

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

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

Département de Biologie

MEMOIRE

Présenté par

Bouhassoun Chifaa

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Physiologie cellulaire et Physiopathologie

Thème

**Etude *in vitro* de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire et antioxydante
des flavonoïdes de l'écorce de la clémentine extrait par le n-butanol**

Soutenu le 10 /09/2020, devant le jury composé de :

Président LOUKIDI BOUCHRA Maitre de conférences Université de Tlemcen

Encadreur Mme BAKHTI F Maitre de conférences, Université de Tlemcen

Examineur SAKER MERIEM Maitre de conférences, Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé :

La clémentine (*Citrus Clementina*) est un agrume du clémentinier, un arbre hybride de la famille des rutacées. L'écorce de la clémentine représente un gisement important en raison de ses composés phénoliques (tanins, acides phénoliques et les flavonoïdes). Le présent travail a pour but de contribuer à la valorisation des flavonoïdes de l'écorce de la clémentine par l'étude *in vitro* de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire et anti-radicalaire. Les flavonoïdes sont extraits par du méthanol et n-butanol. Les résultats ont démontré que nos extraits sont cytotoxiques à la concentration de 250 µg/ml avec un taux d'hémolyse de 97,59 %. La meilleure stabilité membranaire des érythrocytes (75,31 %) est observée à de faibles concentrations (15 µg/ml). L'effet anti-inflammatoire est à son summum pour les concentrations de 3 pg/ml de l'extrait. Enfin l'effet anti-radicalaire est très important à la concentration 2 mg/ml. Cette étude a permis de déduire que l'écorce de la clémentine constitue un gisement intéressant qui mérite d'être exploité dans différents domaines grâce à ses propriétés biologiques.

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

Summary:

Clementine (*Citrus Clementina*) is a citrus fruit of the Clementine tree, a hybrid tree of the Rutaceae family. The bark of the clementine represents an important field because of its phenolic compounds (tannins, phenolic acids and flavonoids). The aim of this work is to contribute to the valuation of flavonoids bark's of clementine by the *in vitro* study of the anti-hemolytic, anti-inflammatory and anti-free radical activity. Flavonoids are extracted with methanol and n-butanol. The results demonstrated that our extracts are cytotoxic at a concentration of 250 µg / ml with a hemolysis rate of 97.59%. The best membrane stability of erythrocytes (75.31%) is observed at low concentrations (15 µg/ml). The anti-inflammatory effect is at its peak at concentrations of 3 pg / ml of the extract. Finally, the anti-free radical effect is very important at a concentration of 2 mg / ml. This study made it possible to deduce that the bark of the clementine constitutes an interesting deposit which deserves to be exploited in various fields due to its biological properties.

Keywords: clementine, bark, anti-hemolytic, anti-inflammatory, antioxidant, citro-flavonoids.

ملخص:

كليمنتين (*Citrus Clementina*) هي ثمرة حمضيات لشجرة الكليمنتين، شجرة هجينة من عائلة **Rutaceae**. يمثل لحاء الكليمنتين راسبًا مهمًا بسبب مركباته الفينولية (التانينات، الأحماض الفينولية والفلافونويد). الهدف من هذا العمل هو المساهمة في تقييم مركبات الفلافونويد الموجودة في لحاء الكليمنتين من خلال الدراسة المخبرية للنشاط المضاد للدم، الالتهابات ومضاد الجذور الحرة. يتم استخلاص مركبات الفلافونويد مع الميثانول و **n**-بيوتانول. أظهرت النتائج أن مستخلصاتنا سامة للخلايا بتركيز 250 ميكروغرام / مل بمعدل انحلال دم 97.59%. لوحظ أفضل استقرار غشاء لكريات الدم الحمراء (75.31%) بتركيزات منخفضة (15 ميكروغرام / مل). يكون التأثير المضاد للالتهابات في ذروته بتركيزات 3 بيكوغرام / مل من المستخلص. أخيرًا، يكون التأثير المضاد للجذور الحرة مهمًا جدًا بتركيز 2 مجم / مل.

الكلمات المفتاحية: الكليمنتين، اللحاء، مضاد للدم، مضاد للالتهابات، مضاد للأكسدة، سيترو فلافونويد.

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu Allah a notre créateur le plus puissant de me donner la force, la volonté et le courage, ainsi m'avoir guidé vers le chemin de savoir afin d'accomplir ce travail modeste.

Mes profonds remerciements à ma promotrice madame Bekhti F Pour ses encouragements, ses conseils et son aide tout au long de ce travail.

Je tiens également à remercier les membres de jury d'avoir accepté de siéger à ma soutenance : Mme LOUKIDI BOUCHRA et MARIEM SAKER

Mes sincères remerciements s'adressent aux responsables et à tout le personnel du laboratoire PPABIONUT. Mes remerciements vont également à tous les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

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

Mes chers parents avec tout mon amour, ma tendresse et mon estime, je n'arriverai jamais à leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi. Que dieu vous procure, Santé et longue Vie ;

Ma chère maman qui m'a soutenu pendant toute la période de mes études. Je lui souhaite une santé meilleure et longue Vie ;

A mon mari, pour ses encouragements, son dévouement, et son appui à toutes mes entreprises.

Mon frère MOUAD ; mes sœur GHADA et ARIDG pour leurs aides et encouragements qu'ils m'ont apporté ;

A tous les enseignants et enseignantes qui ont contribué à ma formation ;

A toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

CHIFAA

Liste des Abréviations :

ABTS	Acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
AC	Absorbance du test
AT	Absorbance du contrôle
BSA	Albumine de sérum bovin
DO	Densité optique
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
FRAP	Redistribution de fluorescence après photoblanchiment
GRh	Gestion des ressources humaines
IP3	Phospho-inositol triphosphate
Nacl	Chlorure de sodium
ORAC	Capacité d'absorption des radicaux oxygénés
PH	Potentiel hydrogène
PKc	Protéine kinase C
TEAC	Trolox Equivalent antioxidant capacity
UV	Ultra violet
V/V	Volume/Volume
IC50	Concentration Inhibitrice 50

Liste des figures :

Figure01: Photographie de la clémentine.....	04
Figure 02 : Arbre phylogénétique des espèces du genre citrus.....	05
Figure 03 : Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange.....	06
Figure 04 : Structure de base d'un flavonoïde...	10
Figure 05 : Principales classes de flavonoïdes.....	13
Figure 06 : Aspect de l'orange (citrus clémentina), de sa peau et de ses quartiers.....	20
Figure 07 : Séchage de l'écorce de la clémentine, poudre de l'écorce de la clémentine séchée, broyée et tamisée.....	20
Figure 08 : Schématisation de l'appareil de Soxhlet.....	21
Figure 09 : Schéma du montage de chauffage à reflux.....	22
Figure 10 : Filtration du matériel végétale et évaporation du méthanol	23
Figure 11 : Extraction liquide-liquide des citro-flavonoïdes.....	24
Figure 12: Protocole d'extraction des citro-flavonoïdes.....	24
Figure 13 : Effet des différentes concentrations des citroflavonoïdes sur la cytotoxicité des globules rouges	30
Figure 14 : Comparaison des différentes concentrations en acides gallique et citro-flavonoïdes sur la cytotoxicité des globules rouges	31
Figure 15 : Effet des différentes concentrations des citro flavonoïdes sur le taux d'hémolyse	32
Figure 16 : Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et les citro-flavonoïdes.....	33

Figure 17 : Comparaison du taux d'hémolyse entre le diclofénac et les citroflavonoïdes.....	33
Figure 18 : Comparaison du taux d'hémolyse entre la diclofénac, l'acide gallique et les citroflavonoïdes	34
Figure 19 : Taux d'inhibition de la dénaturation protéique par les cito-flavonoïdes.....	35
Figure 20 :Comparaison de taux d'inhibition de la dénaturation protéique entre diclofénac et citro-flavonoïdes	35
Figure 21 : Absorbance des différentes concentrations des citro-flavonoïdes en fonction du temps.....	36

Liste des Tableaux :

Tableau n° 01: Classification botanique de la clémentine.....**05**
Tableau 02 : Sources alimentaires des flavonoïdes.....**14**

Sommaire

Introduction	01
---------------------------	-----------

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Généralités sur la clémentine

1-Histoire de la clémentine.....	04
---	-----------

2-Classification botanique	05
---	-----------

3-Les différentes parties de la clémentine :

3.1.L'épicarpe.....	06
----------------------------	-----------

3.2.Le mésocarpe.....	06
------------------------------	-----------

3.3.L'endocarpe.....	06
-----------------------------	-----------

4-Les types de la clémentine :.....	07
--	-----------

4.4.La clémentine sans pépins	07
--	-----------

4.2.La clémentine à pépins.....	07
--	-----------

5-La composition de l'écorce de la clémentine :

1.Les polyphénols et les composés phénoliques	07
--	-----------

5.1.1Les acides phénoliques	08
--	-----------

5.1.2 Les tanins	08
-------------------------------	-----------

5.1.3 Les flavonoïdes.....	09
-----------------------------------	-----------

Chapitre 02 : Les flavonoïdes

1-Définition	10
---------------------------	-----------

2- Structure chimiques des flavonoïdes.....	10
--	-----------

3-Classifications générale des flavonoïdes :.....	10
--	-----------

3.1.Flavones.....	11
--------------------------	-----------

3.2.Flavonols.....	11
---------------------------	-----------

3.3. Flavanones et Dihydroflavonols.....	11
3.4.Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols et Anthocyanidols	11
3.5. Chalcones et Aurones.....	12
3.6. Isoflavone et néoflavone.....	12
4- Distribution et localisation	13
5-Propriétés des flavonoïdes	15
Chapitre 03 : L'hémolyse et l'inflammation	
1-Introduction	16
2-L'hémolyse	16
3-L'inflammation.....	16
4-Tests anti-radicalaires :.....	17
4.1.DPPH.....	17
4.2.ABTS.....	17
4.3. TEAC.....	17
4.4. ORAC.....	18
4 .5.FRAP.....	18
Matériel et Méthodes	
1 -Extraction des flavonoïdes	23
2-Test de Cytotoxicité	25
3 -Test anti-hémolytique.....	26
4-Test anti-inflammatoire	27
5-Test anti-radicalaire (DPPH).....	28
Résultats et interprétations.....	29
Discussion.....	37

Conclusion	42
Références bibliographiques.....	44

Introduction :

Les agrumes sont les fruits dont la production est la deuxième plus importante au monde avec plus de 115 millions de tonnes par an, 517 milles tonnes ont été produits en Algérie qui occupe la 18^{ème} place mondiale (FAO, 2013).

Les agrumes se répartissent en plusieurs genres dont le plus important est le genre « Citrus ». La clémentine (*Citrus clémentina*) est apparue à la fin du XIX^e siècle à partir d'un semis de pépins de mandarinier réalisé par le père Clément, à l'orphelinat de Messerghine (Algérie) (Chahidi *et al.*, 2008).

L'écorce de la clémentine représente un gisement important de composés phénoliques : les polyphénols, les tanins et essentiellement les acides phénoliques et les flavonoïdes. Ces derniers sont nommés citro-flavonoïdes car elles appartiennent aux agrumes (Mouly, 1994 ; Kawaii *et al.*, 1999).

Les citro-flavonoïdes sont des métabolites secondaires et constituent une famille de molécule très répandues réparties en plusieurs classes dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavonones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les chalcones et aurones ainsi que les anthocyanes (Heim *et al.*, 2002 ; Cheynier *et al.*, 2005).

Au niveau du fruit, les flavonoïdes sont largement abondants dans les téguments externes des fruits. Ces composés phénoliques possèdent des activités biologiques. Les flavonoïdes peuvent avoir une activité anti-hémolytique maintenant l'intégrité de la membrane des globules rouges en la stabilisant lors d'un choc osmotique. Les flavonoïdes ont aussi une activité anti-inflammation, cet effet serait dû à la réduction du métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipooxygénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase A2 (Chaudhuri *et al.*, 2007 ; Manthey *et al.*, 2000).

La propriété anti-radicalaire des flavonoïdes est liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques. Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels (Amic' *et al.*, 2003 ; Fuhrman *et al.*, 1995).

Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'activité *in vitro* anti-hémolytique, anti-inflammatoire et antioxydante des citro-flavonoïdes de l'écorce de la clémentine extrait par le n-butanol.

Ceci afin de déterminer la concentration optimale des citro-flavonoïdes qui permet de protéger les globules rouges de l'hémolyse avec un effet anti-inflammatoire et 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 globules rouges induite par l'hypotonie et la chaleur. Le test anti-inflammatoire est réalisé 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 anti-radicalaire de l'extrait.

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 :

Généralités sur la clémentine

1. Histoire de la clémentine :

La clémentine est aujourd'hui l'agrume phare de la zone méditerranéenne où elle naquit vers la fin du XIXe du côté d'Oran en Algérie. Son histoire commença précisément dans les vergers de l'orphelinat de Misserghine, où le père Clément remarqua la présence d'une nouvelle espèce. Quelques années plus tard, parmi les arbres issus de ces semis, on attira son attention et celle probablement des enfants de l'orphelinat sur les fruits de l'un d'entre eux remarquables par la qualité acidulée et la précocité de maturité (**Praloran,1971 ; Agostini et al,1996 ;**)

Plus tard au début du XXe, en hommage à son découvreur ce fut nommé Clémentinier et ses fruits clémentine. Si l'origine maternelle du clémentinier était certifiée en revanche l'identité du pollinisateur fut longtemps inconnue.



Figure01 : Photographie de la clémentine.

2-Classification botanique :

La clémentine est une l'un des agrumes de l'espèce « Citrus réticula », leur apparition est relativement récente (en virons de 100 ans) appartient à la famille des « Rutacées » (Synonyme : Aurantiacées) (Luro *et al.*, 2013).

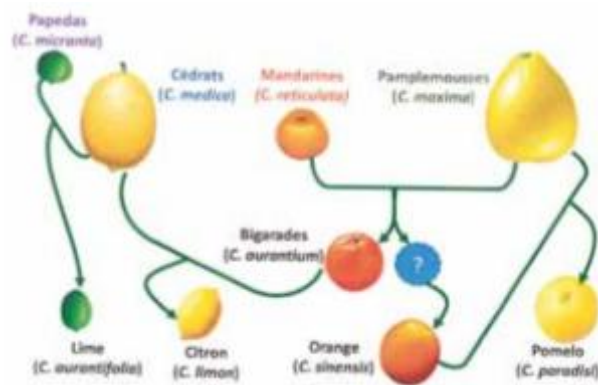


Figure 02 : Arbre phylogénétique des espèces du genre citrus

Tableau n° 01: Classification botanique de la clémentine (Burt., 2004; Butje et al .,2008 ; Dev&Milind., 2012).

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

3-Les différentes parties de la clémentine :

La structure anatomique de tous les fruits des citrus cultivés telle que la clémentine elle est la même présentée dans la **figure 03 (Ramful et al ., 2010)**.

D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits charnus de type bai avec un péricarpe structuré en 3 parties bien différenciées :

3.1. L'épicarpe appelé aussi « flavédo » : c'est la surface périphérique représente environ de 8 à 10 % du fruit, leur coloration ce fait selon des pigments caroténoïdes. Constitué de plusieurs glandes sécrétrices réparties des manière irrégulière sous formes de poche bordées par de nombreuses assises des cellules sécrétrices dont la formation fait intervenir des cellules épidermiques et des nodules méristématiques superficiels.

3.2. Le mésocarpe appelé « albédo » : c'est la couche intérieure blanchâtre plus ou moins épaisse par apport à la taille du fruit dont la structure spongieuse.

3.3. L'endocarpe appelé communément « pulpe », c'est la partie comestible de l'agrume formé par une membrane fine qui tapisse les nombreuses loges capillaires (**Huet, 1991 ; Albagnac, 2002 ; Bennici et al ., 2010**).

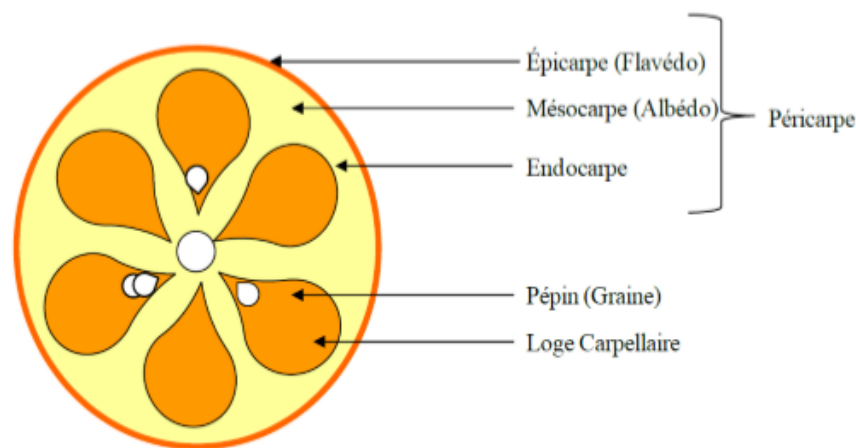


Figure 03 : Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange (**Huet, 1991**).

4-Les types de la clémentine :

La clémentine est cultivée sous deux clones **Ordinaire** et **Montréal**. Pour le premier : est une culture à pollen et ovule fonctionnelle, donnant des fruits spermé par auto-fécondation ou fécondation croisée. En absence des pollen étranger, ces fruits sont strictement aspermés par conséquent dans le cas de la pollinisation croisés, les pépins sont en nombre plus grand et que le pollen qui sera plus fonctionnelle et nombreuses et dans le deuxième cas .La classe de type montréal, est auto-fertile et présente toujours des pépins

D'après les études de **Henri CHAPOT, 1963** on distingue :

4.1 .La clémentine sans pépins : elle appartient au colonne «ordinaire » et proviennent d'une plantation homogène c'est le cas le plus rare, elle porte de 1 à 5 pépins sans que ce nombre soit dépassé.

4.2 .La clémentine à pépins : cette forme de fruits porte des pépins à nombres variables plus de 10, appartiennent de colonne ordinaire connue une pollinisation, soit montréal par un nombre de pépin supérieurs en moyenne dit : type ordinaire inter-pollinisées .

5- La composition de l'écorce de la clémentine :

En générale, les agrumes occupe une place unique dans la règne végétale et ont une position importante vue leur grande consommation, parmi toutes les espèces d'agrumes «la clémentine » est caractérisée par l'écorce qui contient des composés bioactifs ayant des propriétés biologiques très importantes dans différents domaine.

5.1 .Les polyphénols et les composés phénoliques :

Sont les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes. Les polyphénols sont l'un des principales classes de ces métabolites localisés généralement au niveau des différentes parties de la plantes (racines, tiges, les fleurs, les feuilles et fruits) de tous les végétaux. Jouent un rôle contre des microbes pathogènes et les prédateurs des plantes, ils sont impliqués dans la physiologie de cette dernière et dans ses mécanismes de défense, aussi ils ont une propriéts essentielle qui est le pouvoir antioxydant (**Ignat et al.,2011.,Macheix et al.,2005 ., Robardset al.,1999**)

Les polyphénols sont doués de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle important dans la lutte contre les cancers causé par les espèces réactives oxygénées, les maladies cardiovasculaires, la peroxydation lipidique et la perte végétative par l'attaque et microbiennes (**Bahorun et al. ,1996 ; Bruneton., 1999**).

Selon leur caractéristiques structurales, les composés phénoliques se répartissent en une dizaine de classes chimiques qui ont un point commun présentées par la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 atomes de carbones, lui- même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Hennebelle et al., 2004**).

Ces classes se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant des simples C6 à des formes polymérisées) , en suite par le degré de modification de ce squelette (c'est-à-dire le degré d'oxydation, hydroxylation et de méthylation) et enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules telle que les glucides, les lipides, protéines et d'autres métabolites secondaires pouvant être des composés phénoliques (**Beta et al., 2005 ; Macheix et al ., 2005**).

Il existe plus de 8000 structures phénoliques identifiées .Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 dalton (**Harbone, 1993., Urquiaga et Leighton, 2000**)

5.1.1 .Les acides phénoliques :

Formés par un ou plusieurs fonctions phénols dérivés soit de l'acide cinnamique qui souvent estérifiées et représente un groupe très important dont la structure possède un cycle aromatique associé à 3 carbones C6-C3. Les acides les plus courants pour cette classe sont l'acide caféique et l'acide férulique.

Ils existe des dérivés de l'acide benzoïque sous forme libre ou combinée à l'état d'esters ou hétérosides. La propriété pour cette classe se représentés par une squelette de C6-C1 en commun telle que l'acide gallique (**Haslam et al.,1994 ;Macheix,2005.,Nagendaran, 2006**).

5.1.2. Les tanins :

Les tanins sont des polyphénols polaires de haut poids moléculaires (>3000Da) d'origine végétale existant dans presque toutes les parties de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines, difficile de les séparés dans un extrait végétal parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent. Ils sont divisés en deux types :

-Les tanins hydrolysables qui donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique ou de l'acide ellagique .

-Les tanins condensés ou dit « catéchiques », ce type c'est la résultat de la condensation des dérivés flavane) . Les tanins peuvent également être constitués par condensation d'unités quinone (Berthod et al,1999 Bruneton, 2009 .,Cowan, 1999 ; François-nesmi, 2010.,Haslam at al., 1994)

5.1.3. Les flavonoïdes :

La clémentine contient plus de 5000 composés différents identifiés. Parmi ces composés, la classe des flavonoïdes nommée aussi citro-flavonoïdes .

Les flavonoïdes sont trouver dans tous les plantes vasculaires et divers organes , caractérisés structurellement par l'existence de nombreuses groupement phénoliques en structure plus ou moins complexe à haut poids moléculaires .

Ces composé phénoliques ont déjà joué un rôle dans la protection contre les maladies chroniques. (Hertog *et al.*, 1995 ; Agostini et al ,1996. Keli *et al.*, 1996 ; Knekt *et al.*, 1996., Praloran,1971 Moulay, 2012 . , La louin, 2014)

Chapitre 02 : Les flavonoïdes

1. définition :

L'origine du mot flavonoïde est le mot latin «flavus = jaune ». Ils sont considérés comme des pigments quasi universels de végétaux. Généralement trouvés dans toutes les plantes vasculaires où ils peuvent localiser dans divers organes : racine, tiges, fleurs et fruits. Tous les flavonoïdes appartenant aux agrumes sont appelés citro-flavonoïdes (**Chithan *et al.*, 1993., Jovanovic *et al.*,1997**)

2. Structures chimiques des flavonoïdes :

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbones constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés eux par une chaîne à 3 atomes de carbones qui est communément cyclisés pour former le cycle C (**Bamforth, 1999 ; Bruneton, 1999**).

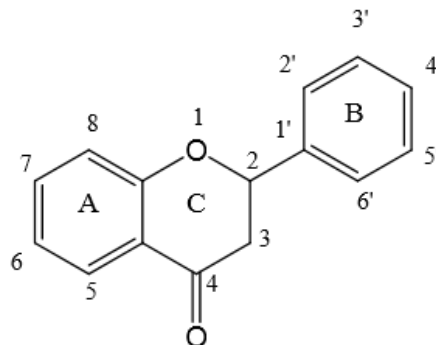


Figure 04 : Structure de base d'un flavonoïde (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

3. Classification générale des flavonoïdes :

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavonones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les chalcones et aurones et les anthocyanes (**Heim *et al.*, 2002**).

3.1. Flavones : Sont une sous familles des flavonoïdes, dont la squelette est basés sur :2-phényl-1-benzopyran-4-one ou 2-phénylchromèn-4-one. Ce sont des colorant végétaux jaunes parfois présents sous forme d'hétérosides solubles dans l'eau et parfois rencontré comme o-pigment avec les anthocyanes (**Cermak R, Wolffram S, 2006.**)

3.2. Flavonols : Sont des flavonoïdes qui portent un hydroxyle phénolique en C3 et une fonction carbonyle c=o en C4 au niveau de l'hétérocycle central. Le nombre et la position d'hydroxyle phénolique-OH soit méthyles (groupe méthoxy) fait la différence entre les différents composants de cette classe.

Sont aussi des pigment végétaux de couleurs jaunes plus ou moins claire (**Sultana et Anwar, 2008**).

3.3. Flavanones et dihydroflavonols : Sont différents des premières classes par la présence de centre d'asymétrie et l'absence de la double liaison C2-C3.

Les dihydroflavonols semblent un peu moins fréquente que ses homologues insaturés rassemblant les flavones et les flavonols. Se distinguent les flavanones par l'hydroxylation de C3 (**HEIM et al., 2002**).

3.4. Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols et Anthocyanidols :

Sont trois groupes de molécule toujours hydroxylés en position 3. Le groupe carbonyle elle est absent en C4. Cette position dans le cas des flavane- 3,4-diols elle est hydroxylée par contre au niveau des flavan-3-ols et anthocyanidols.

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont appelés aussi les « pro-anthocyanidols » ou «tanins condensés »,sont les pélargonidol et lecyanidol ,sont les plus fréquents .

Les anthocyanosides sont caractériser par l'attachement d'hydroxyle dans la position 3 par une liaisons «hétérosidique » (**Heim et al .,2002**).

3.5. Chalcones et Aurones :

Les chalcones sont différents des autres types de flavonoïdes cités ci-dessus. Formés par deux unités aromatiques liées entre elles par une chaîne tri-carbonnée, cétonique alpha, bêta-insaturée, le noyau bêta majoritairement non substitué donc les substitutions dans le cycle A plus souvent identiques et même à celles des autres flavonoïdes. Pour les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone (**Ansonder, 2001**).

La numérotation des positions pour ces deux types de composés est différente des autres flavonoïdes.

3.6. Isoflavone et néoflavone :

*Les isoflavones sont très actives se trouvent essentiellement chez les légumineuses, sont moins répandues taxonomiquement, leur structure caractérisée par la présence du cycle B en position 7 par rapport aux autres flavonoïdes (**Harborne, 1994**).

*Les néoflavones sont des composés rares des flavonoïdes grâce à leur présence dans la nature par rapport aux flavones et flavonols. Ces molécules sont caractérisées par la substitution entre le groupement carboxyle et le noyau B dans le squelette des flavones (**Stafford, 1997**).

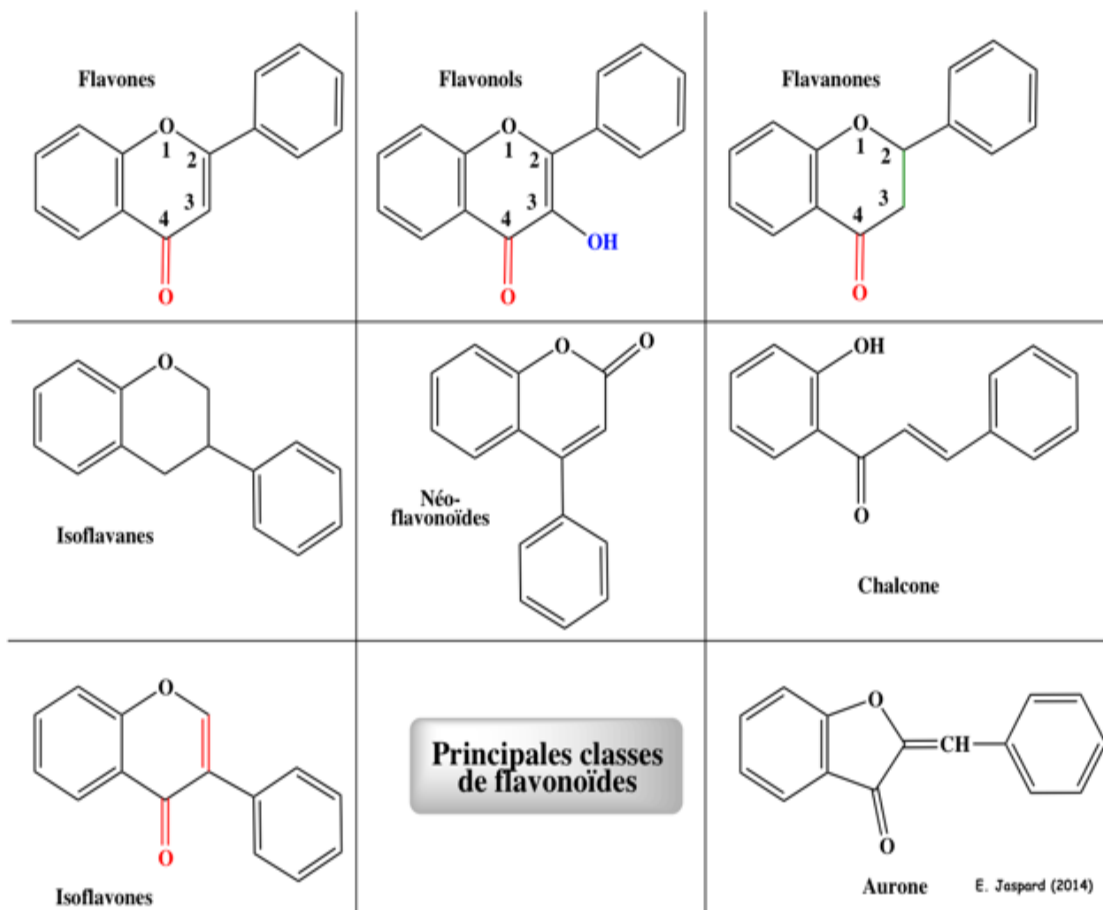


Figure 05 : Principales classes de flavonoïdes

4. Distribution et localisation :

Au niveau du fruit, les flavonoïdes sont largement abondants dans les tégument externes des fruits telle que l'écorce qui est très riche surtout en flavonols, flavones et flavanones. Ces classes représentent un grande pourcentage par rapport aux autres classes qui restent (**Bara et Guiet-Bara., 1993 ; Birt *et al.*, 1999 ; Bougnoux, 1999**).

Tableau 02 : Différentes sources alimentaires des flavonoïdes

Flavonoïdes	Aliment
Flavonols	
Kaempférol	Radis, brocoli, thé noir
quercétine	Oignon, pomme, olive, tomate
myricétine	Canneberge, vin rouge
Quercétine-3-glucoside	Oignon
Qercétine-3-rhamnoglucoside (rutine)	Thé noir
Flavones	
Chryisine	Peau des fruits
Apigénine	Persil, thym, romarin, céleri
Lutéoline	Persil, céleri
Lutéoline-7-apiosylglucoside	Poivron rouge
Flavonones	
Naringénine	Fruits des genres Citrus
Hespertine-7-rhamnoglucosides (hesperidine)	Jus d'orange
Naringznine-7-rhamnoglucoside(narirutine)	Jus d'orange
Flavan-3-ols	
Epicatéchine	Thé vert, thé noir
Catéchine	Thé vert, thé noir, pomme
Epigallocatechine	Vin rouge
Anthocyanidol	
Cyanidol	Cassis, myrtille
Malvidol	Raisin, fraise, cassis
Apigénidol	Framboise, fraise
Isoflavones	
Genisteine-7-glucoside Daidzeine-7-glucoside	Soja

5. Propriétés des flavonoïdes :

Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus .Les anthocyanes plûtôt trouver au niveau de l'écorces à la partie externe. Les chalcones sont des pigment naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaune et orangées), leur principale rôle « la pigmentation ». En particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétale qui ont la capacité de produire une vaste gamme de couleurs susceptible de donner des teintes jaune-orangé. Les flavones, aurones et chalcones donnent plûtôt des couleurs jaune-beige voire blanche. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent également jouer un rôle dans la protection.

Ils existes d'autres effet biologiques de ces composées : empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase .Certaines flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires (**Hertog et al.,1993., Chaudhry et al., 1995., Esselen et al.,2009**)

Chapitre 03 :L'hémolyse et L'inflammation

Les flavonoïdes présentent des intérêt biologiques divers : rôle anti-inflammatoire, anti hémolytique et peuvent aussi jouent un rôle d'un piègeurs des radicaux libres comme inhibiteur de la xanthine oxydase et d'autres enzyme génératrice de radicaux libres (**Kim et al., 2004**).

2. L'hémolyse :

L'hémolyse c'est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouge par des agents hémolytiques (**Thomas, 2013**).

De nombreuses études sur l'effet anti-hémolytique des extraits végétaux ont prouvé leurs efficacités. Les flavonoïdes peuvent maintenir l'intégrité de la membrane des globules rouges en la stabilisant lors d'un choc osmotique .Aussi lors d'un stress oxydatif, l'emplacement de ces composés dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier de protection de la cellule contre les substances toxiques en particulier les formes réactives de l'oxygène (**Chaudhuri et al., 2007 Devjani et Barkha, 2011 ; Bonarska-Kujawa et al., 2014 Tay-Yaba, 2016 ;Belkhir, 2017**)

3. L'inflammation :

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. De nombreuses études ont prouvé que les flavonoïdes déploient leurs activités pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, par l'inhibition d'importantes enzymes de régulation. En effet, certains flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, des molécules pro-inflammatoires très actives. Cet effet serait dû à la réduction du métabolismes de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipooxygénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase A2. Certaines kinases(Protéine Kinase C(PKC) , phospho-inositole triphosphate Kinase (PI3 Kinase)et tyrosine Kinase) impliquées dans la réponse inflammatoire sont aussi affectées par les flavonoïdes) . La présence de la double liaison C2=C3 dans le noyau des flavonoïdes semble être essentielle à leur activité anti-inflammatoire .Le potentiel anti-inflammatoire dépend également du profil d'hydroxylation des cycle A et B (**Kim et al .,1996 ; Manthey et al.,2000 ;Middleton et al., 2000**)

4. Tests anti-radicalaires :

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels. L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène.

La propriété anti-radicalaire des flavonoïdes liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques (**Halliwell, 1994 ;Fuhrman et al., 1995 ;Cotelle, 2001 ;Amic' et al., 2003**)

4.1.DPPH :

Le DPPH(1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle) donne naissance à un radical stable possédant une couleur violette en solution (maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 517nm) et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant. En effet, son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ces couches électroniques s'accompagne de la disparition de la coloration violette. Ce changement de coloration est suivi par spectrométrie à 517nm.

3.2. Le TEAC : A été mesuré dans le sérum en utilisant la méthode de **Miller et al (1993)**, basé sur l'inhibition par les antioxydants de l'absorbance du cation radicalaire de(3-éthylbenothiazoline 6-sulfonate)(**Atsumi et al., 1999 ;Acuna et al., 2002 ; Koleva et al., 2002**)

4.3. ABTS :

Le pouvoir antioxydant de composés est le plus souvent évalué par le biais d'une méthode spectrométrique. Cette méthode a permis de comparer le pouvoir antioxydant de différents flavonoïdes. Celui-ci est exprimé selon un indice TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity). Il s'agit de la concentration(en mM) d'une solution de Trolox (analogue de la vitamine E mais soluble dans l'eau) ayant la même activité antioxydante qu'une solution de concentration 1mM de la substance testée. Il s'ensuit que plus l'indice TEAC est élevé plus le composé possède une activité antioxydante importante. A titre d'exemple, la quercétine fait partie des flavonoïdes présentant les indices TEAC les plus élevés (**Miller et al., 1993 ; Miller et al., 1996a ; Miller et al., 1996b ; Miller et Rice-Evans, 1996 ; Rice-Evans et al., 1996 ; Rice-Evans, 1997 ; Montoro et al., 2005 Rastija et Medic'-Saric', 2009**).

4.4. ORAC :

Selon le Centre québécois de valorisation des biotechnologies (CQVB)2018, Cette méthode est une analyse spectrofluorimétrique mesure la dégradation de la fluorescéine en pour avantage d'être sensible ,standarisée et adaptée aux matrices hydrophiles et lipophile. Elle présente des inconvénients : sensibilité à la température, elle ne mesure que les radicaux peroxy , et elle ne tient pas compte d'autres radicaux qui sont physiologiquement réactifs (Coll et Phipps,2007)

4.5. FRAP :

La méthode de FRAP est un dosage colorimétrique de transfert d'électron. Déterminé dans le sérum par la méthode de **Benzie et Strain (1996)**, qui mesure la réduction du fer ferrique à ferreux dans la présence d'antioxydant.

Elle est simple , rapide , peu coûteuse et robuste en revanche , les désavantages sont qu'elle n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant le groupe SH , incluant les thiols , qui est la capacité de transférer l'hydrogène pour cette raison le test FRAP sous-estime souvent la propriété antioxydante du sérum sanguin.

Lorsqu'on compare ces techniques, L'ORAC est la méthode de choix en raison de sa pertinence biologique aux antioxydants *in vivo* (**Cao et Prior.,1998 ; Coll et Pellegrini ., 2003 ; Prior et al ,2005.,Phipps et al., 2007 ;USDA, 2007**)

Matériel et Méthodes

1-Le choix du matériel végétal :

Ce travail porte sur l'étude des propriétés anti-hémolytiques, anti-inflammatoire et anti-radicalaires des citro-flavonoïdes de l'écorce de la clémentine (*citrus clémentina*).



Figure06 : Aspect de l'orange (*citrus clémentina*), de sa peau et de ses quartiers.

2-Préparation de l'échantillon :

Avant toute extraction la clémentine est nettoyée, pelée, et séchée. Le séchage est réalisé à une température ambiante et à l'abri de l'humidité pendant plusieurs jours. Les écorces séchées sont broyées puis tamisées dans un tamis.



Figure07 : Séchage de l'écorce de la clémentine (à gauche), poudre de l'écorce de la clémentine séchée, broyée et tamisée (à droite).

3-Extraction des composés phénoliques

3-1-Dégraissage de la poudre d'échantillon

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

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

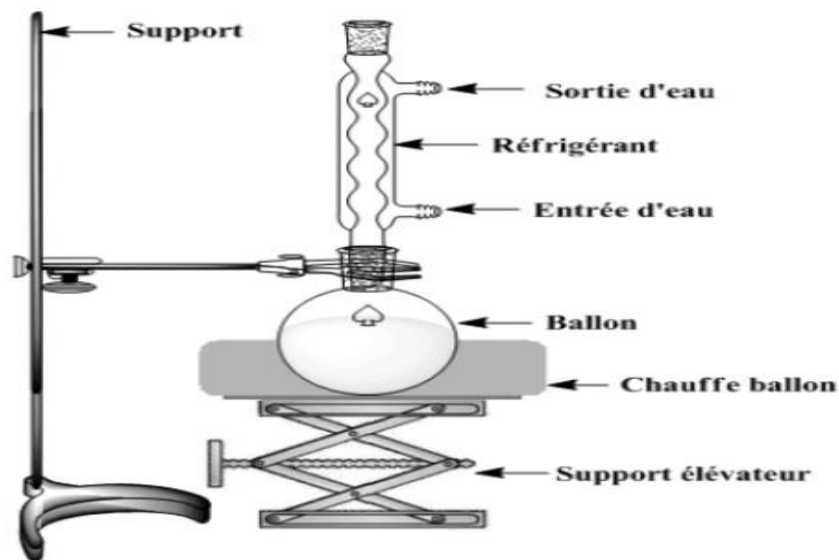


Figure08 : Schématisation de l'appareil de SOXLHET

3-2- Extraction des polyphénols totaux :

3-2-1-Extraction à chaud :

Cette méthode consiste à extraire les composés phénoliques en utilisant l'appareil sous reflux pendant 2 heures. La méthode de **Yu et Dahlgren (2005)** a été adoptée pour l'extraction des composés phénoliques, dont les étapes sont les suivantes :

Dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant, 5 g du poudre végétale est mise en contact de mélange méthanol /eau distillée (70V/30V), l'ensemble est porté à reflux pendant 2 h à une température de 60°C.

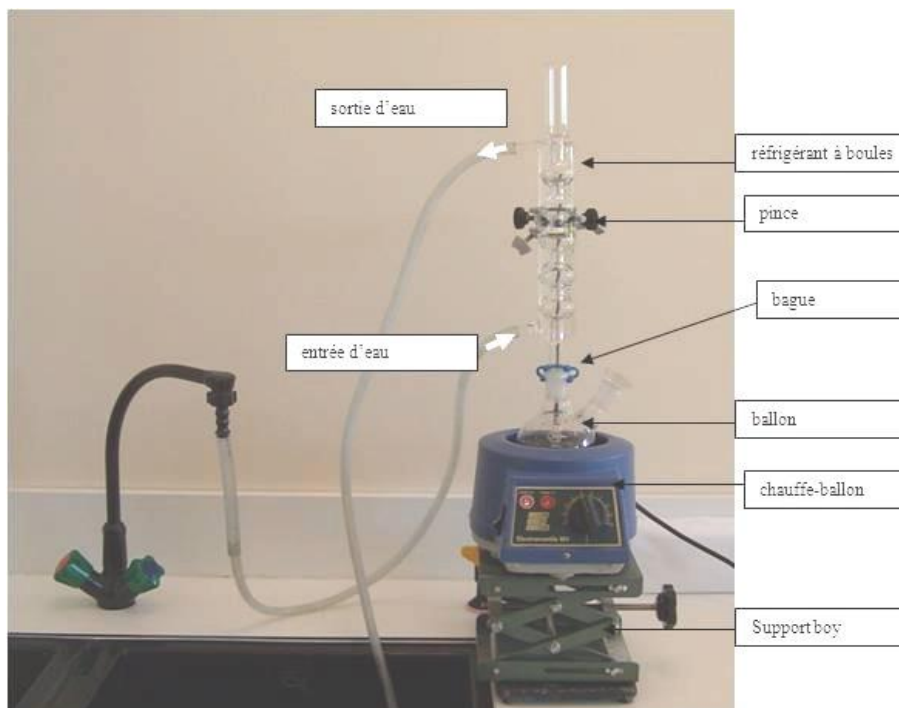


Figure09 : Schéma du montage de chauffage à reflux.

3-2-2- La filtration : la filtration permet la séparation de la phase aqueuse et la phase solide. Le papier filtre permet la séparation des deux phases.

3-2-3 L'évaporation :

Le mélange (méthanol/eau distillée) est évaporé par un évaporateur rotatif à une température de 50 °C pendant 2h.



Figure10 : Filtration du matériel végétale (à gauche) et évaporation du méthanol (à droite).

4- Extraction des citroflavonoïdes :

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

4.1. Mode opératoire :

Après la filtration et l'évaporation à sec des extraits, les résidus secs sont repris par de l'eau chaude de même volume puis épuisés dans une ampoule à décantation par 10 ml de l'acétate d'éthyle permettant l'extraction des flavonoïdes à courte chaîne. Cette opération est répétée 2 à 3 fois pour extraire le maximum des flavonoïdes. Le solvant est ensuite évaporé et l'extrait est récupéré dans 1 ml de méthanol.



Figure11 : Extraction liquide-liquide des citroflavonoïdes

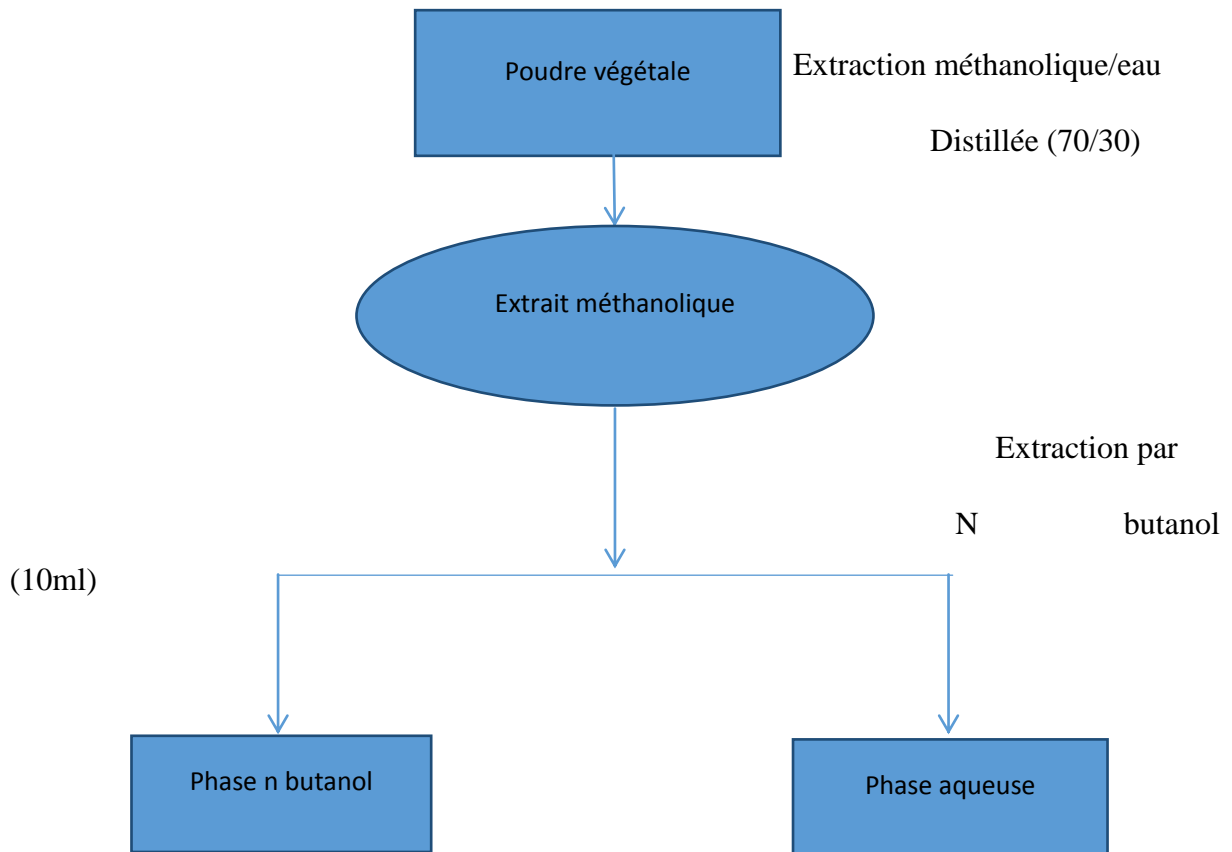


Figure12 : Protocole d'extraction des citroflavonoïdes

5-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 tours/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 (GRh), avec une solution physiologique.

5-1 Test de cytotoxicité des extraits :

Avant d'entreprendre le test de l'activité anti-hémolytique des extraits de la clémentine, un test de toxicité est nécessaire, afin de cibler les concentrations à utiliser.

Le principe de ce test est de mettre en contact des hématies avec les extraits des citroflavonoïdes, à différentes concentrations, dans une solution isotonique et de suivre le taux d'hémoglobine libérée par les cellules hémolysées, dans le but d'évaluer la cytotoxicité de ces extraits, vis-à-vis, des GRh.

Mode opératoire :

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

Le mélange réactionnel est incubé à 37°C, pendant 30 min, puis centrifugé à 3000 tours/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

Expression des résultats :

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'hémolyse} = (At/Ac) \times 100$$

Où : AC=Absorbance du contrôle

At=Absorbance du test

5-2 Test anti-hémolytique :

Principe :

Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à empêcher l'hémolyse des hématies induite par l'hypotonie et la chaleur (**Sadique et al., 1989 ; Oyedapo et al., 2010**).

Mode Opérateur

Des dilutions sont préparées à partir d'une solution mère de l'extrait, de l'acide gallique et du diclofenac.

Un volume de 0.5 ml d'extraits, d'acide gallique et diclofénac à différentes concentrations (15, 30, 75, 150, 300) µg/ml sont introduits dans des tubes à hémolyse. Dans chaque tube est ajouté 1.5ml de solution NaCl (0.9%) à pH=7.5 ensuite 2 ml d'une solution NaCl à 0.36% sont ajoutées. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 20min.

Après incubation, 0.5 ml d'une solution de globules rouge (10%) est ajoutée dans chaque tube. Les tubes sont mis en Incubation à 56 °C pendant 1 heure. L'incubation est suivie d'une centrifugation à 2500 tours/ min pendant 5 min. Enfin, la lecture du surnageant est réalisée à 560 nm dans un lecteur de plaque ELISA.

Expression des résultats :

Le pourcentage de stabilité membranaire a été estimé à partir de l'expression suivante :

$$\% \text{ de stabilité membranaire} = (AC - At / AC) \times 100 \quad \text{où : } AC = \text{Absorbance du contrôle .}$$

At = Absorbance du test.

5-3 Test anti-inflammatoire :

Principe :

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

Mode opératoire :

La méthode d'inhibition des protéines consiste à préparer quatre solutions avec trois répétitions pour chaque solution :

1-Solution essai : contient 1.8 ml de BSA à 5% + 0.2ml d'extrait à différentes concentrations (3µg ; 30ng et 300pg) ml.

2-Test contrôle : 1.8 ml de BSA à 5% + 0.2ml d'eaux distillé.

3-Contrôle : 1.8 ml de protéine de BSA + 0.2 ml d'extrait à différentes concentrations (3 µg, 30 ng et 300pg)/ml.

4-Etalon : 1.8 ml de BSA à 5% + 0.2ml de diclofinac à différentes concentrations (3µg ; 30 ng ; 300 pg)/ml (la solution standard test).

Le pH sera ensuite ajusté à 6.3 par une solution de HCL à (1N) dans chaque tube puis incubé à 37°C pendant 20 min. Suivie par une deuxième incubation à 57°c pendant 3 min.

Après refroidissement des tubes, 10 ml de solution phosphate Saline (PH=6.3) sont ajoutées. La lecture est réalisée par le spectrophotomètre UV-visible à 416 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé par la relation suivante : $\% d'inhibition = 100 - [(DO\ test\ solution - DO\ contrôle) / DO\ test\ contrôle] \times 100$.

Le contrôle représente 100 % des protéines dénaturées ; et les résultats sont comparés avec le diclofenac sodium.)

5-4 Détermination de l'activité anti radicalaire par piégeage de radicale DPPH :

Le principe de cette méthode :

Le radicale DPPH° présente une bande d'absorption maximale à 515 nm dans le méthanol, cette bande disparaît lors de la réduction de DPPH (en hydrogène correspondante) par un composé donneur d'atome d'hydrogène. La réduction du DPPH se traduit par une décoloration ; cette dernière met en évidence le pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduisant par une diminution de l'absorbance.

Mode Opératoire :

A partir des extraits obtenus des dilutions réalisées (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0062) mg / ml. De chaque dilution est prélevé 50 µl et mise dans des cuves. Un volume de 1.95 ml de DPPH est ajouté.

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

Résultats et interprétations

1-Etude des activités biologiques *in vitro* des citro-flavonoïdes

de l'écorce de la clémentine :

1. Test de cytotoxicité :

Le test de cytotoxicité *in vitro*, a été réalisé en utilisant des globules rouges humains (GRH). Différentes concentrations des extraits de l'écorce (Citro-flavonoïdes), ainsi que l'acide gallique ont été testées.

Le taux d'hémolyse a été évalué pour chaque concentration, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine échappée des (GRH), en comparaison à des contrôles à savoir le contrôle négatif (C-) (solution de GR dans eau physiologique). ,

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures suivantes (13, 14) :

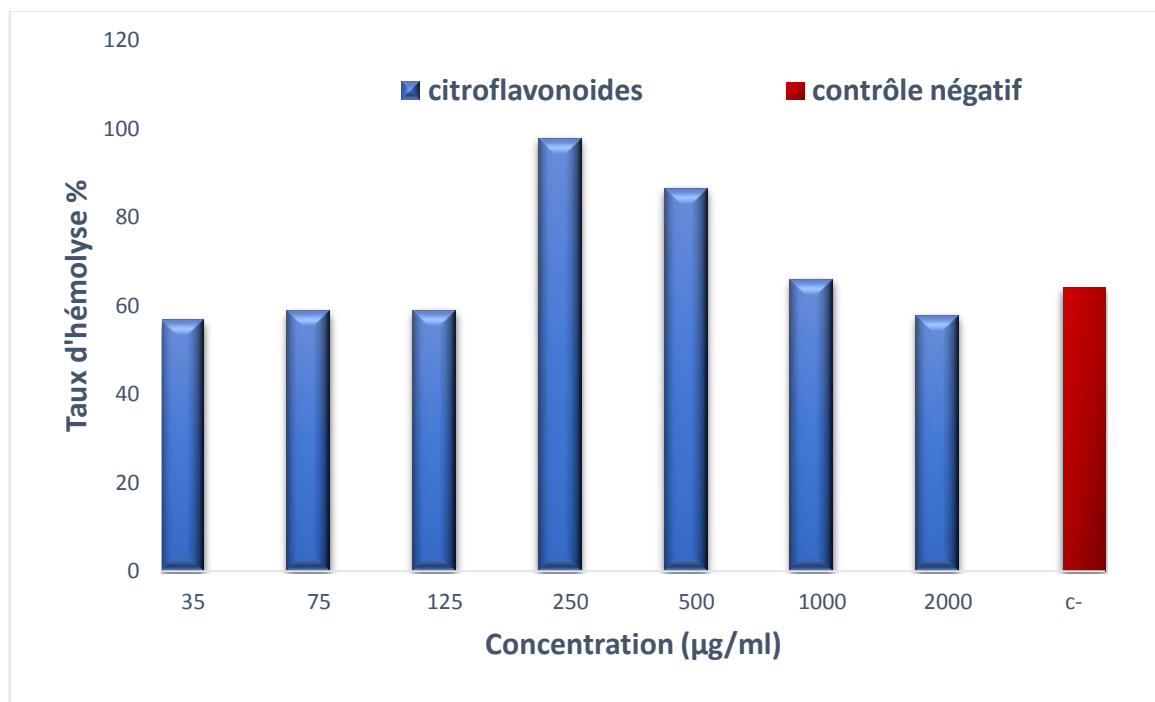


Figure 13 : Effet des différentes concentrations des citroflavonoïdes sur la cytotoxicité des globules rouges .

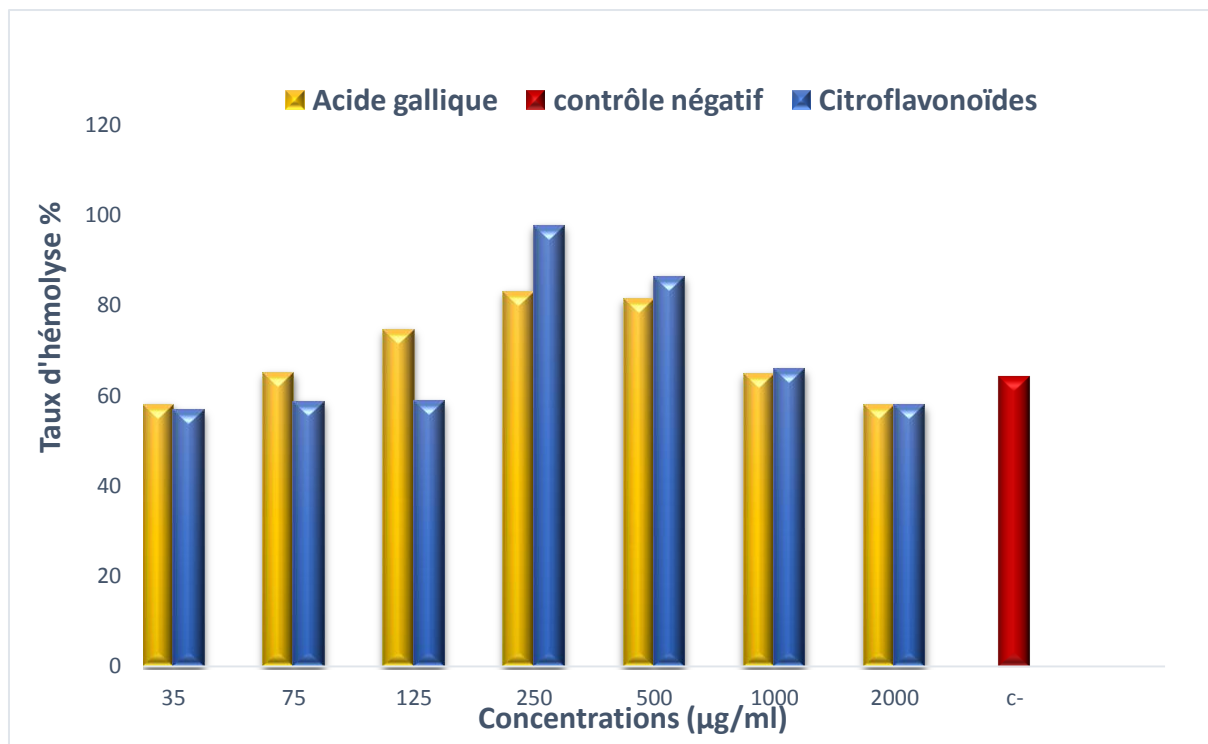


Figure 14 : Comparaison des différentes concentrations en acides gallique et citro-flavonoïdes sur la toxicité des globules rouges.

Les résultats (Figure 13), montrent que les citro-flavonoïdes présentent un effet hémolytique le plus bas à la concentration minimale (35 µg/ml) avec un taux de toxicité de (56,61%). Cette toxicité augmente pour atteindre un taux d'hémolyse maximum de 97,59% à la concentration de 250 µg/ml. La toxicité diminue progressivement avec l'augmentation des concentrations jusqu'à 57,67% d'hémolyse à la concentration la plus élevée (2000 µg/ml). A cette concentration les citro-flavonoïdes présentent un taux d'hémolyse inférieur au contrôle négatif.

Comparé l'acide gallique les citroflavonoïdes et présentent une moindre toxicité pour les concentrations (35, 75 et 125) µg/ml (Figure 14)

2-Evaluation de l'activité anti-hémolytique, *in vitro*, des citro-flavonoïdes 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 (GRH). L'évaluation de la stabilité membranaire a été déterminée par la mesure de la libération d'hémoglobine à 560 nm pour les différents concentration des citro-flavonoïdes en les comparant à des molécules des référence ; l'acide gallique, le diclofinac sodique comme étant un médicament anti-inflammatoire.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures (15,16,17,18).

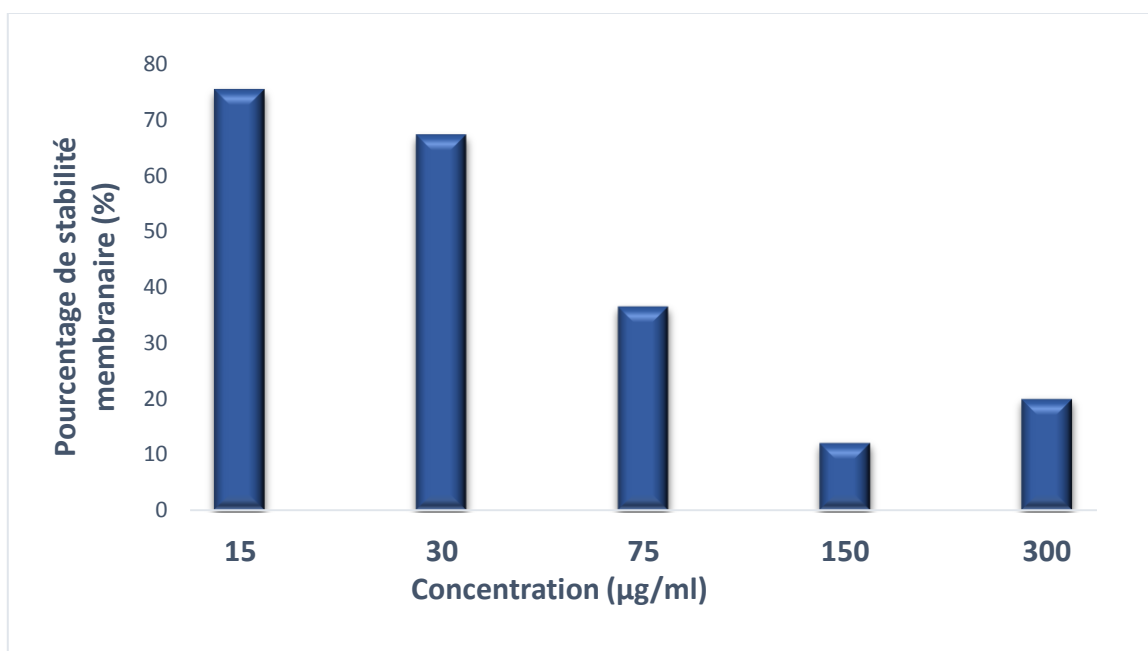


Figure 15 : Effet des différentes concentrations des citro-flavonoïdes sur le taux d'hémolyse.

Les résultats de la figure 15 montrent que les concentrations minimales (15 µg/ml) des citro-flavonoïdes exercent une activité de protection contre la lyse de la membrane érythrocytaire la plus élevée (75,31%). Cette protection diminue ensuite avec l'augmentation des concentrations de l'extrait pour atteindre une protection minimale (11,90%) à la concentration de 150 µg/ml. A la concentration 300 µg/ml, il est remarqué une augmentation de la protection de la lyse érythrocytaire (19,86).

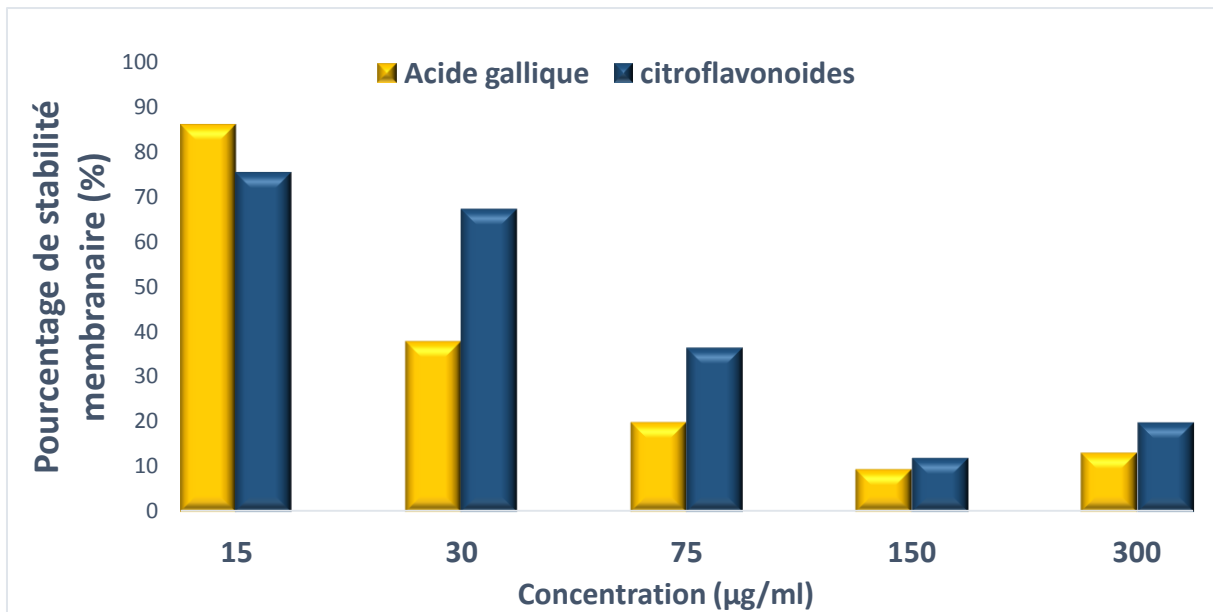


Figure 16 : Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et les citro-flavonoïdes

Les résultats de la figure 16, montre que l'acide gallique à la concentration 15 µg/ml présente meilleur effet protecteur de la membrane érythrocytaire (85,89 %) comparé à l'extrait. A l'inverse pour toutes les autres concentrations (30, 75, 150 et 300) µg/ml l'extrait montre une meilleure protection de la lyse érythrocytaire comparé à l'acide gallique.

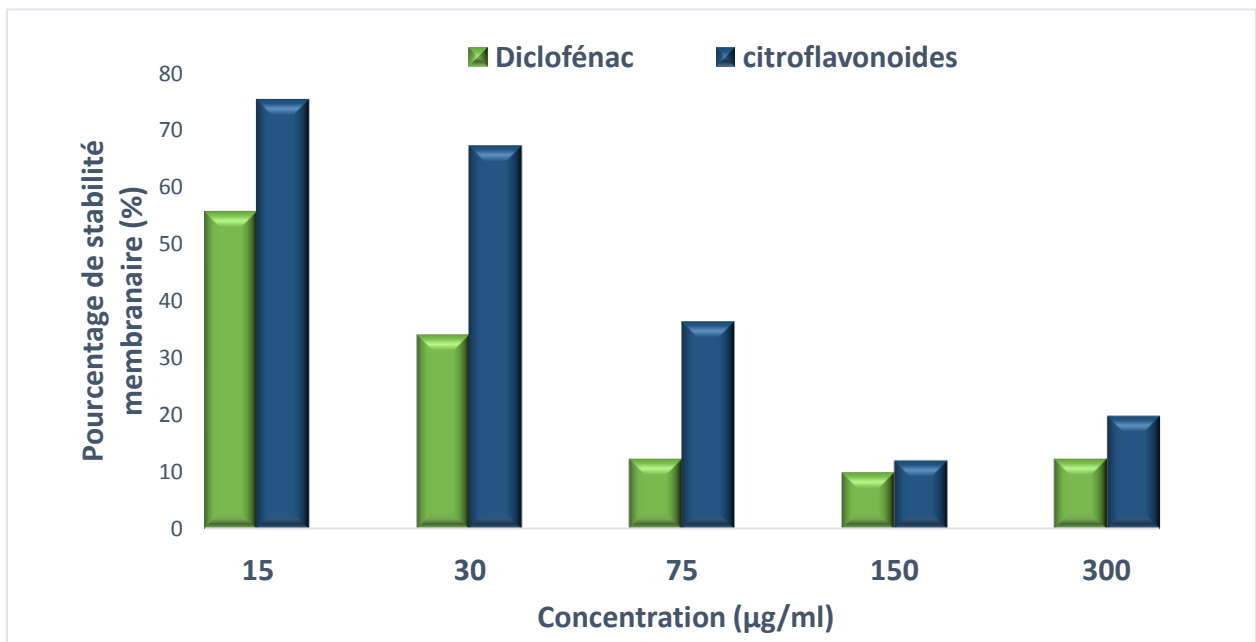


Figure 17 : Comparaison du taux d'hémolyse entre le diclofénac et les citro-flavonoïdes .

D'après les résultats de la figure 17, l'extrait possède une meilleure action de protection de la lyse érythrocytaire comparé au Diclofenac et ce pour toutes les concentrations étudiées.

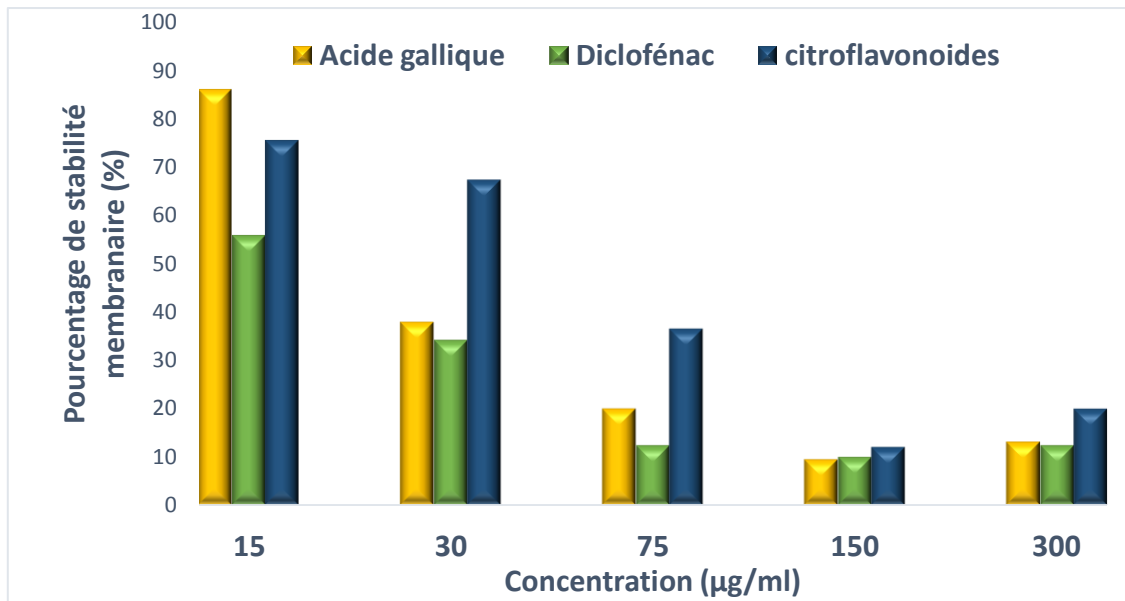


Figure 18 : Comparaison du taux d'hémolyse entre le diclofénac, l'acide gallique et les citroflavonoïdes.

Concernant les résultats de la figure 18, l'extrait possède une meilleure activité protectrice contre la lyse érythrocytaire comparé à l'acide gallique et au diclofénac et ce pour toutes les concentrations étudiées à l'exception de la concentration de 15 µg/ml. A cette concentration, l'acide gallique stabilise mieux la membrane des globules rouges comparé à l'extrait.

3- Activité anti-inflammatoire :

Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro*, des différents composants étudiées, le model de la dénaturation de l'albumine a été choisi dans cette étude. Le principe pour cette méthode est basé sur la capacité de ces composants à réduire la dénaturation thermique de la BSA (Bouhlali *et al.*, 2016).

Les résultats de l'inhibition de la dénaturation pour les citro-flavonoïdes et le diclofénac (médicament anti-inflammatoire comme molécule de référence) sont représentés dans les figure : 19, 20

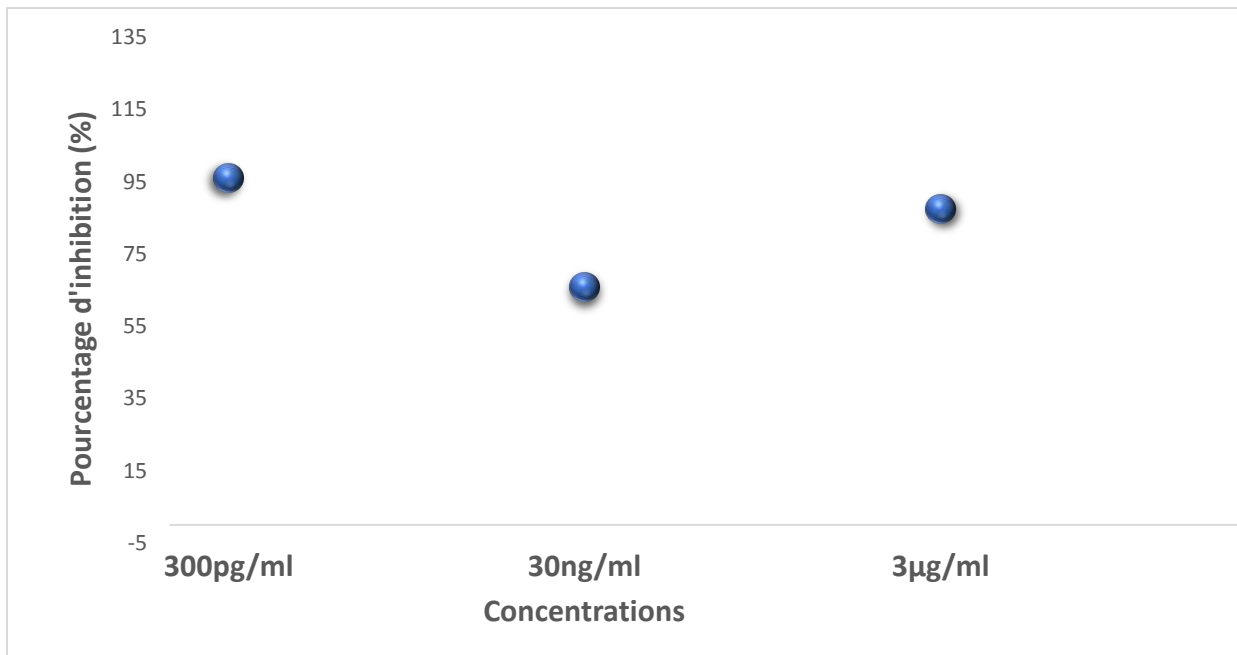


Figure 19 : Taux d'inhibition de la dénaturation protéique par les cito-flavonoïdes

Les résultats de la figure 19 montre que l'effet anti-dénaturant des cito-flavonoïdes est le plus important (96,05%) pour la concentration la plus faible (300 pg/ml).

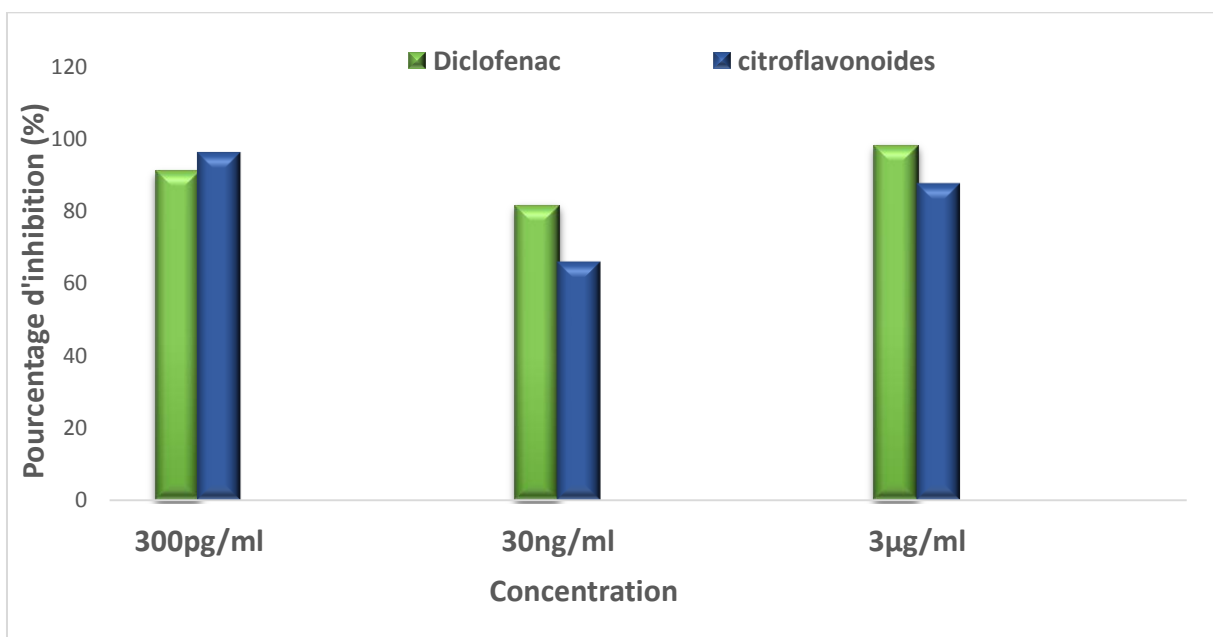


Figure 20 : Comparaison de taux d'inhibition de la dénaturation protéique entre le diclofénac et les cito-flavonoïdes.

La figure 20 montre que l'extrait exerce un effet anti-dénaturant supérieur comparé au diclofenac pour la concentration (300 pg/ml),

4-Piégeage du radical libre DPPH° :

Fraction résiduelle du DPPH°(DPPH°res) en fonction du temps :

Les résultats sont représentés dans la figure 21 :

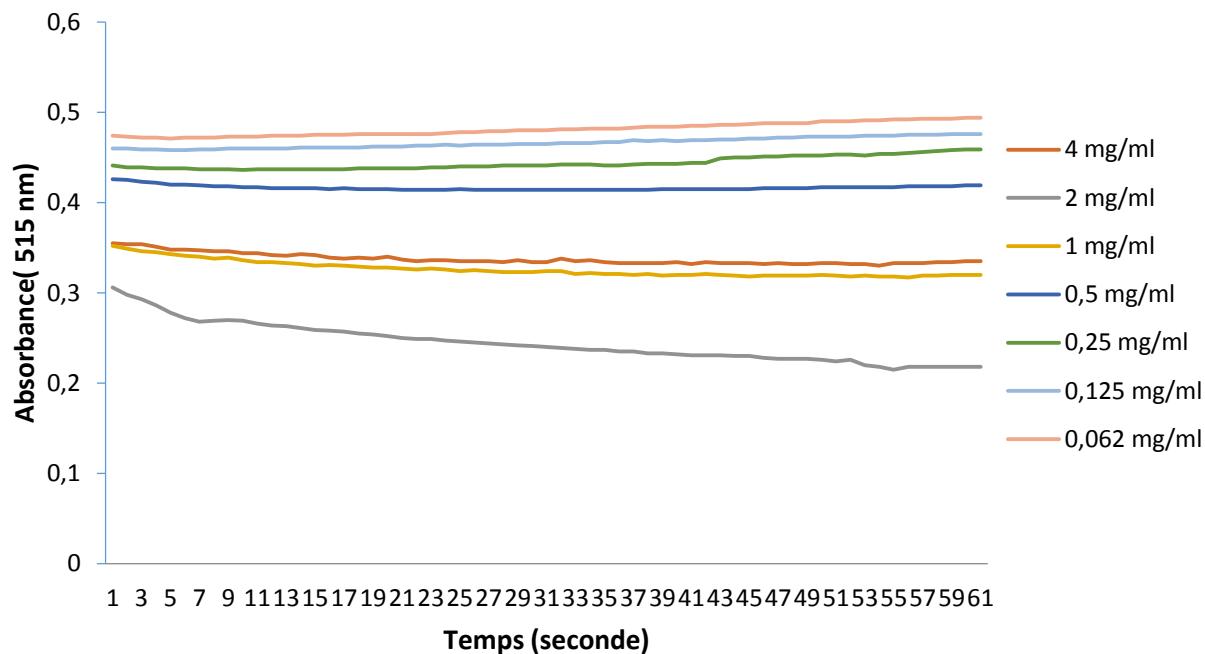


Figure 21 : Absorbance des différentes concentrations des citro-flavonoïdes en fonction du temps.

D'après les résultats représentés de la figure 21 ;le meilleur pouvoir anti-radicalaire étudié au cours du temps est observé pour la concentration de 2 mg/ml.

Discussion

Les citroflavonoïdes sont des composés bioactifs ayant de multiples propriétés biologiques : anti-inflammatoires, anti-hémolytiques, anti-oxydantes, anti-radicalaires.....ect .L'activité antioxydante de ces composés est due au piégeage des radicaux libres et l'inhibition des enzymes génératrices de radicaux libres comme la xanthine oxydase. L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres et la neutralisation d'enzymes oxydantes mais elle se manifeste aussi par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (**Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001 ; Kim et al., 2004**)

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

Le test de cytotoxicité est un test *in vitro* qui permet d'évaluer la toxicité des extraits, vis-à-vis, des GRH. Ces cellules constituent un modèle biologique de choix pour l'étude *in vitro* grâce à la facilité d'isolement des GRH mais aussi la grande similitude de leurs membranes avec d'autres membranes plasmiques (**Robertis et al., 1995**).

Nos résultats montrent que les citroflavonoïdes sont les moins toxiques à de faibles concentrations (35 µg/ml) avec un taux de toxicité de 56,61 %. Cette toxicité augmente pour atteindre un taux de toxicité maximum (97,59%) à la concentration 250 µg/ml. Comparé à l'acide gallique les citro-flavonoïdes présentent une moindre toxicité pour les concentrations (35, 75 et 125) µg/ml. D'autre part, à la concentration la plus élevée 2000 µg/ml d'extrait la toxicité est aussi diminuée (57,67%). A cette concentration les citro-flavonoïdes présentent un taux d'hémolyse inférieur au contrôle négatif.

La toxicité des flavonoïdes peut être attribuée à leur action mutagène, pro-oxydante, et génératrice des radicaux libres. D'après **Galati et al (2002)** ; les flavonoïdes sont impliqués dans l'oxydation de l'hémoglobine, la perturbation de la structure membranaire et donc l'hémolyse des érythrocytes, en raison d'effets pro-oxydants. Les flavonoïdes sont toxiques vis-à-vis des cellules cancéreuses mais ne sont pas toxiques ou moins toxiques à l'encontre des cellules normales (**Knekt et al., 1997**).

L'étude de l'activité anti-hémolytique *in vitro*, a été réalisée, en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des GRH. L'évaluation de la stabilité membranaire a été déterminée après un traitement par la chaleur et l'hypotonie qui provoquent l'hémolyse. La mesure de la libération d'hémoglobine est ensuite réalisée à 560 nm pour les différentes concentrations des citro-flavonoïdes en les comparant à des molécules des référence ; l'acide gallique, le diclofinac sodique. Ce dernier est considéré comme étant un médicament anti-inflammatoire.

La perméabilité membranaire permet le mouvement des ions : Na⁺ et H₂O (entré) et K⁺ qui sortent. L'hypotonie provoque un déséquilibre entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, selon le gradient de concentration. L'eau pénètre dans les globules rouges, la membrane des hématies devient inélastique se gonflent et deviennent sphériques 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).

En plus de l'hypotonie, les érythrocytes exposés à des températures élevées, changent leur morphologie et perdent leur capacité à résister à l'hémolyse en perturbant leurs membranes plasmiques (Shinde *et al.*, 1999 ; Veal *et al.*, 2011).

Concernant l'étude de l'effet protecteur contre la lyse membranaire induite par la chaleur et l'hypotonie, nos résultats montrent que les citroflavonoïdes exercent une activité de protection contre la lyse de la membrane érythrocytaire la plus élevée (75,31%) concentration minimale de 15 µg/ml. Cette protection diminue ensuite avec l'augmentation des concentrations de l'extrait pour atteindre une protection minimale (11,90%) à la concentration de 150 µg/ml. A la concentration 300 µg/ml, il est remarqué une augmentation de la protection de la lyse érythrocytaire (19,86 %). Comparé à l'acide gallique, l'extrait possède une moindre protection de la membrane érythrocytaire à la concentration 15 µg/ml. A l'inverse pour toutes les autres concentrations (30, 75, 150 et 300) µg/ml l'extrait montre une meilleure protection de la lyse érythrocytaire comparé à l'acide gallique.

D'après **Thomas (2013)**, l'hémolyse est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouge par des agents hémolytiques (température et/ou hypotonie). De nombreuses études ont prouvé l'efficacité des extraits de végétaux vis à vis de l'hémolyse (**Devjani et Barkha, 2011 ; Tay-Yaba, 2016 ; Belkhir, 2017**).

Les citro- flavonoïdes peuvent maintenir l'intégrité de la membrane des globules rouges en la stabilisant lors d'un choc osmotique. Aussi lors d'un stress oxydatif, l'emplacement de ces composés dans la partie hydrophile de la membrane semble constituer un bouclier de protection de la cellule contre les substances toxiques en particulier les formes réactives de l'oxygène (**Chaudhuri et al ., 2007**).

Parmi les molécules utilisées avec l'acide gallique comme molécule de référence, le diclofénac est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien très efficace pour l'inhibition d'hémolyse. **Ce composé** présente la capacité de former une liaison hydrogène avec les molécules d'eau ou le groupe de tête des phospholipides lui-même ce qui modifie l'affinité de la membrane pour l'eau et l'empaquetage des bicouches lipidiques et modifier leurs propriétés électrostatiques. Comparé au diclofenac l'extrait possède une meilleure action de protection de la lyse érythrocytaire et ce pour toutes les concentrations étudiées (**Moreno et al., 2009 ; Chippada, 2011 ;Rani et al., 2014**)

Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro*, le model de la dénaturation de l'albumine a été choisi dans cette étude. Le principe pour cette méthode est basé sur la capacité de ces composants à réduire la dénaturation thermique de la BSA (**Bouhlali et a.l, 2016**).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait a une activité protectrice considérable contre la dénaturation thermique de l'albumine, l'effet anti-dénaturant des extraits est le plus important où le meilleurs taux de protection est **96,05%** pour la concentration la plus faible (300 pg/ml). Comparé au diclofenac qui est utilisé comme standard pour comparer son activité anti-inflammatoire, l'extrait possède une meilleure protection (**96,05%**) à la concentration (**300 pg/ml**). Ces résultats nous permettent de supposer que l'extrait à un pouvoir protecteur supérieur au diclofénac à de faible concentration. Ce pouvoir anti-inflammatoire est due à la richesse des composés bioactifs qui sont les citro-flavonoïdes (**Amezouar et al., 2013**)

Concernant l'inflammation, il est connu que la dénaturation des protéines en est la cause. 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 (**Anitha rani *et al.*, 2014 ; Marliyah et Ananthi, 2015**).

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

Les flavonoïdes ont une activité anti-oxydante, il peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition et par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des ROS comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (**Tahrouche *et al.*, 2000 ; Bartosikova *et al.*, 2003**).

Pour l'étude de l'activité anti-radicalaire en utilise la méthode de DPPH (Diphényl-picrylhydrazyle) qui donne naissance à un radicale stable possédant une couleur violette en solution et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un anti oxydant. En effet, son passage la forme non radicalaire après saturation de ces couches électroniques s'accompagne de la disparition de la coloration violette. Ce changement de coloration set suivi par spectrométrie à 517nm (**Atsumi *et al.*,1999 ; Koleva *et al.*.,2002 ; Acuna *et al.*.,2002**).

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 .D'après les résultats obtenus, le meilleur pouvoir anti-radicalaire étudié au cours du temps est observé pour la concentration de 2 mg/ml (**Hebi & Eddouks, 2015**).

Conclusion

L'écorce de la clémentine est très riche en molécules bioactives principalement les acides phénoliques et les flavonoïdes ces derniers peuvent avoir un intérêt biologique dans différents domaines.

Dans ce travail, on s'est intéressé à l'étude *in vitro* de l'activité anti-hémolytique, anti-inflammatoire et antioxydant des Citro-flavonoïdes de l'écorce de la clémentine extraite par le n-butanol.

Le test de cytotoxicité nous a permis de déduire que l'extrait peut exercer un effet cytotoxique à forte concentration. La concentration de 15 µg/ml de l'extrait présente le meilleur effet anti-hémolytique (85,89%).

L'effet anti-inflammatoire de l'extrait est maximal à la concentration de **300 pg/ml**.

Le meilleur pouvoir anti-radicalaire étudié au cours du temps est observé pour la concentration **de 2 mg/ml**

Ceci nous ramène à dire que les citro-flavonoïdes ont un pouvoir anti-hémolytique, anti-inflammatoire, et antioxydant significatif à des concentrations bien déterminées. 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.

A partir de ces résultats il est possible d'utiliser l'écorce de la clémentine dans différents domaines : médicinale agroindustriel et cosmétique, au lieu de les jeter comme des déchets.

Nous souhaitons que ce travail ouvre des perspectives pour d'autres études plus approfondies afin de :

*Déterminer et purifier les molécules bioactives responsables des activités biologiques contenants dans l'écorce de la clémentine, en montrant leur mécanisme et leur mode d'action.

*Réaliser des tests *in vivo* pour étudier la toxicité des citro-flavonoïdes de l'écorce de la clémentine afin de vérifier les propriétés biologiques de leurs différents composants.

Références bibliographiques

A

Acuna, B. D., Eliassen, J. C., Donoghue, J. P., & Sanes, J. N., 2002. Frontal and parietal lobe activation during transitive inference in humans. *Cerebral Cortex*, 12(12), 1312-1321.

Agostini, G., Frank, U. E., Materne, T. F., & Visel, F., 1996. U.S. Patent No. 5,580,919. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Amic' et al., 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in food plants. *Mut. Res*, 9(20): 523 - 524.

Albagnac., 2002. Technologie de transformation des fruits , Lavoisier, Paris, 302-304 .

Amezouar, F., Badri, W., Hsaine, M., Bourhim, N., & Fougrach, H., 2013. Evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activities of *Erica arborea* L. from Morocco. *Pathology biology* , 61 (6), 254-258.

Anderson., 2001. « A hydroxychalcone derived from cinnamom functions as a mimetic for insulin in 3T3-L1 adipocytes », vol 20, n°4, p327-36.

Anitha Rani, A. A., Punitha, S. M. J., & Rema, M., 2014. Anti-inflammatory activity of flower extract of *cassia auriculata*—an in-vitro study. *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.*, 4, 57-60.

Atsumi T., Iwakura I., Kashiwagi Y., Fujisawa S., Ueha T., 1999. Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. *Antioxid. Redox Sign.*, 1, 537-546.

B

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., ... & Pinkas, M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086.

Bamforth et Bruneton., 1999. « Beer haze. », dans *journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol.57, n°81-90.

Bara M, Guet-Bara A., 1993. Magnésium et cancer, *Médecine et nutrition* T. XXIX ; 75-78.

Bartošíková, L., Nečas, J., Suchý, V., Kubinova, R., Vesela, D., Beneš, L., ... & Bartošová, L., 2003. Monitoring of antioxidative effect of morine in alloxan-induced diabetes mellitus in the laboratory rat. *Acta Veterinaria Brno*, 72(2), 191-200.

Belkhiri F., Baghiani A., Zerroug M. et Arrar L.,2017. Investigation of antihemolytic, xanthine oxydase inhibition, antioxidant and antimicrobial properties of *Salvia verbenaca* L. aerial part extracts.*African Journal of traditional, complementary and alternative medicine*;14 (2) : 273–281.

Bennici et al .,2010.Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of citrus sinensis and citrus limon : evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora* .199,464-475.

Benzie, I. F., & Strain, J. J.,1996.The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

Berthod et al., 1999. Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation.l.analysis.*Analisis*, 27,750-757.

Beta et al., 2005.Phenolic content and antixydants Activity of Pearledwheat and Roller-Milled . Fraction. *Cereal Chem*, 82 (4) : 390-393.

Birt DF,Schull JD , Yaktine AL., 1999.Chemoprevention of cancer . Modern nutrition in health and diseaes Ninth edition, Baltimore :1263-1325.

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.

Bougnoux P.,1999 . polyinsaturated fatty acids and cancer, Lippincott Williams&Wilkins ; 121-125.

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

Bruneton J., 1999.Pharmacognosie, phytochimie, Plantes médicinales, 3^e édition, Edition Lavoisier TEC et DOC.pp56-66.

Bruneton.,2009.Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales,4^e, éd .,revue et augmentée, Paris,Tec&Doc-éditions médicales internationales ,1288p.

B Sultana et F Anwar.,2008. « Flavonols(kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits ,vegetables and medicinal plants »,dans food chemistry vol. 108,n°3,p.879-884.

Bulmus, V., Woodward, M., Lin, 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.

Burt, S.,2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

Butje ,Schermelleh, L., Carlton, P. M., Haase, S., Shao, L., Winoto, L., Kner, P., ... & Leonhardt, H.,2008. Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science*, 320(5881), 1332-1336.

C

Cao G et Prior RL .,1998. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. :68(5):1081-1087. 41

Cao G, Prior RL.,1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum :44(6 Pt 1):1309-1315. 42.

Cao G et Prior RL .,1998. Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants.

Cermak R, Wolfram S., 2006 .« The potential of flavonoïds to influence drug metabolism and pharmacokintics by local gastrointestinal mechanisms » ,dans *Curr.Drug Metab.*,vol.7,n°7,p.729-44.

Chahidi, B., El-Otmani, M., Jacquemond, C., Tijane, M. H., El-Mousadik, A., Srairi, I., & Luro, F.,2008. Utilisation de caractères morphologiques, physiologiques et de marqueurs moléculaires pour l'évaluation de la diversité génétique de trois cultivars de clémentinier. *Comptes Rendus Biologies*, 331(1), 1-12.

Chaudhry et al., 1995.Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids , sulindac and indomethacin. *Biochem pharmacol.* 1983 32 : 1995.

Chaudhuri S., Banerjee A., Basu K., Sengupta B. et Sengupta P.K .,2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*; 41(1), 42-48.

Cheyrier et al.,2006. BEN AHMED, I. K. R. A. M. *Activité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique et ses fraction des racines de l'Arbutus unedo* (Doctoral dissertation).

Chippada, S. C., Volluri, S. S., Bammidi, S. R., et Vangalapati, M ., 2011. In vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centellaasiatica* by HRBC membrane stabilisation. *Rasayan J Chem*, 4(2), 457-460.

Chithan ,Kandaswami, C., Perkins, E., Soloniuk, D. S., Drzewiecki, G., & Middleton Jr, E.,1993. Ascorbic acid-enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro. *Anti-cancer drugs*, 4(1), 91-96.

Coll et Pellegrini ., 2003: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.

Coll et Phipps.,2007 . Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements. *Pharmacopeial Forum*. 2007; 33:810-814.

Cotelle N.,2001.Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr.Top*.Page: 569-590.

CQVB.,2008 Centre québécois de valorisation des biotechnologies (CQVB). Récentes techniques pour mesurer la capacité antioxydante: impact sur la sante. [recentes-techniques-pour-mesurer-la-capacite-antioxydante-impact-sur-la-sante-btd-08-3.asp](http://www.cqvb.org/techniques-pour-mesurer-la-capacite-antioxydante-impact-sur-la-sante-btd-08-3.asp).

Cowan.,1999.Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbial agents. Clin.Microbiol.Rev.*,12, 564-582.

D

Dev&Milind.,2012. Orange : Range of Benefits .

Devjani et Barkha, Nirmala, J. G., & Narendhirakannan, R. T. ,2011.In vitro antioxidant and antimicrobial activities of grapes (*Vitis vinifera* L) seed and skin extracts–Muscat variety. *Int J Pharm Pharm Sci*, 3(4), 242-249.

E

Esselen, M., Fritz, J., Hutter, M., & Marko, D.,2009. Delphinidin modulates the DNA-damaging properties of topoisomerase II poisons. *Chemical research in toxicology*, 22(3),

F

FAO., 2013 .Citrus Fruit Fresh and Processed Annual Statistics, 2006, pp. 1–47.

François-nesmi.,2010.Identification des polyphénols , évaluation de leur activité antioxydants étude de leurs propriétés biologiques .

Fuhrman B, LavyA, Aviram M.,1995.Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation.Page:549-554.

G

Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J. X., & O'Brien, P. J.,2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*, 177(1), 91-104.

H

Halliwell B.,1994. Free radicals and antioxidants. Page: 253-265.

Harbone,1993.Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed ; Academic Press : London.

Harborne.J.B.,1994.phytochemical dictionary of the leguminosae, vol.1,chapman and hall, London 1994,pp.

Haslam et al.,1994 .Plant polyphenols (vegetable tannins) : gallic acid métabolism.

Heim et al .,2002 .Flvonoides antioxydants :Chemistry, Metabolism and structure-Activity Relationships, Journal of Nutritional Biochemistry.(13) :572-584.

Hennebelle et al., 2004.Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif.Phytothérapie. (1) : 3-6.

Chapot, H.,1963. Clementines with or without seeds.

Hertog et al.,1993.Antioxydant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen Elderly Study. Lancet. 1993 342 : 1007-1011.

Huet.,1991 .Les huiles essentielles d'agrumes . Fruits ,4,551-576.

I

Ignat et al.,2011. Un examen critique des méthodes de caractérisation des composés polyphénoliques dans les fruits et légumes. 126: 1821-1835.

J

Jovanovic et al,1997. Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal*, 7: 137-161.

K

* **Kalavani, R., Banu, R. S., Jeyanthi, K. A., Sankari, T. U., &Kanna, A. V.,2016.** Evaluation of anti-inflammatory and antibacterial activity of *Pithecellobium dulce* (Benth) extract.2(4), 148-154.

Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., 1999. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation. *Anticancer Research*. 19, 1261-1269

Kim HP, Son KH, Chang HW and Kuang SS 1996. Flavonoids: Potential anti-inflammatory agents. *Nat Prod Sci*, 2(1), 1-8.

Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, et al .,1997.Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 146: 223-30

***Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N.,2002.** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(1), 8-17.

L

La louin., 2014 .Travaux récents sur les tourbillons cellulaires et les tourbillons en bandes. Applications à l'astrophysique et à la météorologie.

Luro F.,Jacquemond C.et Curk F.,2013.La clémentine dans la diversité génétique des agrumes.

M

Macheix et al., 2005.Les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques).Edition techniques et documentation , Lavoisier .

Macheix.,2005.Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.PPUR presses polytechnique.134.

Manthey JM .,2000. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc*, 7, 28-34.

Marliyah, M., & Ananthi, T.,2015. In-vitro anti-inflammatory activity of seed extract of *Zea mays* (L.). 4 (5), 2168-73.

Middleton E JR, Kandaswami C and Heoradies TC ,2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, 52, 673-751.

Miller et al ,1993. statut Antioxydant total; Lot 21440, Randox Laboratories, Lakewood, Californie

Miller ,Losseff, N. A., Wang, L., Lai, H. M., Yoo, D. S., Gawne-Cain, M. L., McDonald, W. I., ... & Thompson, A. J. ,1996. Progressive cerebral atrophy in multiple sclerosis A serial MRI study. *Brain*, 119(6), 2009-2019.

Moreno, M. M., Garidel, P., Suwalsky, M., Howe, J., et Brandenburg, K.,2009. The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: a physicochemical study with lecithin phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)Biomembranes*, 1788(6), 1296-1303.

Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., & De Tommasi, N. ,2005. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food chemistry*, 92(2), 349-355.

Mouly P. P., Arzouyan C. R., Gaydo, E. M., Estienne J. M., 1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 70-79.

Moulay, D., Aziz-Alaoui, M. A., & Kwon, H. D.,2012. Optimal control of chikungunya disease: larvae reduction, treatment and prevention. *Mathematical Biosciences & Engineering*, 9(2), 369.

N

Nagendaran.,2006.Phénolic compounds in plants and agriindustrial by-products : Antioxydant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*.(99) :191-203.

O

Oyedapo, O. 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

Praloran.,1971.La clémentine plaquette pour le cinquantenaire de l'INRA, Centre de Corse.

Prior et coll., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.

R

Ramful et al .,2010.Bioactive phenolic and antioxydant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits : Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*. 278 ,75-87.

Rani, A. A., Punitha, S. M. J., & Rema, M. (2014). anti-inflammatory activity of flower extract of cassia auriculata—an in-vitro study. *int. res. j. pharm. appl. sci.*, 4, 57-60.

Medić-Šarić, M., Rastija, V., Bojić, M., & Maleš, Ž.,2009. From functional food to medicinal product: systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutrition Journal*, 8(1), 33.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G.,1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C.,1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Robertis F A, Robertis E M H.,1995. Cell and molecular biology, London, UK Saunders, 239-45.

Robardset al.,1999 .Composés phénoliques et leur rôle dans les processus oxydatifs dans les fruits . *Food Chem .(66)* : 401-436.

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.

Sarni-Manchado et Cheynier.,2006.Composés phénoliques dans la plantes –structure, biosynthèse, répartition et rôle. « les polyphénols en agroalimentaires ». Edition Lavoisier . Paris .P1-27.

Seeman, P.,1967. Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin. *The Journal of cell biology*, 32(1), 55-70.

Shinde, U. A., Phadke, A. S., Nair, A. M., Mungantiwar, A. A., Dikshit, V. J., & Saraf, M. N.,1999. Membrane stabilizing activity—a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrusdeodara wood oil. *Fitoterapia*, 70(3),251-257.

Skibola C.F. and Smith M.T.,2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and medicine*, 29(3-4): 375–383.

Stafford.H.A,1997.Role of flavonoïds in symbiol and defuse functions in legume roots,Bot.rev(1997)63 27-39.

Kim, D. k., Lee, C.Y.,2004. Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 253–273.

Sultana, B., & Anwar, F.,2008. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*, 108(3), 879-884.

T

Tahrouch, S., Andary, C., Rapior, S., Mondolot, L., Gargadennec, A., & Fruchier, A., 2000. Polyphenol investigation of *Argania spinosa* (Sapotaceae) endemic tree from Morocco. *Acta botanica gallica*, 147(3), 225-232.

Tay-Yaba, Aberrane, S., & Mehalla, M.,2019. Etude de l'activité anti-inflammatoire et antihémolytique de l'extrait aqueux de feuilles de *Malva sylvestris* L .

THOMAS L.,2013. Haemolysis as influence and interference factor .

U

Urquiaga et Leighton., 2000.Plant polyphenol antioxydants and oxydative stress. *Biological research*.33(2) : 55-64.

USDA,2007 : Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods.

V

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

Veale, M. F., Healey, G., & Sparrow, R. L., 2011. Effect of additive solutions on red blood cell (RBC) membrane properties of stored RBCs prepared from whole blood held for 24 hours at room temperature. *Transfusion*, 51(s1).

Vincent Rodier , 1829-1904.L'origine des agrumes : leur évolution et la naissance des espèces cultivées .Jardine de France. 2015,pp,35-37.(02641678).

W

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

Yu, S., Tracy, T. F., Aouthmany, M. M., Llanos, A., Brown, M. B., ... & Cox, J.,2005. Parenteral nutrition–associated cholestasis in neonates: multivariate analysis of the potential protective effect of taurine. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 29(5), 337-344.