées d'une activité anti-inflammatoire

Plantes	Parties utilisés	Activité	Utilisation	Références
Curcuma Zedoarea (zédouaire)	Rhizome	Anti nociceptive, anti inflammatoire	La douleur, les plaies et les affections cutanées	Ullah <i>et al.</i>, 2014
Phrygilantus ocutifolius	Fleurs	Anti-nociceptive, anti-inflammatoire, anti-pyrétique	Affections respiratoire et antibactérien	Daud <i>et al.</i>, 2009
Saba Senegalensis La liane goyine	Tiges feuilles	Anti-inflammatoire, analgésique, antioxydant	Maladies infectieux, inflammation et maux de tête	Yougbaré <i>et al.</i>, 2015
Withania sommifera (Ginseng indien)	Racines	Anti-inflammatoire	L'asthme, les ulcères, l'insomnie et vieillissement cérébral	Chandra <i>et al.</i>, 2012

V. Stress oxydatif :**V.1. Définition :**

L'oxygène, molécule indispensable à la vie est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA) (**Haleng et al., 2007**). Les radicaux libre se sont des espèces chimiques (atome ou molécule) qui ont pour caractéristique de présenter au moins un électron célibataire sur leur orbital externe et de réagir avec les molécules environnantes pour appairer cet électron célibataire (**Afonso et al., 2007 ; Sergent et al., 2000**), entraînant le stress oxydant définie comme un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et la capacité antioxydants de l'organisme en faveur des oxydants (**Sergent et al., 2000**). Il peut donc se développer suite à une superproduction des antioxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (**pincmail et al., 1999**).

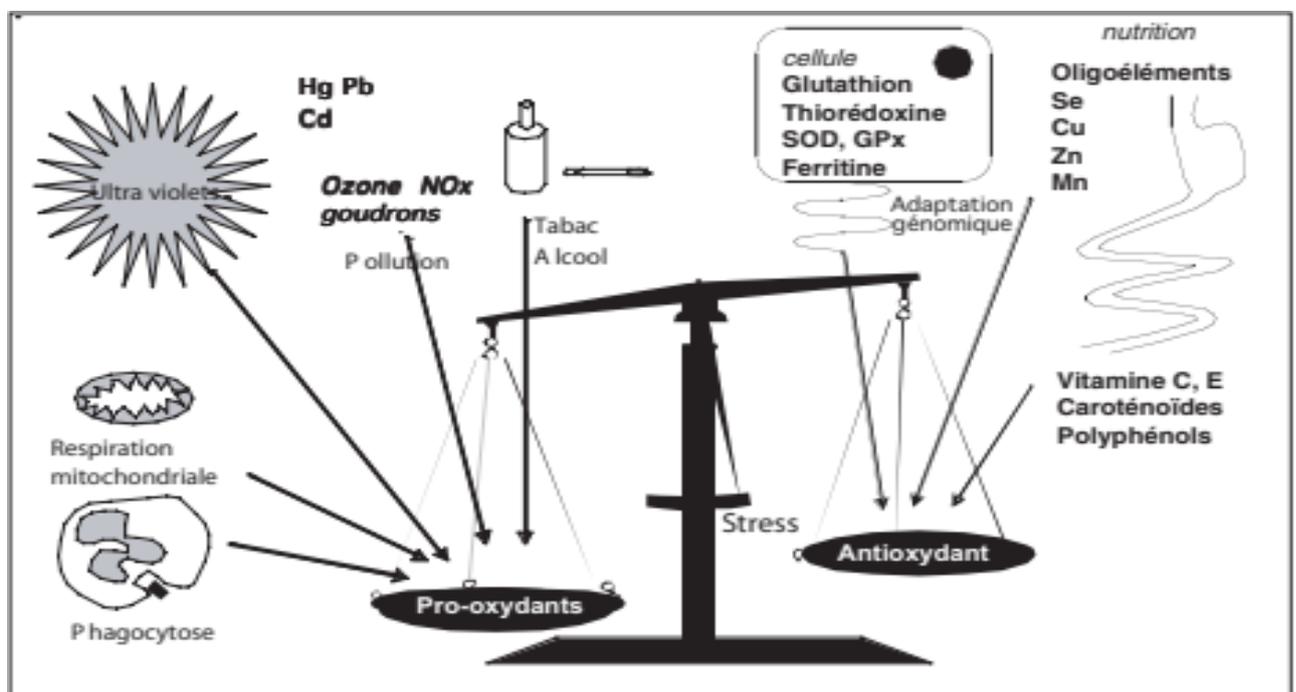


Figure n° 05 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants

(Favier, 2006).

V.2. Les types des radicaux libres : on distingue deux types des radicaux libres :**V.2.1. L'espèce réactive oxygène (ERO) :**

Le terme ERO réfère aux espèces oxygénées qui sont soit des radicaux libres comme l'anion super oxyde ($O_2^{\bullet-}$), Ou le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), soit des molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet (O_2^1), dans cette chimie particulière, les métaux de transition, comme le Fe^{2+} et le Cu^{2+} , agissent comme catalyseurs dans la formation du radical hydroxyle (**Haleng et al., 2007**).

a. L'anion super oxyde ($O_2^{\bullet-}$) :

L'anion super oxyde ($O_2^{\bullet-}$) provient formellement de l'addition d'un seul électron sur le dioxygène



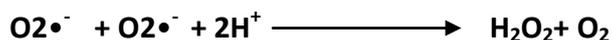
Une telle réaction est catalysée par des enzymes tels que le NADPH oxydase. L'anion super oxyde constitue un des protagonistes majeur du stress oxydant et c'est l'espèce la plus réductrice (-0.33V).

Celui-ci est donc susceptible d'être oxydé en dioxygène par tout oxydant appartenant à un couple dont le potentiel standard est supérieur à (-0.33v) (**Gardès-Albert, 2006**).

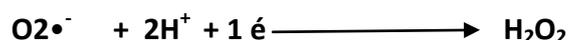
b. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :

Le peroxyde d'hydrogène résulte de la réaction de :

- dismutation de l'anion super oxyde :



- de la réduction univalente de l'anion super oxyde :



- Réduction bi électronique de l'oxygène :



Cette réaction est catalysée par des enzymes telles que l'oxydase d'urate, le glucose oxydase et le D-amino acide oxydase. Le peroxyde d'hydrogène est un faible oxydant et aussi un agent de réduction faible qui est relativement stable en absence d'ions de transition (**Guetttridge, 1995**).

c. **Le radical hydroxyle (OH•) :**

Le radical hydroxyle peut être produit à partir de l'eau par les radiations ionisantes dans tous les organismes vivants mais il est surtout formé par la réaction de fenton à partir d'H₂O₂. L'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante (**Goudable, 1997**) :



Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir avec le radical super oxyde aboutissant à la production du radical hydroxyle. Ce mécanisme réactionnel se nomme la réaction d'Haber-Weiss :



Cette réaction très lente ne se produit qu'en présence de métaux (**Marfak, 2003**). Le radical hydroxyle est un oxydant extrêmement agressif qui peut attaquer la plupart des molécules biologiques à un taux de diffusion presque contrôlé (**Guetttridge, 1995**).

d. **L'oxygène singulet (O₂¹) :**

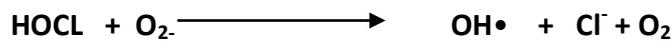
L'oxygène singulet n'est pas un radical et ne réagit pas par des mécanismes radicalaires mais il réagit souvent par fixation à la double liaison pour former un endoperoxyde qui peut être réduit pour former un radical alcoyle qui déclenchent des réactions en chaîne radicalaires (**Prior et al., 2005**).

e. **L'acide hypochloreux (HOCl) :**

L'acide hypochloreux est un oxydant puissant formé dans l'organisme par les neutrophiles activés. Une enzyme myeloperoxydase qui se trouve au niveau du cytoplasme des phagocytes catalyse la formation de HOCl à partir de H₂O₂ et l'anion chlorique (**Guetttridge, 1995**) :



L'acide hypochloreux peut donner naissance au radical OH par une réaction indépendante ou non du fer :



V.2.2. Les espèces réactives d'azotés (RNS) :

a. L'oxyde nitrique (NO) :

L'oxyde nitrique est un radical réactif abondant, contient un électron non apparié, synthétisé par des oxydes nitriques synthétases, il a une demi-vie de quelques secondes seulement en milieu aqueux, NO a une plus grande stabilité dans un environnement avec une concentration en oxygène plus faible (demi-vie > 15s) (Valko *et al.*, 2006).

b. L'anion peroxynitrite (ONOO-) :

La génération simultanée de l'oxyde nitrique et de superoxyde favorise la production de l'anion peroxynitrite (Szabo, 2002), ce dernier est un puissant oxydant qui peut provoquer la fragmentation de l'ADN et l'oxydation des lipides (Valko *et al.*, 2006).

V.3. Conséquences du stress oxydant :

Une génération excessive des radicaux libres peut en principe entraîner l'attaque et les dommages de toutes les cellules et les composants extracellulaires (Kruidenier *et al.*, 2000), ces dommages oxydatifs ont été impliqués dans la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques évolutives, comme le cancer, inflammation et troubles neurodégénératifs (Keaney *et al.*, 2003).

Le stress oxydants a comme conséquences :

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

tels que les hydrolyses et les carbonyles, qui contribuent à altérer la fonction, le renouvellement et la dégradation. Les effets secondaires comprennent la fragmentation des protéines, la réticulation et le déploiement (**Kruidenier et al., 2000**).

- ❖ L'oxydation des acides nucléiques entraîne des modifications des bases azotées, des fragmentations de l'ADN, des ruptures des brins ou à des pontages entre des bases altérant ainsi l'expression génétique (**Cooke et al., 2003**).
- ❖ La peroxydation lipidique s'accélère uniquement lorsque le système cellulaire de désintoxication n'ont pas réussi à éliminer les précurseurs de l'HO•, en particulier H₂O₂. La peroxydation lipidique est plus efficacement combattue par les antioxydants liposolubles tels que la vitamine E (**Kruidenier et al., 2000**).

V.4. Les antioxydants :

Face à la production d'espèces activées de l'oxygène, l'organisme dispose de système de défense antioxydants (**Sergent et al., 2000**). Un antioxydant est définie comme tout substance lorsqu'elle est présente à des concentrations faible par rapport à celles d'un substrat susceptible d'être oxydé préviennent ou inhibe considérablement l'oxydation de ce substrat (**Halliwel, 1990**).

On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamine C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque. L'autre est endogène et se compose d'enzymes (super oxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase); de protéine (ferritine, transferrine, céruloplasmine, albumine) et des oligoéléments comme le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes anti oxydantes (**Haleng, 2007**).

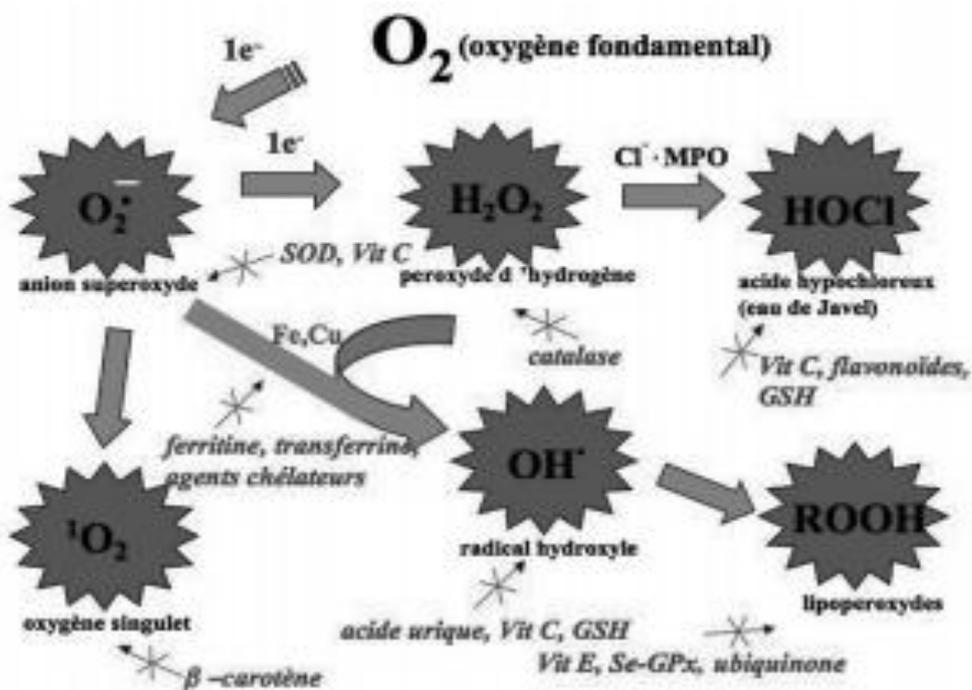


Figure n° 06 : Aperçu des différentes espèces réactives oxygénées (ERO) et des antioxydants régulateurs de leurs productions (Haleng, 2007).

V.4.1. Les antioxydants endogènes :

- **Les superoxydes dismutases (SOD) :**

Les SOD éliminent les radicaux superoxydes par dismutation du radical en H_2O_2 et en OH^+ et OH^- il existe plusieurs superoxydes dismutases (Mn SOD dans la mitochondrie, Cu Zn SOD dans le cytosol et les érythrocytes). La synthèse des SOD subit un rétrocontrôle négatif par les fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène.

- **Les catalases (CAT) :**

Les catalases réduisent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elles sont localisées dans les peroxysomes, leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène.

- **Les glutathion peroxydases (GPx) :**

La glutathion peroxydase est une sélénoprotéine qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal consiste en

l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action de stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (**Haleng et al., 2007**).

V.4.2. Les antioxydants exogènes :

V.4.2.1. Les vitamines :

➤ La vitamine C :

La vitamine C (l'acide ascorbique) est un excellent piègeur des EOA ($\text{HO}\bullet$ ou $\text{O}_2\bullet^-$). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidique. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation de fer (**Haleng et al., 2007**).

➤ La vitamine E:

La vitamine E est une vitamine liposoluble qui existe dans huit différentes formes. Le tocophérol est la forme la plus active de vitamine E chez l'homme et un puissant antioxydant (**Valko et al., 2006**).

➤ le β -carotène:

Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β -carotène, également appelé provitamine A (**Haleng et al., 2007**). Le β -carotène est apporté par l'alimentation, il est doué de plusieurs capacités : il est précurseur de la vitamine A, il capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène (**Goudable, 1997**).

V.4.2.2. Les oligoéléments :

➤ Le zinc :

Le zinc est un antioxydant qui a un rôle de protection des groupements thiols de certaines protéines contre l'oxydation due au fer, une carence en zinc peut induire un stress oxydant (**Prasad, 2009**).

➤ **Le sélénium :**

Le sélénium joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx (**Haleng et al., 2007**).

➤ **Le cuivre :**

Le cuivre est le cofacteur d'enzyme comme la SOD, le cytochrome C oxydase, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'EOA (réactions de Fenton) (**Haleng et al., 2007**).

V.4.2.3. Les composés phénoliques :

V.4.2.3.1. Définition :

C'est un très vaste groupe de substances naturels synthétisés exclusivement par des plantes dont l'élément structural commun c'est la présence d'au moins : un noyau aromatique à 6 carbone lié à un groupement Hydroxyle (libre ou engagé) (**Singla et al., 2019**).

a. la structure des composés phénoliques :

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faibles poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire, et ils peuvent être classés par le nombre de l'arrangement des atomes de carbone des composants, en fonction de la nature et de leur squelette carbone et en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique.

Les composés phénoliques sont capables de se conjuguer à des oses ou à des acides organiques (**Chira et al., 2008**) (**Figure n° 06**).

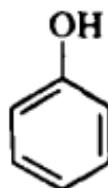


Figure n° 07 : Structure du noyau phénol (**Cypres et al., 1975**).

V.4.2.3.2. Classifications des polyphénols :

Les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes :

A. Les composés phénoliques simples :

- Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques se composent de deux sous-groupes : d'acide hydroxybenzoïques et d'acide hydroxycinnamiques (**Balasundram *et al.*, 2006**).

➤ Les acides hydroxybenzoïques :

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C6-C1, composé d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone (**Figure n° 07**) (**Chira *et al.*, 2008**).

➤ Les acides hydroxycinnamiques :

L'acide cinnamique est un composé C6-C3 produit par une désamination de la phénylalanine catalysée par la phénylalanine ammonia-lyase, l'acide paracoumarique (p-coumarique) est alors produit par l'hydroxylation de l'acide cinnamique (**Figure n° 07**) (**Chira *et al.*, 2008**).

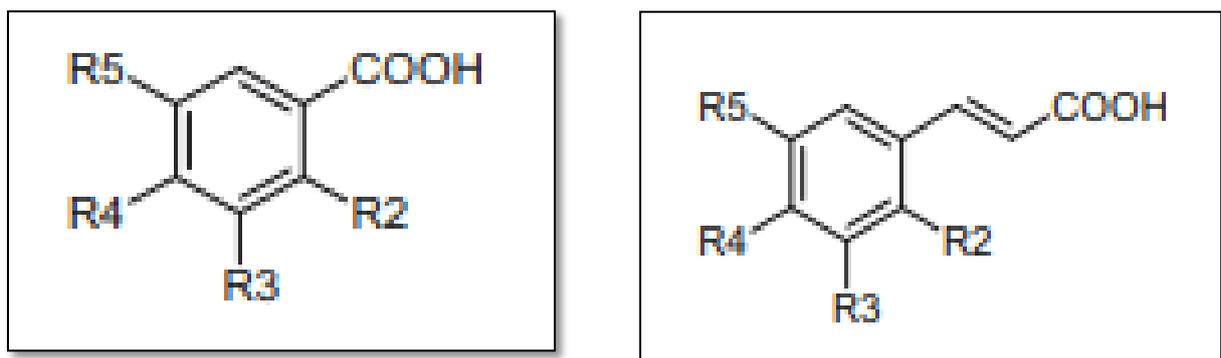


Figure n° 08: Structure chimique des acides hydroxybenzoïques (a) et Structure chimique des acides hydroxycinnamiques (b) (**Chira *et al.*, 2008**).

- Les flavonoïdes :

Flavonoïde provient du terme latin « Flavus » ce qui signifie « jaune », Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires polyphénoliques présents dans diverses plantes avec des

pigments rouges, bleu ou violet , et régimes alimentaires humains, les flavonoïdes ont une structure générale d'un squelette à 15 atomes de carbone composé de deux cycles phényle (cycle A et B) et un cycle hétérocyclique contenant un oxygène (cycle C) ; leur structure est décrite comme « C6-C3-C6 » (**Balasundram et al., 2006**). Les principales sous-classes des flavonoïdes alimentaires sont (les flavonols, flavones, flavan-3-ols, anthocyanidines, flavonones et isoflavones, ainsi que des composés plus minoritaires tels que les dihydroflavonols, les flavan-3,4-diols, coumarines, chlacones, dihydrochalcones et aurones.

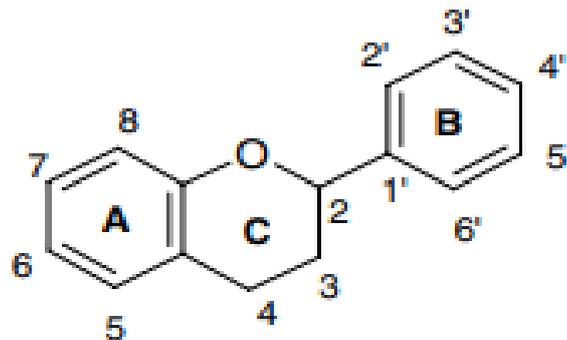


Figure n°09: Structure générale d'un flavonoïde (**Balasundram et al., 2006**).

B. Les composés phénoliques complexes (tanins) :

Le terme « tanins » est un nom descriptif général pour un groupe de substances phénoliques polymériques capable de tanner le cuir ou précipiter la gélatine de la solution, une propriété connue sous le nom d'astringence. Leurs poids moléculaires varient de 500 et 3 000 daltons, et on les trouve dans presque toutes les parties de la plante : écorces, bois, feuilles, fruits et racines (**Cowan, 1999**) Ils sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés :

- **Tanins hydrolysables :**

Les tanins hydrolysables contiennent un noyau central d'alcool poly hydrique tel que le glucose et les groupes hydroxyle, qui sont estérifiés partiellement par l'acide gallique (gallo tanins) ou l'acide hexahydroxydiphénique (elligitanins) (**Chung et al., 1998**).

- **Tanins condensés :**

Les tanins condensés (également appelés pro-anthocyanidines polymériques) sont des substances polyphénoliques naturelles présentes dans de nombreuses plantes ligneuses (**Li et al., 2004**), Les tanins condensés résultent de la polymérisation de molécules élémentaires de flavanes (flavanes ol-3, flavane ol-4, flavane diol -3,4). Ils sont désignés aussi sous le nom de tanins «catéchiques» (**Sereme et al., 2008**), ils ont une structure plus complexe que les tanins hydrolysables. (**Chung et al., 1998**).

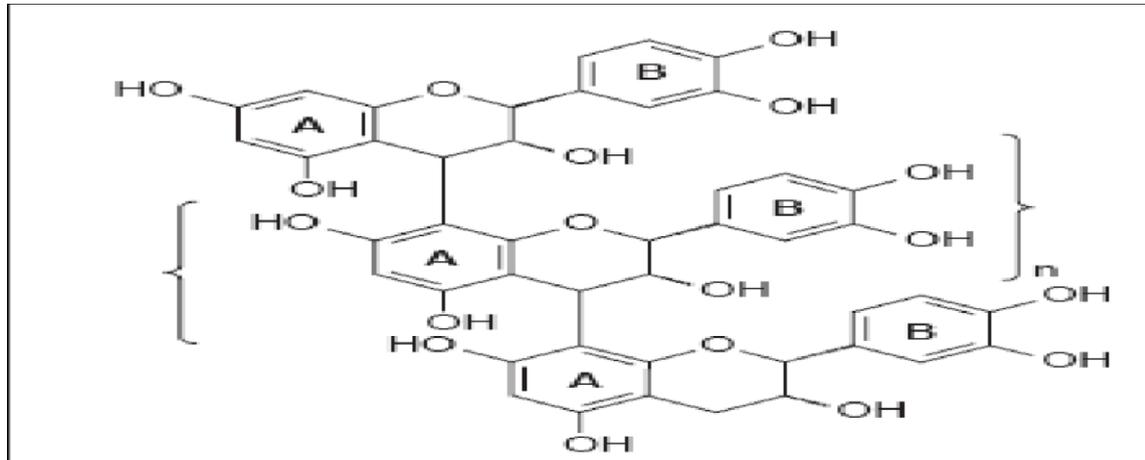


Figure n° 10: structure de base tanins condensés (**li et al., 2004**)

Matériels et méthodes

Nos travaux ont été réalisés au sein du laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition (PPABIONUT), faculté des sciences de la nature et de la vie ; sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen.

I .Matériel végétal :

Nos travaux ont porté sur l'étude des propriétés anti hémolytiques ; anti inflammatoire et anti oxydantes des extraits de l'écorce de la clémentine (*citrus clémentina*).

II .Préparation des extraits des peaux sèches de la clémentine :

II.1.Le séchage : Les oranges sont lavées à l'eau puis essuyées l'écorce est récupérée à l'aide d'un économe. L'écorce est ensuite mise pour le séchage dans un endroit sec à une température ambiante (**Figure n° 11**).

II.2.Le broyage et le tamisage : A l'aide d'un mixeur électrique les écorces séchées sont broyées puis tamisées afin d'obtenir une poudre fine (**Figure n° 12**).



Figure n° 11 : L'écorce séchée.



Figure n° 12: L'écorce broyée et tamisée.

III. Extraction des polyphénols totaux :

III.1.Principe de dégraissage d'échantillon :

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

III.2. Mode opératoire :

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 (**figure n° 13**). Le tourteau sera par la suite séché dans une étuve.



Figure n°13: Délipidation, séchage et filtration de la poudre dégraissée.

III.3. Macération :

Afin d'extraire les polyphénols il faut macérer à froid 5g du tourteau (la poudre dégraissée) de l'échantillon à analyser dans une solution de 80 ml de méthanol et 20 ml d'eau distillée [méthanol/eau (v/v)] pendant 24H. Après macération la solution est filtrée afin d'éliminer tout résidu (**Figure n° 13**).

III.4. L'évaporation :

Après la filtration, le mélange méthanol/eau est soumis à une évaporation dans un rota-vapeur à 40°C (**Figure n° 14**).



Figure n°14: Evaporation des solvants dans le rota-vapeur.

IV. Détermination de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire et antioxydante de l'extrait de l'écorce de clémentine :

IV. 1. Préparation de la suspension de globules rouges :

Des échantillons de sang frais (environ 8 ml) ont été récupérés dans des tubes héparinisés, la prise de sang a été effectuée sur des volontaires (20-45 ans).

Les différents échantillons de sang humains récupérés sont centrifugés à 3000 tour/min, pendant 10 min afin d'éliminer le plasma et les cellules polynucléaires. Ensuite, le culot de globules rouges est lavé trois fois, avec un volume équitable de solution iso-saline. Après

cette étape, le volume a été mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10 %(v/v) de globules rouges (GR), avec une solution physiologique.

IV .2. Test de cytotoxicité :

Un test de toxicité est nécessaire avant d'entreprendre le test de l'activité anti-hémolytique des extraits de l'écorce afin de cibler les concentrations à utiliser.

IV.1.1 .Principe :

Ce test consiste à mettre en contact des hématies avec les extraits méthanoliques de l'écorce à différents concentrations (50-2000 µg/ml), dans une solution isotonique et de suivre le taux hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de ces extraits, vis-à-vis, des GR.

IV .1.2 . Mode opératoire :

Le protocole suivi est celui de **Bulmus et ses collaborateurs (2003)**, où un volume de 1,6 ml de l'extrait méthanolique et de l'acide gallique (molécule de référence de composé phénolique) a été mélangé avec un volume de 0,4ml de la suspension de GR.

Le mélange réactionnel est incubé à 37°C, pendant 30min, puis centrifugé à 3000 tour/min pendant 10 min. L'absorbance de l'hémoglobine libérée a été mesurée à 560 nm. Deux contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait avec de l'eau physiologique (contrôle négatif) ou avec l'eau distillée (contrôle positif correspondant à 100 % d'hémolyses).

IV.2 .Test de l'activité anti-hémolytique *in-vitro* de l'extrait :

IV 2.1. Principe :

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité de l'extrait à empêcher l'hémolyse des GR, induite par l'hypotonie et la chaleur et donc prévenir la libération de l'hémoglobine.

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **(Sadique *et al.*, 1989 & Oyedapo *et al.*, 2010)**.

IV.2.2.Mode opératoire :

Le milieu réactionnel contenant 0,5ml de l'extrait, du diclofenac sodique ou de l'acide gallique à différents concentrations (10-300 µg/ml) est mélangé avec 1,5 ml du tampon phosphate (0,9 % NaCl, pH=7,4) et 2 ml d'une solution hypo-saline (0,36 % NaCl).Le mélange

réactionnelle sera incubé à 37°C pendant 20 min. Un volume de 0,5 ml de la suspension de GR (10 %) a été ajouté à chaque concentration et une deuxième incubation a été réalisée à 56°C pendant 1h. Au final, les tubes ont été refroidit sous l'eau courante et suivie par une centrifugation à 2500 tour/min pendant 5 min. L'absorbance du surnageant ont été mesurées à 560 nm. En parallèle un contrôle a été réalisé en remplaçant l'extrait avec 0,5 ml du tampon phosphate.

IV.3. Test de l'activité anti-inflammatoire :

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (**Williams et al., 2008**). De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plants sur l'activité anti- inflammatoire *in- vitro* par la méthode de dénaturation des protéines (**Bouhlali et al., 2016**).

L'activité anti-inflammatoire *in-vitro* des extraits de l'écorce a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (**Chandra et al., 2012**).

IV.3.1. 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 : produit (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 5% et 0,05 ml de la solution standard Diclofenac sodium avec une concentration de 250pg/ml.

Toutes les solutions au-dessous ont été ajustées à PH=6,3 par une solution HCL (1N). Les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 20 min, ensuite la température a été augmentée pour garder les échantillons à 57°C pendant 3 min.

Après refroidissement des tubes, 2,5 ml de la solution phosphate saline à PH=6,3 a été ajoutée aux solutions ci-dessous.

L'absorbance a été lue par un spectrophotomètre UV-visible à 416 nm.

IV .4 .Test de l'activité anti radicalaire :**IV .4 .1. Principe :**

Le radical DPPH présente une bande d'absorption maximale à 515 nm dans le méthanol. Cette bande disparaît lors de la réduction du DPPH (en hydrazine correspondant) par composé donneur d'atomes d'hydrogènes (**Figure n°15**). Ce traduit par une décoloration. Cette décoloration met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance. Plus les valeurs de CI50 sont faibles, plus que les capacités anti-oxydantes du composé considéré sont élevées (**Sanchez-Moreno et al., 1998**).

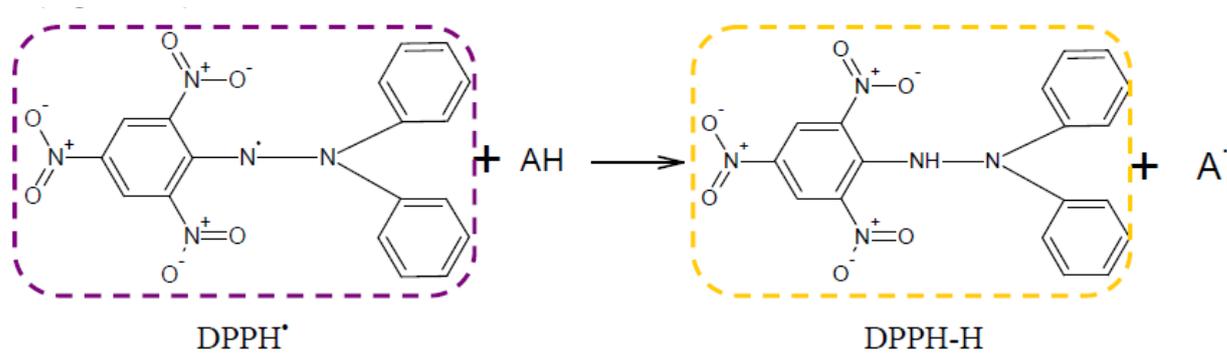


Figure n°15 : Réduction du radical DPPH.

IV .4 .2.Mode opératoire :

Le milieu réactionnel contenant 50 μ l de l'échantillon à différentes concentrations (0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml) introduits dans des cuves (dilué dans le méthanol), mélangé avec 1.95 ml de DPPH (0.025g/l de méthanol).

L'absorbance est mesurée à 515 nm par un spectrophotomètre pendant 30 min.

Résultats et interprétations

I. Test de cytotoxicité :

Différentes concentrations des extraits de l'écorce de clémentine, ainsi qu'une molécule de référence l'acide gallique, ont été testés sur les globules rouges.

Le pourcentage de l'hémolyse a été évalué pour chaque extrait, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine échappé des (GR), en comparaison à des contrôles à savoir le contrôle négatif (solution des GR dans l'eau physiologique) et le contrôle positif (eau physiologique remplacé avec de l'eau distillée afin de provoquer une hémolyse totale).

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 16 et 17.

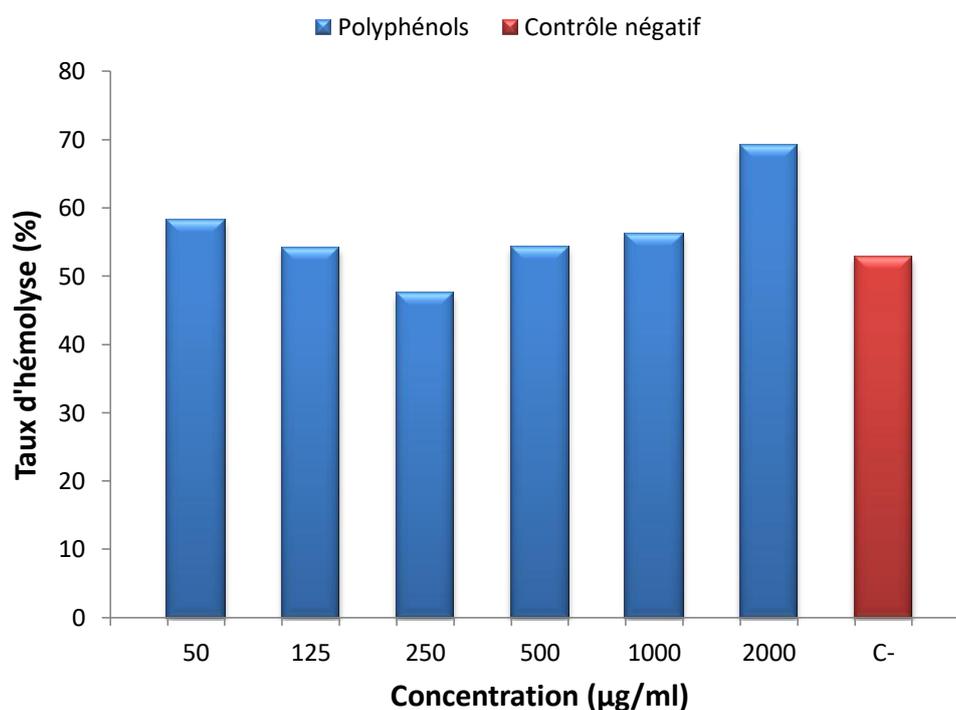


Figure n°16 : Effets des différentes concentrations des polyphénols sur la toxicité des globules rouges.

Les résultats (Figure n°16), montrent que l'extrait présente un effet hémolytique le plus bas (47.5%) à la concentration (250µg/ml) en comparaison avec le contrôle négatif (C). Cet effet évolue avec l'augmentation des concentrations pour atteindre son maximum (69.05%) à la concentration la plus élevée (2000µg/ml).

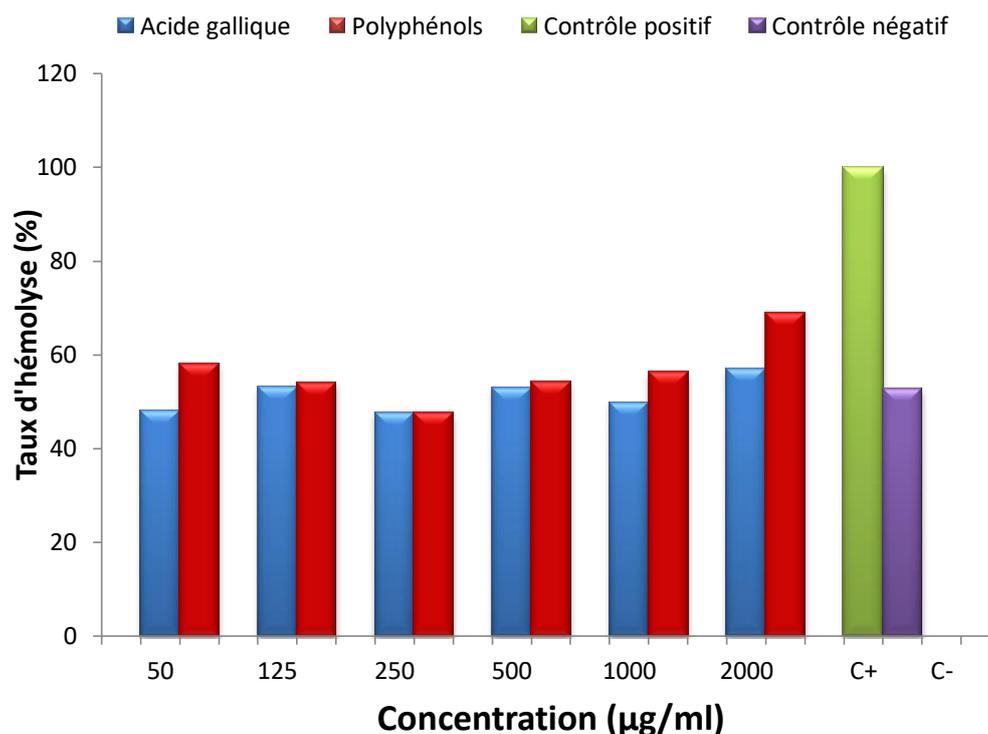


Figure n°17 : Comparaison des différentes concentrations en acide gallique et polyphénols sur la cytotoxicité des globules rouges.

Comparé à l'acide gallique, l'extrait présente une cytotoxicité plus élevée pour les différentes concentrations à l'exception de la concentration (**250 µg/ml**) où le taux d'hémolyse (**47.5 %**) est plus bas que celui de l'acide gallique (**47.78 %**) (Figure n°17).

II. Evaluation de l'activité anti-hémolytique, *in vitro*, des extraits par la méthode de stabilisation membranaire des globules rouges:

L'étude de l'activité anti-hémolytique, *in vitro*, a été réalisée, en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains (GR). L'évaluation de la stabilité membranaire a été déterminé par la mesure de la libération de l'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration des différents extraits et en les comparant à des molécules de référence ; le diclofenac sodique comme étant un médicament anti-inflammatoire et l'acide gallique, composé phénolique contenant dans les plantes médicinales.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures (**n°18, 19, 20,21**).

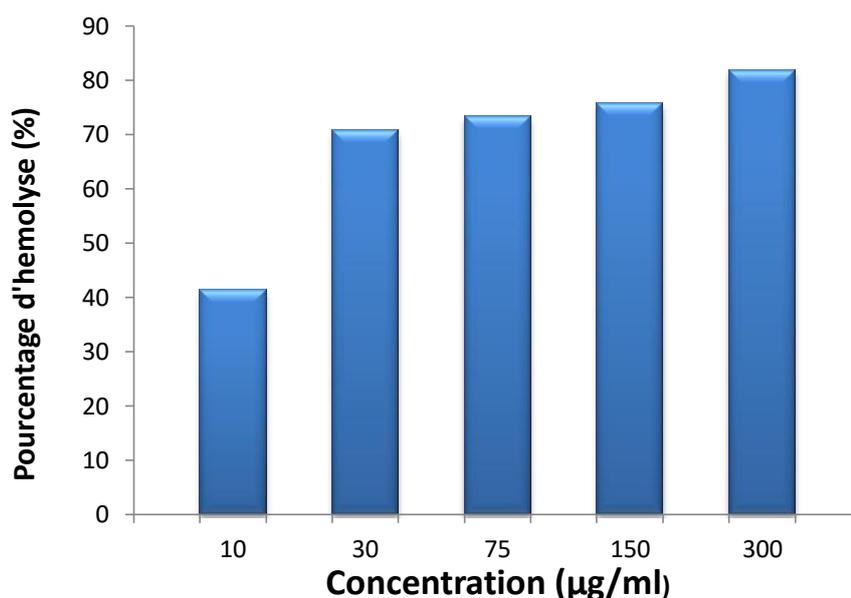


Figure n°18 : Effet des différentes concentrations des polyphénols sur le taux d'hémolyse.

D'après les résultats de la **Figure n°18**, on remarque que l'extrait à faible concentration (**10µg/ml**) a un effet stabilisateur de la membrane érythrocytaire important avec un pourcentage **41.3%**. Cette activité hémolytique continue à évoluer de manière croissante dose-dépendante pour atteindre un taux d'hémolyse très important (**81.9%**) à la concentration maximale (**300µg/ml**).

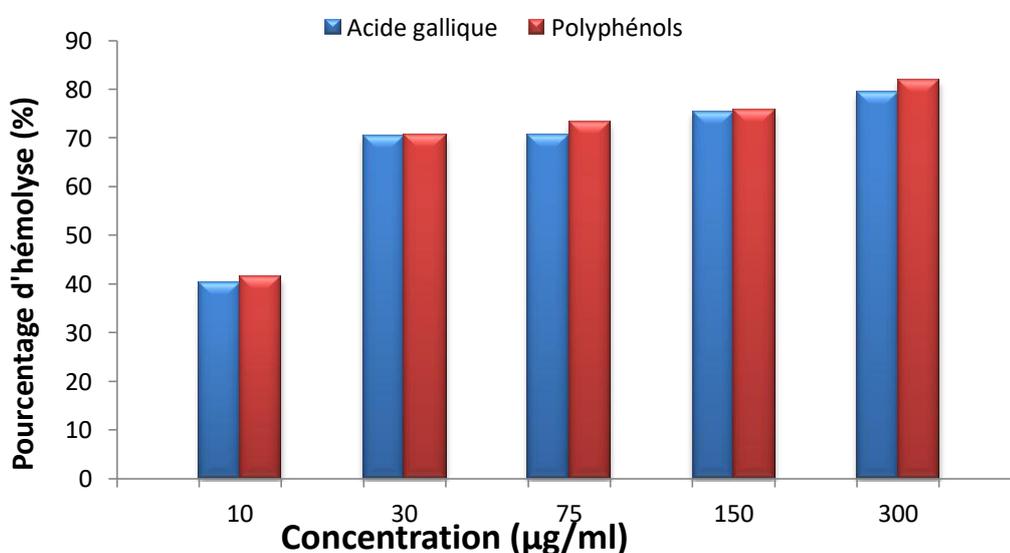


Figure n°19 : Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et polyphénols.

Comparé à l'acide gallique, les résultats de la **Figure n°19** montrent que l'extrait à la concentration maximale de 300 µg/ml exerce une meilleure protection contre la lyse de la membrane érythrocytaire.

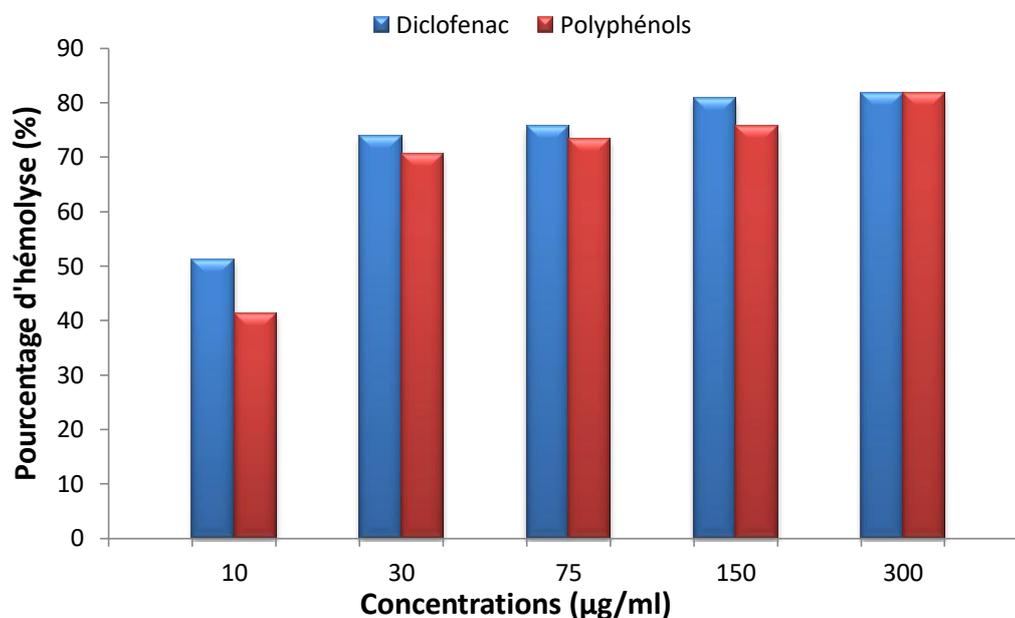


Figure n°20 : Comparaison du taux d'hémolyse entre diclofenac et les polyphénols.

Comparé au diclofenac les résultats de la **Figure n°20** montrent que l'extrait présente une meilleure protection contre la lyse des érythrocytes pour les concentrations (10, 30, 75, 150 µg/ml).

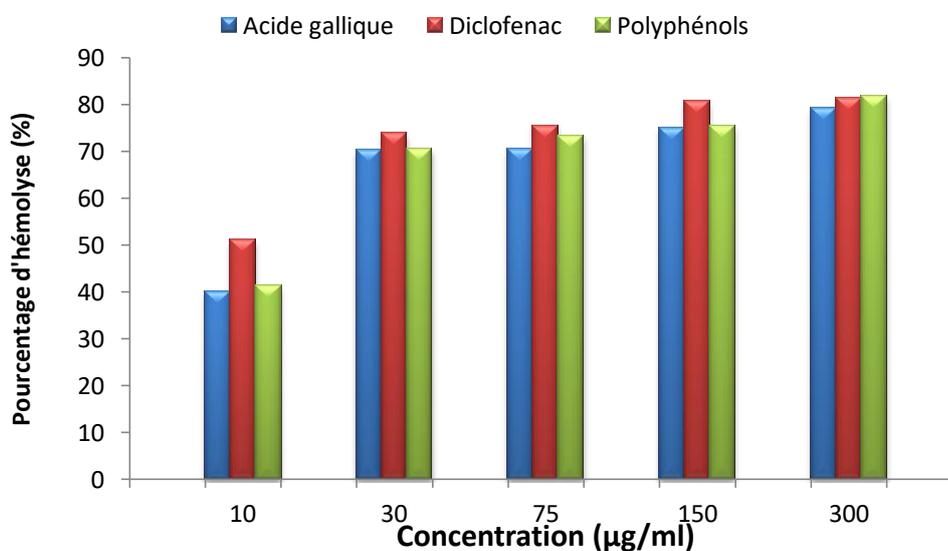


Figure n°21 : Comparaison du taux de stabilité membranaire entre diclofenac,acide gallique et les polyphénols.

Les résultats (**Figure n° 21**) montrent que l'extrait à la concentration minimale (**10 μ g/ml**) exerce une protection contre la lyse de la membrane érythrocytaire (**41.3%**).

III. Activité anti-inflammatoire :

Lors de notre étude, l'action anti-inflammatoire de l'extrait a été évaluée *in vitro* par le test d'inhibition de la dénaturation des protéines (BSA) induite par un traitement thermique, l'étude a été conçue pour évaluer l'effet protecteur de la dénaturation de BSA par l'extrait. Les résultats sont représentés dans les figures suivant :

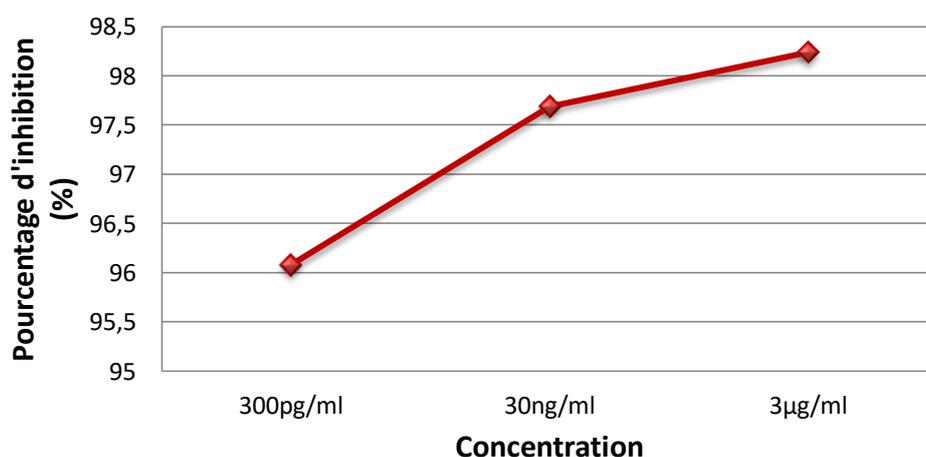


Figure n°22 : Taux d'inhibition de la dénaturation protéique par les polyphénols.

Les résultats représentés dans la **figure n°22** montrent que l'effet anti-dénaturant protéique de l'extrait est important, lorsque le pourcentage d'inhibition est le plus faible (**96%**) obtenue à la concentration minimale (**300pg/ml**). L'effet anti dénaturation protéique augmente jusqu'à **98%** pour la concentration la plus élevée (**3 μ g/ml**).

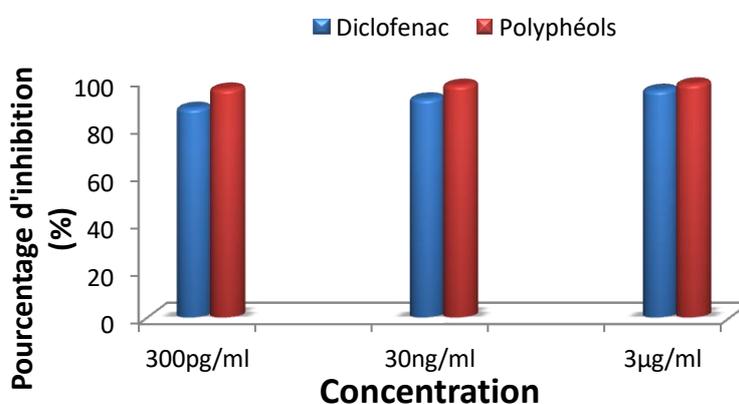


Figure n°23 : Comparaison de taux d'inhibition de la dénaturation protéique entre diclofenac et polyphénols.

Les résultats représentés dans la **Figure n°23** montrent que l'effet anti-dénaturant de diclofenac est moins important par rapport à l'extrait et ce pour les trois concentrations.

IV. Test anti-radicalaire :

IV.1. Piégeage DPPH :

Les profils de l'activité anti radicalaire obtenus ont été testés par la méthode du DPPH, c'est un radical organique stable qui réagit avec le polyphénol par transfert d'électrons et d'atome d'hydrogène. Les antioxydants réagissent avec le DPPH et neutralisent le radical. La couleur du mélange réactionnel change du violet au jaune. L'intensité de la décoloration mesure la potentialité d'activité du piégeage des antioxydants (**Vladimir-Knežević et al., 2011**). La présence des composés antioxydants dans l'extrait diminue l'absorbance en fonction du temps (**Figure n°24**).

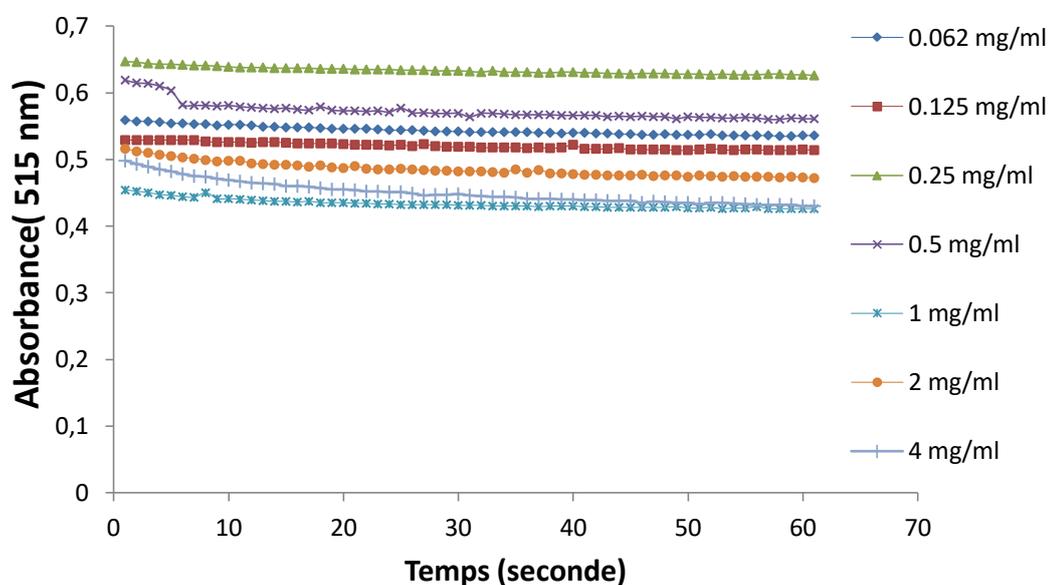


Figure n°24 : Réduction de l'absorbance en fonction du temps.

Les résultats représentés dans la **Figure n°24** montrent que l'effet anti-radicalaire de l'extrait est le plus important à la concentration (**0.5mg/ml**) et (**1 mg/ml**) dont laquelle l'absorbance est la plus basse comparé aux autres concentrations. Pour les deux concentrations (**0.5mg/ml**) et (**1mg/ml**) le pouvoir anti-radicalaire est le même à la trentième minutes.

Discussion

Les polyphénols ont des effets bénéfiques sur la santé humaine car ils possèdent de nombreuses activités biologiques comme l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne anticancéreuse ...etc. (**Galati et al., 2002**). Ce sont des antioxydants capables de piéger directement les radicaux libres par le transfert d'électrons et ils peuvent chélater les ions métalliques et inhiber certains enzymes (**Mira et al., 2002**).

L'objectif de notre travail est d'étudier *in vitro* l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire et anti-radicalaire des extraits de l'écorce de clémentine.

Le test de cytotoxicité est un test *in vitro* qui permet d'évaluer le seuil de toxicité des extraits vis-à-vis les globules rouges. Ces dernières sont souvent choisies comme modèle pour l'étude de la cytotoxicité *in vitro*, à cause de leur facilité d'isolement et leurs membranes qui ont des similitudes avec d'autres membranes plasmiques (**Robertis et al., 1995**).

Nos résultats montrent que l'extrait a un pouvoir cytotoxique le plus bas à la concentration de **(250 µg/ml)**. A cette concentration, l'extrait présente une moindre hémolyse comparé à l'acide gallique. L'effet cytotoxique de l'extrait augmente et atteint un taux de **(69.05%)** à la concentration de **2000 µg/ml**. Le pouvoir hémolytique de nos extraits est probablement lié à leurs compositions chimiques. **Selon Costa et ses collaborateurs (2005)**, les polyphénols peuvent conférer des propriétés toxiques à fortes doses.

Galati et al en 2002 ont prouvé que les polyphénols alimentaires lorsqu'ils sont métabolisés par la peroxydase forme des radicaux phénoxyles pro-oxydants qui, dans certains cas, étaient suffisamment réactifs pour co-oxyder le GSH ou le NADH accompagné d'une absorption importante d'oxygène et la formation d'espèces réactives d'oxygène. Ces derniers s'oxyde avec l'hémoglobine ce qui conduit à la perturbation de la structure membranaire et donc l'hémolyse des érythrocytes.

Les flavonoïdes contenu dans les polyphénols peuvent agir comme mutagènes, pro-oxydants, et générateur des radicaux libres. Cette propriété cytotoxique des flavonoïdes, permet leur utilisation comme anti-carcinogènes grâce à leur toxicité vis-à-vis les cellules tumorales (**Ski bola et al., 2000**). D'autres travaux de **Matsuo et al., 2005** confirment que

certaines flavonoïdes sont cytotoxiques à des fortes concentrations envers les cellules normales humaines.

Concernant le test *in vitro* de l'activité anti-hémolytique, est réalisé, en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains (GR). L'évaluation de la stabilité membranaire en présence des polyphénols a été déterminée par la chaleur et l'hypotonie qui provoquent l'hémolyse. L'hypotonie crée un déséquilibre entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, selon le gradient de concentration l'eau pénètre dans les globules rouges. Ces dernières se gonflent et deviennent sphériques. La perméabilité membranaire est accompagnée d'un mouvement des ions: entrée de Na⁺ et H₂O, sortie de K⁺, La membrane devient inélastique et se rompt après une augmentation de volume, la cellule subit ainsi l'hémolyse permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine et d'autres composants intracellulaires (Seeman, 1967 ; Kalavani *et al.*, 2016).

Comme l'hypotonie, les températures élevées, changent la morphologie des érythrocytes les rendant ainsi vulnérables à l'hémolyse en perturbant leurs membranes plasmiques (Shinde *et al.*, 1999).

Concernant l'étude de l'effet protecteur contre la lyse membranaire induite par la chaleur et l'hypotonie, nos résultats montrent que l'extrait possède un meilleur effet anti-hémolytique de **(41.3%)** à une concentration de **10 µg/ml** comparé à celui de l'acide gallique. Cet effet diminue avec l'augmentation de la concentration des extrait pour atteindre son maximum d'hémolyse **(81.9%)** correspondent à la concentration maximale **(300µg/ml)**. Les polyphénols possèdent un effet anti hémolytique, en stabilisant la membrane des globules rouges contre la lyse osmotique (Chaudhuri *et al.*, 2007). Cette activité est effective grâce à l'intégration des polyphénols dans la couche lipidique externe de la membrane érythrocytaire et modifient l'arrangement de la partie hydrophile, sans changer la fluidité de la partie hydrophobe. L'emplacement de ces composés dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier de protection de la cellule contre les substances toxiques en particulier les formes réactives de l'oxygène (Bonarska-Kujawa *et al.*, 2010).

Chopade *et al* en 2012 ont démontré que l'incorporation des composés phénoliques notamment les flavonoïdes dans la membrane des érythrocytes améliore la stabilité de ces

dernières contre la lyse hypotonique. Cette propriété peut s'expliquer par l'augmentation du rapport volume/surface des cellules qui pourrait être obtenu soit par l'expansion de la membrane ou le rétrécissement de la cellule. De plus, la déformabilité et le volume cellulaire des érythrocytes sont étroitement liés au contenu intracellulaire en calcium. Par conséquent, nous pouvons penser que l'effet protecteur de l'extrait serait dû à la capacité de ce dernier à modifier l'afflux de calcium dans les érythrocytes.

D'après **Gershfeld & Murayama en 1988**, les érythrocytes exposés à des températures relativement élevées, se déforment progressivement pour devenir sphériques. Ainsi la perturbation de leurs membranes diminue leur capacité à résister à l'hémolyse. L'effet protecteur contre la lyse érythrocytaire induite par la chaleur peut s'expliquer par l'interaction de l'extrait avec les protéines membranaires inhibant ainsi leur dénaturation (**Lepock et al., 1989**).

Le diclofenac comme l'acide gallique et les polyphénols sont efficace pour inhiber l'hémolyse. Le diclofenac est un anti-inflammatoire non stéroïdiens très efficace et qui a aussi un effet protecteur pour la membrane érythrocytaire (**Chippada, 2011 ; Rani et al., 2014**). Le diclofenac interagit avec les groupes de tête polaire des phospholipides et se situe à proximité de la région phosphate (**Moreno et al., 2009**). Il à la capacité de former une liaison hydrogène avec les molécules d'eau ou le groupe de tête lui-même ce qui modifie l'affinité de la membrane pour l'eau et l'empaquetage des bicouches lipidiques. Il peut aussi modifier les propriétés électrostatiques des bicouches lipidiques (**Moreno et al., 2009**). Comparé au diclofenac l'extrait a faible concentration (**10µg/ml**) présente la meilleure protection contre l'hémolyse des hématies avec un taux de (**41.3%**). Cet effet diminue avec l'augmentation de la concentration des extraits pour atteindre son maximum d'hémolyse (**81.9%**) correspondent à la concentration maximale (**300µg/ml**).

Concernant l'inflammation, il est connu que la dénaturation des protéines en est la cause (**Anitha rani et al., 2014**). Les protéines perdent leurs structures tertiaire et secondaire par l'application d'un stress externe ou d'un composé tel que l'acide fort ou la base, d'une concentration en sel inorganique, un solvant organique ou par la chaleur ceci engendre la perte de la fonction biologique suite à la suite de cette dénaturation (**Marliyah et Ananthi, 2015**).

D'après les résultats obtenus, on peut suggérer que l'extrait a une activité protectrice considérable contre la dénaturation thermique de l'albumine, où le meilleur taux de protection est **(98%)** à la concentration maximale utilisée (**3 µg/ml**). En parallèle le diclofenac a été utilisé comme standard pour comparer son activité anti-inflammatoire à notre extrait. Il a été trouvé un pourcentage de protection de **(96%)** à la concentration maximale (**3µg/ml**) pour le diclofenac. Ces résultats permettent nous de supposer que l'extrait à un pouvoir protecteur supérieur au diclofenac.

D'après **Amezouar et al., 2013** l'activité anti-inflammatoire de l'extrait est due à la richesse de l'extrait en composés bioactifs, principalement les polyphénols et les flavonoïdes.

Le stress oxydatif soit impliqué du fait qu'un excès d'ERO est à l'origine des lésions cellulaires et que ces lésions entraînent une stimulation des phagocytes se trouvant au site inflammatoire. Lorsque le processus inflammatoire a commencé, quel que soit l'initiateur, la présence d'ERO entretient l'état inflammatoire. Le stress oxydatif est donc soit la cause, soit la conséquence de l'inflammation en fonction des différentes situations et des différentes pathologies dont elle dépend (**Pasquer, 1995**).

Les propriétés antioxydantes des polyphénols varient en fonction de leur structure chimique. Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des polyphénols (**Darvesh et al., 2010**). Les polyphénols ayant des stœchiométries élevées ont une capacité importante à piéger les radicaux libres par transferts multiples d'atomes H ou d'électrons du phénol de départ et de certains de ses produits d'oxydation (**Goupy et al., 2009**).

Pour étudier l'activité anti-radicalaire de l'extrait, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable. Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune ; dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Talbi et al., 2015**).

Le pouvoir antioxydant est inversement proportionnel à l'IC50, plus cette dernière est petite plus le pouvoir antioxydant est fort, ceci est en outre associé à une activité de piégeage des radicaux DPPH (**Hebi & Eddouks, 2015**). Nos résultats ont montré que l'effet

anti-radicalaire de l'extrait est le plus important à la concentration **(0.5mg/ml)** et **(1mg/ml)** dont laquelle l'absorbance est la plus basse comparé aux autres concentrations de polyphénols extrait de l'écorce de la clémentine.

D'après **Cherif *et al.*, 2005** les réactions à cinétiques lentes, ce serait les polyphénols qui contribueraient en grande partie à l'activité antioxydante totale. Contrairement à la vitamine C qui possède une action anti-radicalaire très rapide.

Conclusion

L'orange est une plante médicinale importante de la famille des Rutacées. Elle est principalement utilisée par les industries de transformation des fruits, où l'écorce est généralement jetée en grande quantité.

L'écorces d'orange jetée est riches en nutriments et contiennent de nombreux composés bioactifs tels que les polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes les vitamines...etc. Qui ont diverses activités tel que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, anti-hémolytique, antibactérienne, anti carcinogène...etc.

Dans ce travail, on s'est intéressé à l'étude des activités biologiques, *in vitro* des extraits de l'écorce de clémentine dans le but de contribuer à la valorisation de ces parties considérées comme des déchets de l'agricole.

Le test de cytotoxicité, nous permet déduire que nos extraits peuvent exercer un effet cytotoxique à fortes concentrations (**2000µg**) alors que cette toxicité diminue proportionnellement avec la concentration. Comparativement à la molécule phénolique "acide gallique" les extraits ont un effet anti-hémolytique très important à la concentration (**10µg/ml**).

Concernant l'effet protecteur contre la dénaturation protéique, nos extraits montrent que même à faibles concentrations (**300pg/ml**) ils ont un meilleur effet protecteur contre la dénaturation protéique comparé au diclofenac, pour les mêmes concentrations. Ceci nous permet de présumer que les faibles concentrations de l'extrait de l'ordre du picogramme sont de puissants anti-inflammatoires.

Concernant l'activité anti-oxydante nos résultats montrent que l'extrait a un effet anti-radicalaire important à la concentration (**0.5mg/ml**) et (**1mg/ml**).

En effet, les résultats de ce travail semblent appréciables et encourageants, nous poussent à rechercher la bonne exploitation par la valorisation de l'écorce de clémentine et son utilisation dans des domaines ; médicinale, agroindustriel et cosmétique, au lieu de les jeter comme des déchets. En confirmant que l'utilisation d'une plante en toute sécurité nécessite une connaissance non seulement de ses effets bénéfiques mais aussi des complications que peut engendrer son utilisation traditionnelle non contrôlée.

Références bibliographiques

A

- **Aguilar_Martinez, (2007).**H2-Erythrocytes_MB7 : Hématologie H2_Faculté de médecine
- **Ananthi T, Marliyah M, (2015).** In vitro anti-inflammatory activity of seed extract of zea mays (L.), *journal of global biosciences*. Vol 4, (5): 2168-2173.
- **Anitha Rani A, Punitha S, Rema M, (2014).** Anti-inflammatory activity of flower extracts of cassia auriculata- an in-vitro study. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences (IRJPAS)*, 4(1):57-60.
- **Amezouar F, Badri W, Hsaine M, Bourhim N, Fougrach H, (2013).** Evaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire d'Erica arborea L. du Maroc. *Pathologie biologie*. Vol 61 pp 245-258.
- **Arulselvan P, Tangestani Fard M, Sean Tan W, Gothai S, Fakurazi S, Esa Norhaizan M, Suresh Kumar S, (2016).** Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Review Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p 1-15.
- **Arib S, Fennouch S (2015).** Evaluation des activités anti-hémolytique et anti-inflammatoire des extraits éthanoliques de feuilles de Citrus par test in vitro. Mémoire de Master, *Laboratoire de biotechnologie végétale et ethnobotanique*, pp 1-46.

B

- **Bachy E., Houout R et Dony A, (2015).** Hématologie adulte et pédiatrique, Onco Hématologie (Ellipses) 9, 44-46.
- **Barton M, (2008).** A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 118, pp 413-420.
- **Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006).** Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity. *Occurrence, and potential uses, Analytical, Nutritional and Clinical Method, Food Chemistry* 99: 191–203.
- **Benamrouch L.S, Addar L, Boudeham H, Tani S et Madani K, (2016).** Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Nature & Technology Journal. Vol. B : Agronomic & Biological Sciences*, 18 (2017) 01-08.

- **Bouhlali, E.D.T., Sellam, K., Bammou, M., Alem, C et Filali-zehzouti, Y (2016).** In vitro Antioxidant and anti-inflammatory properties of selected Moroccan medicinal plants. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6 (05): 156-162.
- **Bulmus V, Woodward M, Li L, Murthy N, Stayton P, et Hoffman A (2003).** A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs. *Journal of Controlled Release*, 93(2), 105-120.
- **Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Oszmianski J, Sarapuk J et Kleszczynska H (2010).** Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics*; 6(1), 58–67.

C

- **Chandra S, Chatterjee P, Dey P et Bhattacharya S (2012).** Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical*.
- **Chaudhuri S, Banerjee B, Sengubta B et Sengubtap K (2007).** Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and ant hemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*; 41(1), 42-48. *omedicine*, 178-180.
- **Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2017).** Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs, *oncotarget*, 9(6): 7204–7218
- **Chira K, Suh J, Saucier C, Teissèdre P, (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytonutrition fondamentale* 6: 75–82.
- **Chopade A R., Sontake P M et SAYYAD F J (2012).** Membrane stabilizing activity and protein denaturation: A Possible Mechanism of Action for the Anti-inflammatory Activity of Phyllanthus amarus. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*, 1 (1), 67-72.
- **Chung K, Wong T, Wei C, Huang Y, Lin Y (1998).** Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38:6, 421-464.

- **Cesquini M, Torsoni M A., Stoppa, G R, et Ogo S H (2003).** T-BOOH induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed. Pharmacotherapy*, 57: 124–129.
- **Cook NC, Samman S, (1996)** Flavonoids – chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources. *Nutrition Biochemistry*. 7:66–76.
- **Cook MS, Evens MD, Dizdaroglu M, Lunee J (2003).** Oxidative DNA damage: mechanisms on mutation and disease. *FASEB J*, 17(10), 1195-1214.
- **COWAN M (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. Vol 12, p. 564–582.
- **Cypres R, Bettenes B, (1975).** La formation de la plupart des composés aromatiques produits lors de la pyrolyse du phénol, ne fait pas intervenir le carbone porteur de la fonction hydroxyle, *Tetrahedron*, Vol 31 pp 365-372.

D

- **Daud A, Habib N, et Riera A S (2006).** Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects of extracts of *Phrygilanthus acutifolius* flowers. *Journal of Ethno pharmacology*, 108(2), 198–203.
- **Darvesh A , Carroll R , Bishayee A , Geldenhuy W , Schyf C (2010).** Oxidative stress and Alzheimer’s disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents, *Expert Rev. Neurother.* 10(5), 729–745.
- **Denarello A (2010).** Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Journal*, pp 935-950.
- **Devjani C, Barkha S (2011):** antimicrobial, antioxydative and anti-hemolytic activity of piper betel leaf extracts. *International Journal Pharm Sci*, Vol 3, Suppl 3, 2011, 192199.

E

- **ETEBU E et NWAUSOMA A B (2014).** A review on sweet orange (*Citrus sinensis* LOsbeck): Health diseases and management. *American Journal of Research Communication*. 2(2): 33-70.

F

- **Favier A, (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. Annales pharmaceutiques françaises, Vol. 64, pp, 390-396.
- **Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006).**
- **FAO (2018).** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agrumes, statistiques : agrumes frais et transformés.

G

- **Gardés-Albert M (2006).** Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène, Stress oxydant. Annale pharmaceutique française, Vol 64 pp 365-372.
- **Germolec R, Shipkowski A, Frawley P, Evens E (2018).** Markers of Inflammation. Immunotoxicity testing Vol 1803, pp 57-79.
- **GERSHFELD N L et MURAYAMA M (1988).** Thermal instability of red Blood cell membrane bilayers: Temperature dependence of hemolysis. *Journal of Membrane Biology*; 101(1); 67-72.
- **Goudable J, Favier A, (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants, Nutrition clinique et métabolisme, 11:115-120.
- **GOUPY P, BAUTISTA-ORTIN A, FULCRAND H, DANGLES A, (2009).** Antioxidant Activity of Wine Pigments Derived from Anthocyanins: Hydrogen Transfer Reactions to the DPPH Radical and Inhibition of the Heme-Induced Peroxidation of Linoleic Acid, *J. Agric. Food Chem*, 57, 5762–5770.
- **Guetteridge M (1995).** Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *CLINICAL CHEMISTRY*, Vol. 41, No. 12 pp 1819-1 828.

H

- **Haleng J, Pincemail J, Defraigne J.O, Charlier C., Chapelle J.P, (2007).** Le stress oxydant, Rev Med Liege; 62: 10: 628-638.
- **Halliwel B et Guetteridje J M (1990).** The antioxydants of humaine extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 280(1), 1-8.
- **Hebi M, Eddouks M (2015).** Évaluation de l'activité antioxydante de Stevia rebaudiana Evaluation of the antioxidant activity of Stevia rebaudiana, Phytothérapie p 1-6.

- **Henneberg R, Otuki M F, Furman AE, Hermann P, Nascimento, A J do et Leonart, M S (2013).** Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. *Rev. Bras. Hematology. Hemoter*, 35: 52–55.

J

- **Jacquemond C, Curk F, and Heuzet M (2013).** Les clémentiniers et autres petits agrumes, Editions Quae: 32-53.
- **James Phillips MD and Adam C, Henderson MD (2018).** Hemolytic Anemia: Evaluation and Differential Diagnosis. Womack Army Medical Center, Fort Bragg, North Carolina. *Am Fam Physician.*; 98(6):354-361.
- **Jouzeau J, Daouphars M, Benani A and Netter P, (2004).** Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroentérologie Clinique et biologique*, Vol 28 pp 16-17.

K

- **Keaney F, Larson M, Vasan S, Wilson W.F, Lipinska I, Corey D, Massaro M, Sutherland P, Vita A, Benjamin J (2003).** Obesity and Systemic Oxidative Stress Clinical Correlates of Oxidative Stress in The Framingham Study, Arthériosclerosis, thrombosis, and vascular biology (23):3 434-439.
- **Kruidenier L, Verspaget H. W (2002).** Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease — radicals or ridiculous. *Aliment Pharmacologic*, 16: 1997–2015.

L

- **Ladoh Y, Dibong, Nyegue, Djembissi T, Lenta N, Mpondo, Yinyang et Wansi (2014).** Activité antioxydant des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *J.Appl Biosci*, 84:7636– 7643.
- **Lepock J, Frey H E, Bayne HE, et Markus J (1989).** Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins. *Biochemical and Biophysical Acta (BBA)*; 980(2), 191-201.

- **Li K, Geng X, Simonsen J, Karchesy J (2004).** Novel wood adhesives from condensed tannins and polyethylenimine. *International Journal of Adhesion & Adhesives* 24: 327–333.
- **Liu Y, Heying E., and Tanumihardjo S A (2012).** History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6): 530-545.
- **Louis Trabut (1853-1929), publié en 1926.** Louis Version numérisée du livre La Clémentine. Les hybrides du "citrus nobilis" par le Docteur.

M

- **Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, and Jimenez L, (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:727– 47.
- **Marc David-Muller, (2013)** Tissu Sanguin : Le Globule Rouge Et sa Pathologie. Les Principaux types d'anémies.
- **Marfak A, (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des : Formation de psides Thèse de doctorat, Faculté de Pharmacie, UNIVERSITE DE LIMOGES Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé.
- **Milind, 2008** .citrus fruits: biology, technology and evaluation.
- **Milind P and Dev C, (2012).** Orange: range of benefits. *Int Res J Pharm*, 3(7): 59-63.
- **Mintzer D M, Billet SN, Chmielewski L, (2009).** Drug-induced hematologic syndromes. *Advances in hematology*. p 495 -863.
- **Mira L, Fernandez T, Santos M, Rocha M, Florêncio H, M. & Jennings, K R, (2002).** Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free radical research*, 36, 1199-1208.
- **Molyneux P, (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin J. Sci. Technol. 26(2): 211-219.
- **Mohammedi Z, Atik F, (2014):** Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. ISSN: 0975-9492 Vol 5 No 08 Aug.
- **Muster D, (2005).** Médicaments de l'inflammation Anti-inflammatory drugs. *EMC-Stomatologie*, vol. 1, pp 21-29.

N

- **Nabavi S F, Nabavi S.M, Ebrahimzadeh M A (2010):** In Vitro Antioxidant and Antihemolytic Activities of Grain Bran.

O

- **Oyedapo O, Akinpelu B A, Akinwunmi K F, Adeyinka M O, et Sipeolu F O (2010).** Red blood cell membrane stabilizing potentials of extracts of *Lantana camara* and its fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 2(4), 46-51.

P

- **Pasquier C (1995).** Stress oxidative et inflammation. *Revue française des laboratoires*, p 87-92.
- **Prasad A S (2009).** Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation, *Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12:646–652.
- **Prior R L, X Wu et K. Schaich, (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10): 4290-4302.

R

- **Ramful D, Bahorun T, Bourdon E, Tarnus E & Aruoma O I, (2010).** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*.
- **Robertis F A, Robertis E M H, (1995).** *Cell and molecular biology*, London, UK Saunders, 239-45.

S

- **Sadique J, Al-Rqobah W A, Bughaith M F, et El-Gindy A R, (1989).** The bio-activity of certain medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system. *Fitoterapia*, 60, 525-532.
- **Sanchez-Moreno, Larrauri J A, Saura-Calixto f, (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J.Sci FoodAgric.* 76:270-276.
- **Sarkhel S, (2015).** Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria* Mol. saponin extract in mice, Vol. 3, pp 1-3.

- **Sereme A, Millogo-Rasolodimby J, Guinko S, Nacro M, (2008).** Propriétés Thérapeutiques des plantes à tanins du BURKINA FASO. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle Africaines*, 15 :41 – 49.
- **Sergent O, Griffon B, Cillard P, Cillard J, (2000).** Alcool et stress oxydatif, Laboratoire de biologie cellulaire et végétale, faculté de pharmacie, 2, avenue Pr. Léon Bernard, 35043 Rennes cedex, France, *Pathologie Biologie* ; 49 : 689-95.
- **Silva L F, das Graças Cardoso M, Prêto P SC., Teixeira M L, Nelson D L, Magalhães ML, Ferreira, V R F, Souza R V , Soares L I and Marcussi S, (2017)** Essential Oils from *Mentha viridis* (L). L. and *Mentha pulegium* L.: Cytogenotoxic Effects on Human Cells. *American Journal of Plant Sciences*, 8, 1423-1437.
- **Singla R K, Dubey A K, Garg A, Sharma R K, Fiorino M, Ameen, S M, Al-Hiary, M. (2019).** Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397–1400.
- **Sultana B, Anwar F, Mushtaq M and Alim M, (2015).** Citrus residues: A potential source of phenolics with high antioxidant values.

T

- **Talbi H, Boumaza A, El-mostafaK, Talbi J & Hilali A, (2015).**Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). Vol 6, N°.4, pp.1111- 1117.

U

- **Ullah H M A, Zaman S, Juhara F, Akter L, Tareq S M, Masum E H & BhattacharjeeR,(2014).** *Evaluation of antinociceptive, in-vivo & in-vitro anti-inflammatory activity of ethanolic extract of Curcuma zedoaria rhizome.* *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1).

V

- **Valko M, Rhodes C.J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.
- **Vladimir-Knežević S, Blažeković B , Štefan M.B , Alegro A , Kószegi T and Petrik J, (2011).** Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Three Selected Micromeria Species from Croatia, *Molecules*; 16, 1454-1470.

W

- **Waleed F A, (2019).** Nutritional Benefits of Citrus Fruits. *Am J Biomed Sci & Res.* 2019 - 3(4). AJBSR.MS.ID.000681.DOI: 10.34297/AJBSR.2019.03.000681
- **Williams L.A.D, ConnarA O, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker J A, Conrad J, Vogler B, Rosner H et Kraus W, (2008).** The in vitro Anti-denaturation Effects Induced by Natural Products and Non-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is proposed as a Screening Assay for the Detection of Anti-inflammatory Compounds, without the use of Animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. *West Indian Med J*, 57 (4): 327- 331.

Y

- **Yougbaré-Ziébrou M. N, OuédraogoN, Lompo M, Bationo H, Yaro B, Gnoula C, Guissou I P, (2015).** Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 14(4).

Z

- **Zaragozá M C, Lopez D, P Sáiz M, Poquet M, Perez J, Puig-Parellada P, Mitjavila M T, (2008).** Toxicity and Antioxidant Activity in Vitro and in Vivo of Two *Fucus vesiculosus* Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7773–7780. Doi:10.1021/jf8007053.

Résumé :

La clémentine est un agrume de la famille des rutacées consommée par le ménage ou transformée en industrie où l'écorce est son déchet. L'écorce peut être valorisée car elle est très riche en composés bioactifs tels que les polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes et les vitamines etc. Ces composés bioactifs possèdent de nombreuses activités : antioxydante, anti-inflammatoire, anti-hémolytique antibactérienne, anti-carcinogène etc.

Les aspects principaux visés dans ce travail sont : la valorisation de l'extrait de l'écorce de clémentine par l'évaluation *in vitro* de l'activité anti-hémolytique, anti inflammatoire et anti radicalaire. Dans cette expérimentation des tests biologiques *in-vitro* sont réalisés: cytotoxicité anti-hémolytique, anti-inflammatoire ainsi que chimiques : DPPH à partir des extraits de l'écorce de la clémentine. Les résultats ont démontré que l'extrait a fortes concentrations (>2000 µg/ml) exerce un effet cytotoxique. Concernant l'effet anti-hémolytique, la concentration de 10 µg/ml de l'extrait présente la meilleure protection contre l'hémolyse. Pour l'effet anti-inflammatoire, la concentration de 3 µg/ml de l'extrait protège au mieux la dénaturation protéique. Enfin pour le test du DPPH, l'effet anti-radicalaire est le plus important à la concentration (0.5mg/ml) et (1mg/ml).

Les résultats de ce travail sont très prometteurs quant à la valorisation des extraits de l'écorce de la clémentine dans des domaines ; médicale, agroindustriel et cosmétique.

Mots clés : clémentine, l'écorce, anti-hémolytique, anti-inflammatoire, antioxydant, polyphénols.

Summary

Clementine the rutaceae family citrus' consumed by the household or transformed into industry, the bark is its waste. The bark can be valued because it is very rich in bioactive compounds such as polyphenols, flavonoids, carotenoids and vitamins etc.

The main aspects targeted in this work: Is the recovery of the extract of clementine bark by the *in vitro* evaluation of anti-hemolytic, anti-inflammatory and anti-radical activity. In this experiment, in-vitro biological tests are made out of: cytotoxicity, anti-hemolytic, anti-inflammatory as well as chemical: DPPH from extracts of the bark of clementine. The results demonstrated that the extract in high concentrations (> 2000 µg / ml) exerts a cytotoxic effect. Regarding the anti-hemolytic effect, the concentration of 10 µg / ml of the extract offer the best protection against hemolysis. For the anti-inflammatory effect, the concentration of 3 µg / ml of the extract best protect protein denaturation.

Finally for the DPPH test, the anti-radical effect is most important at the concentration (0.5 mg / ml) and (1 mg / ml).

The results of this work are very promising as regards the valuation of extracts of the bark of clementine in fields; medical, agro-industrial and cosmetic.

Ky words: *Clementine*, bark, anti-hemolytic, anti-inflammatory, anti-oxidant, polyphenols.

ملخص

كليمونتين هو حمضيات من عائلة rutacées التي تستهلكها الأسرة أو تتحول إلى صناعة حيث يكون اللحاء نفاياتها. يمكن تقييم اللحاء لأنه غني جدًا بالمركبات النشطة بيولوجيًا مثل البوليفينول والفلافونويد والكاروتينات والفيتامينات وما إلى ذلك. تحتوي هذه المركبات النشطة بيولوجيًا على العديد من الأنشطة: مضاد للأكسدة ومضاد للالتهابات ومضاد للجراثيم ومضاد للسرطان وما إلى ذلك.

الجوانب الرئيسية المستهدفة في هذا العمل هو: تعزيز استخراج لحاء كليمونتين من خلال التقييم المختبري للنشاط المضاد لانحلال الدم، مضاد للالتهابات ومضاد للجذور. في هذه التجربة، يتم إجراء الاختبارات البيولوجية في المختبر: سمية خلوية مضادة للدم ومضادة للالتهابات وكذلك كيميائية: DPPH من مقتطفات لحاء الكليمونتين. أظهرت النتائج أن المستخلص بتركيزات عالية (> 2000 ميكروغرام / مل) له تأثير سام للخلايا. فيما يتعلق بالتأثير المضاد للانحلال، فإن تركيز 10 ميكروغرام / مل من المستخلص يوفر أفضل حماية ضد انحلال الدم. للتأثير المضاد للالتهابات، فإن تركيز 3 ميكروغرام / مل من المستخلص يحمي تشوه البروتين بشكل أفضل. وأخيرًا بالنسبة لاختبار DPPH، يكون التأثير الجذري المضاد للحرية أكثر أهمية عند التركيز (0.5 ملغ / مل) و (1 ملغ / مل).

نتائج هذا العمل واعدة للغاية فيما يتعلق بتقييم مستخلصات لحاء كليمونتين في عدة مجالات: الطبية، الصناعات الزراعية والتجميلية. الكلمات المفتاحية: كليمونتين، لحاء، مضاد انحلال الدم، مضاد التهاب، مضاد أكسدة، بوليفينول