

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche Scientifique
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID-TLEMEN
Faculté des sciences de la nature et de la vie,
Des sciences de la terre et de l'univers
Département de biologie
Laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition
Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie
Option : Physiologie cellulaire et Physiopathologie

Thème :

Impact des polyphénols, des citroflavonoïdes et des tanins de l'écorce de la clémentine sur les érythrocytes

Présenté par

Melle. BOUANANI Nihel & Melle. BENSAOULA Lamia

Devant le jury composé de :

Présidente : Melle Karaouzene Nesrine Maitre de conférences Université de Tlemcen

Examineur : Mme Boudghene Stambouli Amina Maitre de conférences Université de Tlemcen

Promotrice : Mme Bekhti Sari Fadia Maitre de conférences Université de Tlemcen

Année universitaire : 2020-2021

Remerciements

Tout d'abord on remercie Dieu le tout miséricordieux, le tout puissant qui nous a honoré d'être parmi ceux qui savent lire et écrire, qui a guidé nos pas sur le chemin de la science, qui nous avoir accordé la force, le courage et la patience et qui nous a aidé à réaliser ce travail.

*Nous tenons à exprimer notre reconnaissance, notre haute considération et notre profond respect à notre encadreur, **Mme Bekhti Fadia**, maitre de conférences au département de biologie, faculté SNV et STU, Université Abou bakr Belkaid Tlemcen, qui nous a guidé et encouragé au cours de ce travail, également pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.*

*Nous tenons à témoigner toute notre gratitude à **Melle Karaouzene Nesrine**, maitre de conférences au département de biologie, faculté SNV et STU, Université Abou bakr Belkaid Tlemcen, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de mémoire. Nous lui en suis l'expression de nos profonds respects.*

*Il est pour nous un honneur de remercier **Mme Boudghene Stambouli Amina**, maitre de conférences au département de biologie, faculté SNV et STU, Université Abou bakr Belkaid Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner notre travail. Nous lui en suis très reconnaissante de même que pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail.*

A tous nos collègues de promotion Physiologie cellulaires et physiopathologies

Enfin nous remercions toute personne ayant contribué de prêt ou de loin dans l'élaboration de ce travail.

Bouanani Nihel et Bensaoula Lamia

Dédicace

*A mes chers parents, **Siham et Abdelhakim,***

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai guère vous exprimer comme il se doit. Votre affection me comble, votre bienveillance me guide, et votre présence quotidienne à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les obstacles de la vie. Je vous remercie pour votre dévouement, vos sacrifices, vous m'avez tant épaulé avec amour, et vous continuez à le faire chaque jour.

A mon cher frère Adel,

Je te remercie pour ton encouragement et ton soutien tout au long de mon cursus, comme tu le fais à chaque étape de ma vie. Je n'oublierai point tes précieux conseils. Je prie dieu qu'il te donnera la force pour réussir. Nos différences ne sont pas si importantes au fond, nous sommes toujours, à nous deux, une famille.

A ma chère grand-mère Aicha,

Tu es une femme spéciale, qui a impacté ma vie, avec ta gentillesse, ta générosité et ta tendresse. Les mots ne pourront exprimer l'amour que je ressens pour toi. Tu as toujours été à mes côtés, à m'encourager, à m'a comblé avec tout ce que tu pouvais me donner. Que dieu te garde pour nous.

A ma chère amie Nihel,

Je voudrai tout d'abord te remercier de m'avoir accompagné tout au long de cet épreuve, tu as été ma source de patience et de détermination depuis le début de ce projet jusqu'à sa fin. Tu n'as pas été seulement mon binôme, mais ma sœur bien aimée et tu le seras toujours. Au nom de tous les souvenirs inoubliables qu'on a vécu, tu es le symbole de la pure amitié, mon amour pour toi est sans limite.

A mon cher professeur Madouni Mourad,

La passion pour votre travail est contagieuse ! Vous êtes le professeur qui a réussi à m'inspirer. J'apprécie grandement votre soutien, votre bienveillance et votre engagement à mes côtés. Vous continuerez à enrichir mes connaissances, à partager votre savoir. Que dieu vous donne la force de continuer d'être la lumière profuse que vous êtes.

A toute l'équipe CFTI, qui a contribué à ma réussite, qui m'a tant appris en peu de temps, je vous remercie pour tout ce que vous faites.

Lamia ...

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

*A mes très chers parents **Nawel et Abdenour**;*

Pour leur amour, Leur tendresse, Leurs sacrifices, Et pour leur soutien moral et matériel, qui ont toujours été un modèle de labeur et de persévérance;

***Ma mère** : Aucun dédicace ne serait exprimer respect, mon amour éternel et ma considération pour tout les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.*

Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me portes depuis mon enfance et j'espère que ton bénédiction m'accompagne toujours.

***Mon père** : A celui qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. Un grand merci pour toi car c'est grâce a ton soutien que j'ai pu terminer ce travail et mes études, tu été toujours avec moi et tu seras toujours là pour moi, avec mes vœux que tu sois toujours fière de moi.*

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, vous trouverez dans ce travail toute ma reconnaissance et mon amour. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

***A mon cher petit frère Zakariya** : A tous les moments passés avec toi mon frère, en gage de ma profonde estime pour l'aide que tu m'as apporté. Tu m'as soutenu, réconforté et encouragé. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.*

***Mes grand parents Abdelkader, Ahmed et Lammaria** : Ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.*

A ma famille, mes proches et à ce qui me donnent de l'amour et de la vivacité

***A ma chère Lamia** : Merci énormément pour ton soutien plus que précieux, Merci pour ton grand cœur toutes vos qualités qui seraient trop longues à énumérer. Ma vie ne serait pas aussi magique sans ta présence et ton amour.*

***A mes chères amies Téma, Loubna et Amina** qui ont été toujours là pour moi, qui m'ont toujours encouragé, je vous souhaite plus de succès. C'était un grand plaisir de vous rencontré, je vous aime très fort.*

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

Nihel...

Table des matières

Table des matières	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

Introduction	1
---------------------------	----------

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : La clémentine	3
---	----------

1.1. Généralités sur la clémentine :	3
1.2. Historique de la clémentine :	4
1.3. Origine génétique de la clémentine :	4
1.4. Développement et diversification :	5
1.6. Description morphologique d'un fruit de clémentine :	7
1.7. Variétés de clémentine :	8
1.8. Composition chimique et valeur nutritionnelle de la clémentine :	8
1.9. Bienfaits de la clémentine :	10

Chapitre 2 : Polyphénols	11
---------------------------------------	-----------

2.1. Présentation générale sur les polyphénols :	11
2.2. Domaines d'utilisation des polyphénols :	11
2.3. Principaux composés phénoliques des écorces des agrumes :	12
2.4. Structure des polyphénols :	12
2.5. Classification des polyphénols :	13

Chapitre 3 : Le sang, l'érythrocyte et l'hémolyse sanguine	24
---	-----------

3.1. Le sang.....	24
3.2. L'érythrocytes :	25
3.3. L'hémolyse sanguine	27

Partie 2 : Matériel et méthodes

1. Préparation du matériel végétal :.....	32
--	-----------

1.1. Prétraitement :	32
1.2. Délipidation (dégraissage) :	33

2. Extraction des polyphénols totaux :.....	34
--	-----------

3. Extraction des citroflavonoïdes :.....	34
--	-----------

4. Extraction des tanins :	34
5. Préparation de la suspension des érythrocytes :	34
6. Test de cytotoxicité :	35
6.1. Principe :.....	35
6.2. Mode opératoire :.....	35
7. Test d'hémolyse :	36
7.1. Principe :.....	36
7.2. Mode opératoire :.....	36

Partie 3 : Résultats et interprétations

1. Test de cytotoxicité :	38
1.1. Polyphénols totaux :.....	38
1.2. Citroflavonoïdes :.....	39
1.3. Tanins :.....	41
2. Test d'hémolyse :	42
2.1. Polyphénols totaux :.....	42
2.2. Citroflavonoïdes :.....	44
2.3. Tanins :.....	46

Partie 4 : Discussion et Conclusion générale

Discussion.....	50
Conclusion.....	54
Références.....	57
Résumé.....	Error! Bookmark not defined.
Abstract.....	Error! Bookmark not defined.
الملخص.....	Error! Bookmark not defined.

Liste des tableaux

Tableau 1: Taxonomie de Clémentine	5
Tableau 2: Description botanique du clémentinier.	6
Tableau 3: Composition chimique et valeur nutritionnelle de la clémentine.	9
Tableau 4: Les principales classes de flavonoïdes.	17
Tableau 5: Propriétés fonctionnelles et domaines d'utilisation des composés phénoliques des écorces d'agrumes.	21

Liste des figures

Figure 1: Fruit de clémentine	3
Figure 2: Période de récolte de la clémentine.	3
Figure 3: Un clémentinier et sa fleur	6
Figure 4: Un clémentinier	7
Figure 5: Coupe transversale de clémentine	8
Figure 6: structure du noyau phénolique	12
Figure 7: Diagramme de classification des polyphénols	13
Figure 8: Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques et quelques dérivés	14
Figure 9: Structure chimiques des acides hydroxycinnamiques et quelques dérivés.....	15
Figure 10: Structure de base des flavonoïdes	16
Figure 11: Structure de base des Citroflavonoïdes.....	19
Figure 12: Structure de base des tanins hydrolysables.....	22
Figure 13: Structure de base des tanins condensés.	23
Figure 14: Les constituants du sang	24
Figure 15: Structure de la substance précurseur des globules rouges.	25
Figure 16: Schéma et structure de base d'Hémoglobine	27
Figure 17: Prélèvements hémolysés	27
Figure 18: L'écorce de Clémentine en poudre.....	32
Figure 19: Extracteur de Soxhlet.....	33
Figure 20: Préparation de la suspension des érythrocytes	35
Figure 21: Test de cytotoxicité d'extrait de polyphénols, citroflavonoïdes et tanins	36

Figure 22: Effets des différentes concentrations des polyphénols sur la toxicité des globules rouges.....	38
Figure 23: Comparaison des différentes concentrations en acide gallique et polyphénols sur la cytotoxicité des globules rouges.	39
Figure 24: Effet des différentes concentrations des citroflavonoïdes sur la cytotoxicité des globules rouges.....	40
Figure 25: Comparaison des différentes concentrations en acides gallique et citroflavonoïdes sur la toxicité des globules rouges.....	40
Figure 26: Effet des différentes concentrations de tanins sur la cytotoxicité des globules rouges.....	41
Figure 27: Comparaison des différentes concentrations en acide gallique et tanins sur la cytotoxicité des globules rouges.	42
Figure 28: Effet des différentes concentrations des polyphénols sur le taux d'hémolyse.	43
Figure 29: Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et polyphénols.	43
Figure 30: Comparaison du taux d'hémolyse entre diclofénac et les polyphénols.	44
Figure 31: Effet des différentes concentrations des citroflavonoïdes sur le taux d'hémolyse.	45
Figure 32: Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et les citroflavonoïdes. ...	45
Figure 33: Effet des différentes concentrations des tanins sur le taux d'hémolyse.	46
Figure 34: Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et les tanins.....	47
Figure 35: Comparaison de taux d'hémolyse entre le diclofénac et tanins.	47
Figure 36: Comparaison du taux d'hémolyse entre le diclofénac, l'acide gallique et les tanins.....	48

Liste des abréviations

% : Pourcentage

< : Inférieur

> : Supérieur

µg : microgramme

AG : Acide gras

BHA : Butylhydroxyansol

BHT : Butylhydroxytoluène

Bio : Aliment biologique

Cal : Calories

C° : degré Celsius

C₃ : Carbone 3

C₆ : Carbone 6

E.coli : Escherichia coli

Fl : flavonoïdes

g: gramme

GR : Globule rouge

H: heure

HCA : Hydroxycinnamiques

Kcals: kilocalories

KJ: kilojoules

LDL: Low Density Lipoprotein

Max: Maximum

mg: milligramme

Min : Minimum

ml : millilitre

mm : millimètre

N° : numéro

NaCl : Chlorure de sodium

nm: nanomètre

OH : Groupe Hydroxyle

Ph : Unité de mesure d'acidité

U.V : Rayonnement ultraviolet

V : Volume « Unité permettant d'exprimer la grandeur d'un volume mesure en mètre cube dans le Système international d'unités»

Vit C : Vitamine E ou Acide ascorbique

Vit E : Vitamine E ou Tocophérol

Vit B12 : Vitamine B12 ou Cobalamine

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

VNC: Valeur nette comptable

VNR : Valeurs Nutritionnelles de Références

(V/V): Volume / Volume « Unité permettant d'exprimer la grandeur d'un volume mesure en mètre cube dans le Système international d'unités»



Introduction

Introduction

On sait que la nature est sage, c'est pour cela que chaque hiver elle nous fournit des agrumes au moment exact où elles sont le plus nécessaires (*Mergelina, 2021*).

Les agrumes avec toutes ses espèces (la bergamote, la bigarade, le calamondin, le cidrat, le citron, la clémentine, le combava, la mandarine, le pamplemousse et le pomelo...) sont appréciés pour leurs saveurs, leurs parfums et les vertus médicinales qu'on leur prête. Leurs couleurs sont vives et joyeuses et nous mettent de bonne humeur en ponctuant certains moments de l'année (*Klein, 2021*).

Les oranges sont un fruit tropical, polyvalent et consommées quotidiennement dans le monde entier. Elles sont acidulées-sucrées et juteuses, ce qui en fait un fruit délicieux (*Mergelina, 2021*). Botaniquement connu sous le nom de *Citrus sinensis* et appartenant à la famille des Rutaceae. Les variétés d'oranges cultivées en Algérie sont assez nombreuses : Les variétés précoces, Thomson, Washington Navel, la Portugaise demi sanguine, l'orange d'été et Valencia late ... (*Zerhouni, 2008*).

Les oranges ont d'excellentes propriétés médicinales nécessaires pour lutter contre le froid et la fatigue et pour empêcher les rhumes, les calculs rénaux, l'artériosclérose, le cancer, les ulcères d'estomac, la réduction du taux de cholestérol et de l'hypertension, ce qui favorise la santé humaine (*Mergelina, 2021*).

Les écorces d'agrumes généralement et de la clémentine spécifiquement, constituent aussi un gisement riche en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques) (*Nouha, 2015*). Ils sont riches en composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes (citroflavonoïdes), des acides phénoliques et des tanins. Les flavonoïdes des écorces d'agrumes sont caractérisés par leur activité antioxydante, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne (*Bocco et al., 1998 ; Ma et al., 2009; Huang et al., 2010*). Les tanins chez l'homme ont des propriétés de blocage de la formation de l'endothéline, une molécule de signalisation qui produit la constriction des vaisseaux sanguins, ce qui réduirait le risque de maladie cardiaque (*Jean-François, et al., 2019*). Grâce à cette richesse, l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'agrumes a considérablement attiré l'intérêt scientifique pour les utiliser comme des antioxydants naturels, conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique (*Ramful, et al., 2010*).

L'objectif général de ce travail est de proposer un moyen de valorisation de l'écorce de la clémentine en tant que composé bioactif particulièrement les composés phénoliques. On s'est particulièrement intéressé à la clémentine, fruit d'origine algérienne dont sa valeur reste à découvrir.

Le but escompté est d'étudier l'activité anti-hémolytique des extraits de l'écorce de clémentine. Ceci afin de déterminer la concentration optimale des polyphénols, citroflavonoïdes et aussi les tanins qui permettent de protéger les globules rouges de l'hémolyse. Pour cela nous avons réalisé un test de cytotoxicité pour cibler les concentrations suivie par un test anti-hémolytique pour tester la capacité des extraits à empêcher l'hémolyse des globules rouge, induite par l'hypotonie et la chaleur.



Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : La clémentine

1.1. Généralités sur la clémentine :

La clémentine (*Citrus clementina*) est un fruit très savoureux et riche en vitamines. Fruit hybride de la mandarine et de l'orange. Il est facile à peler, pratiquement sans pépins, avec une chair sucrée et très juteuse. Son arbre est plus petit qu'un oranger, avec des branches minces et des feuilles pointues vert foncé (Mergelina, 2021). La vitamine C est présente dans tous les agrumes, mais surtout dans la clémentine, un puissant antioxydant naturel qui aide à de nombreux processus essentiels, tels que la synthèse de collagène, la cicatrisation des plaies, la défense antivirale; ils aident à prévenir le cancer, les maladies neurodégénératives et l'arthrite (Mergelina, 2021).



Figure 1: Fruit de clémentine (Fcafotodigital, 2020).



Figure 2: Période de récolte de la clémentine (Bionest, 2021).

1.2. Historique de la clémentine :

À Misserghin à la fin du XIX siècle, petit village situé à une vingtaine de kilomètres au sud-ouest d'Oran en Algérie, existait un orphelinat tenu par des pères du Saint-Esprit. Parmi eux, le frère Clément (Vincent Rodier, 1839-1904), directeur des cultures, s'intéressait particulièrement aux agrumes.

Selon des témoins de l'époque, c'est lors d'une visite du professeur Trabut à l'orphelinat avec le frère Clément, que les deux hommes auraient aperçu des enfants dégustant des fruits cueillis sur un arbre du jardin. Ces enfants mangeaient des fruits ressemblant à des mandarines, or cette visite avait lieu plus d'un mois avant la période normale de maturité des mandarines. Au lieu de le détruire, il l'aurait planté dans le jardin de l'orphelinat. Cet arbre a fructifié plusieurs années plus tard. Ce nouveau fruit à couleur orange foncé à maturité complète, s'épluchant facilement et à saveur douce et légèrement musquée, reçut d'abord le nom de mandarine du frère Clément (*Camille, et al., 2013*), puis "clémentine" en l'honneur de son découvreur par la société d'horticulture d'Alger. Le botaniste français Charles Trabut, après en avoir fait la description, validera cette distinction en donnant à cet hybride le nom botanique de *Citrus clementina* (*Amic, 2020*).

1.3. Origine génétique de la clémentine :

Comme la plupart des agrumes cultivés, l'existence de la clémentine résulte d'une rencontre plus ou moins hasardeuse entre un grain de pollen et un ovule. Le professeur Trabut considère que le clémentinier est un hybride entre le mandarinier et un autre *Citrus* présent dans la collection plantée à Misserghin qui aurait le pollen. Il évoque même l'hypothèse que cet autre *Citrus* serait un bigaradier (*Citrus aurantium L.*) à feuille de saule appelé Granito (*Camille, et al., 2013*).

Après plusieurs hypothèses, finalement l'analyse génétique à l'aide de marqueurs de l'ADN qui nous a éclairés sur l'origine de la clémentine. Les chercheurs de l'Inra-Cirad, de l'université de Catania en Italie et de l'université de Riverside aux États-Unis, désignèrent l'oranger (*Citrus sinensis Osb.*), comme parent pollinisateur. Ce résultat confirme les dires du professeur Trabut sur l'origine hybride du clémentinier de Misserghin, mais contredit définitivement la thèse affirmant que le parent mâle pourrait être un bigaradier. Sans l'intervention de l'homme, cet hybride n'aurait pas pu se maintenir au-delà de la durée de vie de l'unique arbre, seul représentant de la combinaison heureuse entre un pollen d'oranger et un ovule de mandarinier. Tous les clémentiniers cultivés aujourd'hui dans le monde sont donc des individus multipliés par des greffages ou des bouturages successifs à partir de l'arbre unique du frère Clément (*Camille, et al., 2013*).

1.4. Développement et diversification :

En Algérie, la culture du clémentinier a été développée et s'est étendue dans l'Oranie, puis dans la plaine de la Mitidja. En 1925, la coopérative des agrumes de Boufarik, toujours en Algérie, exporte pour la première fois de la clémentine aux Halles à Paris. C'est le début d'une histoire commerciale extraordinaire. Rapidement, la culture du clémentinier s'étend à tout l'ouest de la Méditerranée (Algérie, Tunisie, Maroc, Espagne, Italie et Corse).

C'est toujours en 1925 que les premiers clémentiniers en provenance d'Algérie sont plantés en Corse, par Don Philippe Semidei à Figaretto, lieu de la commune de Talasani en plaine orientale. Ils sont introduits en Espagne la même année.

Bien que d'apparition relativement récente de la clémentine s'est rapidement imposée sur les marchés. Elle est devenue l'agrumes le plus vendu sur les marchés européens d'octobre à début janvier, et a remplacé la mandarine commune, fruit à pépins, dans les vergers méditerranéens (*Camille, et al., 2013*).

1.5. Taxonomie et description botanique de la clémentine :

Tableau 1: Taxonomie de Clémentine (*Carbonell, et al., 2020*)

Règne	Végétal
Classe	Eudicolèdones
Sous classe	Rosidées
Famille	Rutacées
Sous famille	Aurantioideae
Tribu	Aurantieae
Sous tribu	Citrinae
Genre	Citrus
Espèce	Clementina

L'arbuste du *Citrus clementina* possède un feuillage persistant, bien ramifié pouvant atteindre jusqu'à 6m de hauteur, cultivé en pleine terre. Cependant, généralement taillé, il est souvent maintenu dans les deux mètres de hauteurs, voire moins, pour une culture en bac. Les feuilles sont en moyenne de 8 à 12 cm ovales, et acuminées, aromatiques, vertes et luisantes dont la face supérieure est foncée brillante et la face inférieure vert clair. Les fleurs, blanches, petites et d'aspect cireux, apparaissent vers l'extrémité des branches (*Debuisson, 2018*). Elles sont agréablement parfumées, dont l'odeur est froissée rappelle celle du Bigaradier et non du Mandarinier. Le clémentinier produit des fruits à un parfum de Mandarine légèrement musqué, qui sont matures à partir d'octobre. Les clémentines sont vertes puis prennent une belle teinte orange après la baisse des températures. Le grand avantage de la

Clémentine est d'être plus précoce que la Mandarine. De novembre à fin décembre on peut cueillir des fruits très doux préférés à la Mandarine qui, à cette époque, est encore acide (*Trabut, 1926*).



Figure 3: Un clémentinier (à gauche) et fleur de clémentinier (à droite)(*Podor, 2020*).

Tableau 2: Description botanique du clémentinier (*Debuisson, 2018*).

<u>Botanique</u>		<u>Planter et cultiver</u>	
Nom scientifique	Citrus clementina	Rusticité	Peu rustique, -2°C min
Synonyme	<i>Citrus reticulata</i> « <u>Clémentine</u> »	Exposition	Ensoleillée à ombre légère
Famille	Rutacées	Utilisation	Potée, Serre, Véranda, Pleine terre
Origine	Horticole		
Floraison	Blanc	Acidité	Acide, ph 5 à 6
Fleurs	Fin de printemps, été	Humidité	Normal à frais
Type	Agrume	Sol	Riche et drainant
Végétation	Vivace	Plantation	Printemps, été Greffage
Feuillage	Persistent	Multiplication	
Hauteur	8 m en pleine terre	Sensibilité	Cochenilles, Maladies Cryptogamiques



Figure 4: Un clémentinier (Swintek, 2020).

1.6. Description morphologique d'un fruit de clémentine :

Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité. Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique (Ramful, et al., 2010). D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits charnus de type d'une baie avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées (Nouha, 2015):

- **L'épicarpe appelé flavédo :** C'est la surface périphérique du fruit. Il est coloré par des pigments caroténoïdes et représente 8 à 10% du fruit. Il contient de nombreuses glandes sécrétrices d'essences aromatiques qui sont réparties de façon irrégulière et aussi riches en huiles essentielles. Ces glandes sont des poches bordées par plusieurs assises de cellules sécrétrices dont la formation fait intervenir des cellules épidermiques et des nodules méristématiques superficiels (Nouha, 2015).
- **Le mésocarpe appelé albédo :** C'est la couche intérieure blanchâtre, de structure spongieuse, plus ou moins épaisse par rapport à la taille du fruit, elle peut constituer 12 à 30% du fruit. Elle est intimement associée à l'épicarpe avec lequel elle forme ce qu'il est convenu d'appeler les écorces d'agrumes (Nouha, 2015).

- **L'endocarpe appelé pulpe :** C'est la partie comestible d'agrumes. Il est constitué d'une fine membrane qui tapisse les nombreuses loges carpellaires. Du côté interne, cette membrane porte des poils succulents dont l'ensemble forme la partie comestible ou pulpe renfermant les graines ou pépins (*Nouha, 2015*).

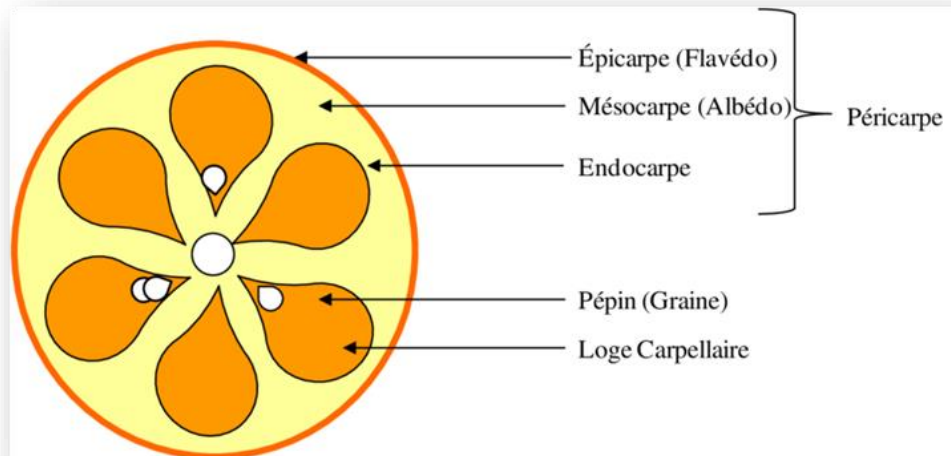


Figure 5: Coupe transversale de clémentine (*Huet, et al., 1991*).

1.7. Variétés de clémentine :

La principale variété de clémentine est la clémentine « commune » ou « ordinaire » connue sous l'appellation de « Fina » en Espagne, depuis son isolation au début des années 1900. Elle est introduite en Espagne pour la première fois en 1925 de l'Algérie. Elle est le résultat de l'hybridation du père Clément. Toutes les autres variétés espagnoles de clémentine sont dérivées de la clémentine commune, on cite ; « Clemenules » et « Oroval » actuellement les plus abondantes en Espagne (*Fabron, et al., 2016*).

Une autre variété principale de clémentine est la clémentine « Monreal » découverte en Algérie en 1940. Elle a une taille supérieure de celle de la clémentine « commune ». Son apparition est prouvée et documentée par écrit dans 'Annales de L'Institut Agricole et des Service de Recherches et d'Expérimentation Agricole de l'Algérie' en 1949. Ses dérivés sont la clémentine « Moulin » et la clémentine « Moutonnaire » (*Fabron, et al., 2016*).

1.8. Composition chimique et valeur nutritionnelle de la clémentine :

La clémentine apporte en moyenne 47,30 calories pour 100 g soit 200 kJ. Une clémentine pèse entre 45 et 55 g, elle apporte donc entre 21,28 et 26,01 kcal pour chaque nutriment (*Fabron, et al., 2016*). L'énergie de la clémentine lui provient essentiellement de ses glucides, à hauteur de 9,17g pour 100 g. Cette quantité de glucides se situe en-dessous de la teneur moyenne présente dans les fruits frais (11,31g pour 100g environ). Ce sont essentiellement du saccharose (5,70 g pour 100 g), du fructose

(1,5 g pour 100 g) et du glucose (1,40 g pour 100 g). La clémentine renferme 1,70 g de fibres pour 100g en moyenne, quantité inférieure à la teneur moyenne présente dans les fruits frais (2,77g pour 100g). La clémentine a une teneur en protéines (0,81g pour 100g) inférieure à la teneur moyenne présente dans les fruits frais (0,93g pour 100g environ) (*Teysse, et al., 2020*). Le tableau ci-dessous apporte une information sur la teneur, les valeurs minimales et maximales, ainsi que le pourcentage des Valeurs Nutritionnelles de Référence (VNR) pour 100g net de clémentines crues :

Tableau 3: Composition chimique et valeur nutritionnelle de la clémentine (*Teysse, et al., 2020*).

Constituant (g/100 g)	Teneur moyenne	Min-Max	%VNR
Eau	87	80,70 - 88,60	-
Fibres	1,70	1,10 - 3,20	-
Glucides	9,17	-	3,53
Dont sucre	8,60	7,88 - 15,20	9,56
Lipides	<0,50	0,07 - NC	-
Dont AG saturés	<0,01	NC - 0,039	-
Protéines	0,81	0,10 - 1,25	1,62
Calcium (mg/100 g)	23	17,90 - 48	2,88
Chlorure (mg/100 g)	<20	-	-
Cuivre (mg/100 g)	0,04	0,032 - 0,062	4
Fer (mg/100 g)	0,09	VNC - 0,24	0,64
Iode (mg/100 g)	<20	0,30 - VNC	-
Magnésium (mg/100 g)	9,30	8,30 - 13	2,48
Manganèse (mg/100 g)	0,025	0,018 - 0,06	1
Phosphore (mg/100 g)	18	15,10 - 25,70	2,57
Potassium (mg/100 g)	140	103 - 239	7
Sélénium (mg/100 g)	<20	0,40 - VNC	-
Sodium (mg/100 g)	<5	0 - 6	-
Zinc (mg/100 g)	0,10	0,04 - 0,11	1
Provitamine A Bêta-carotène (µg/100 g)	147	30 - 445	-
Equivalent Vitamine A (µg/100 g)	24,50	6 - 74,17	3,06
Vitamine B1 (mg/100 g)	0,064	0,04 - 0,11	5,82
Vitamine B2 (mg/100 g)	<0,01	0,007 - 0,05	-
Vitamine B3 (mg/100 g)	0,23	0,20 - 1,24	1,44
Vitamine B5 (mg/100 g)	0,20	0,10 - 0,29	3,33
Vitamine B6 (mg/100 g)	0,079	0,054 - 0,093	5,64
Vitamine B9 (µg/100 g)	27,60	9 - 32	13,80
Vitamine C (mg/100 g)	49,20	22,10 - 56,40	61,50
Vitamine E (mg/100 g)	0,21	0,10 - 0,55	1,75
Vitamine K1 (µg/100 g)	<0,80	0 - VNC	-
Polyphénols	7,90	7,80 - 8,20	-

1.9. Bienfaits de la clémentine :

- La clémentine est très riche en aliments bioactifs particulièrement les antioxydants, tels que la naringénine, l'héspéridine, la vitamine A, C, la xanthine et la lutéine, souvent en plus grandes quantités que les autres espèces d'oranges, ils ont également une teneur élevée en fibres (*Mergelina, 2021*).
- Elle contient un taux important de vitamine C (18,7 mg/100 g) qui participe activement aux défenses immunitaires surtout contre des agressions virales. Aussi la vitamine E, qui protège la peau du vieillissement. Elle stimule la prolifération cellulaire et renforce l'élasticité de la peau. Ces antioxydants préviennent aussi la prolifération anarchique des cellules cancéreuses. Elle contient de la bêta-carotène, pigment qui intervient dans la vision et qui prévient la dégénérescence de la macula de la rétine. Les caroténoïdes présentes dans la clémentine fortifient, protègent et stimulent la production osseuse. Une carence en caroténoïdes peut causer de l'ostéoporose. Ils jouent également le rôle d'antioxydant (*Costanzo, 2020*).
- La clémentine contient des flavonoïdes, ces derniers réduisent le taux du LDL cholestérol, préviennent les risques d'apparition des maladies cardio-vasculaires et assurent la bonne vascularisation du cœur.
- Le taux des fibres au sein de la clémentine, lui confère un effet laxatif puissant, elle est antispasmodique et c'est aussi un très bon antalgique contre les douleurs hépatiques et gastriques.
- La clémentine contient un taux important de potassium 154 mg/100 g, qui permet de réduire les crampes musculaires et l'hypertension. Riche en minéraux oligoéléments : calcium, magnésium, fer, potassium et phosphore, la clémentine reminéralise. Elle est aussi riche en eau 87%, ce qui fait d'elle un très bon désaltérant (*Decroix, 2021*).

Chapitre 2 : Polyphénols

2.1. Présentation générale sur les polyphénols :

Les polyphénols, appelés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire (synthétisés par les végétaux). On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème (*Achat, 2013*), dont ils sont un moyen de défense contre le rayonnement U.V, les agressions par les pathogènes et ils contribuent à la pigmentation des plantes. Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique et d'un ou plusieurs groupements phénoliques dans leur structure et se différencient par le nombre et l'enchaînement des noyaux aromatiques, le nombre et la position des groupes hydroxyles ainsi que la présence de divers substituant (groupes alkyles, glycosyles, acides organiques...) (*Nouha, 2015*).

Les polyphénols sont des micro-constituants végétaux abondants dans nos aliments et font donc une partie intégrante de l'alimentation humaine. Ils sont abondants dans la majorité des fruits et légumes, olives, céréales, chocolat, et boissons (le café et le thé). Ils se révèlent posséder une forte bioactivité qui se traduit au niveau de l'organisme par une large gamme de propriétés biologiques. Les polyphénols alimentaires les plus courants sont les flavonoïdes et les acides phénoliques (*Ousmer L., Tahri S., 2017*). Depuis une quinzaine d'années, des chercheurs et industriels de l'agro-alimentaire s'intéressent de plus en plus à une catégorie d'antioxydants, les polyphénols. La reconnaissance des propriétés antioxydants de ces composés, leur abondance dans l'alimentation et leur rôle probable dans la prévention des maladies associées à un stress oxydant sont les principales raisons de cet engouement (*Achat, 2013*).

2.2. Domaines d'utilisation des polyphénols :

- Utilisation alimentaire : Dans la cuisine, les écorces fraîches ou sous forme de poudre de *Citrus sinensis* sont utilisées pour aromatiser le thé et pour la préparation de certains plats traditionnels ou gâteaux. Les fibres des écorces d'agrumes sont naturellement associées avec des composés bioactifs (composés phénoliques, vitamine C) ce qui leur confère des propriétés fonctionnelles multiples (*Wang, et al., 2014*).
- Utilisation en produits pharmaceutique et parapharmaceutiques : Les extraits naturels des écorces sont également l'un des composants de l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments, de savons, de parfums et autres produits cosmétiques. De plus, les écorces d'agrumes sont riches en limonène, qui est employé dans la formulation de solvants industriels mais aussi comme solvant biologique (*Lohrasbi, et al., 2010*) Le linalol et le citral extraits des

écorces des agrumes ont des effets antibactériens contre *Campylobacter jejuni*, *E. Coli*, *L. monocytogenes* et *Bacillus cereus*. Le citral est un composé actif aussi contre le *Penicillium digitatum* et *Aspergillus Niger* (Tian, et al., 2001 ; Fisher, et al., 2006 ; Viot, et al., 2008 ; Chutia, et al., 2009 ; Singh, et al., 2010).

2.3. Principaux composés phénoliques des écorces des agrumes :

Les écorces d'agrumes et les graines sont très riches en composés phénoliques, comme les acides phénoliques et les flavonoïdes et les tanins (Nouha, 2015). La peau d'agrumes est plus riche en flavonoïdes que les graines. Une grande partie des composés phénoliques des oranges et des jus d'orange sont les acides hydroxycinnamiques (HCA) et les flavonoïdes, dont l'utilisation et la valorisation des écorces d'agrumes ont fait l'objet de diverses recherches, ce sont des sources potentielles d'antioxydants naturels (Ousmer L., Tahri S., 2017).

2.4. Structure des polyphénols :

Le terme « phénol » englobe approximativement 10 000 composés naturels identifiés. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones (cycle aromatique), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Achat, 2013).

La plupart des composés phénoliques naturels sont présents le plus souvent sous forme de glycosides, qui sont des monos et des polysaccharides liés à un ou plusieurs groupes phénoliques (cas des flavonoïdes), ou sous forme d'esters ou d'esters méthyliques (cas des acides phénoliques), et rarement sous forme libre dite aglycone (Ousmer L., Tahri S., 2017).



Figure 6: structure du noyau phénolique (Albuquerque, et al., 2013).

2.5. Classification des polyphénols :

Quatre principales classes sont largement répandues sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les lignines, les plus rares sont les coumarines et les stilbènes, mais les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont considérés comme les principaux composés phénoliques (*Madi, 2008*).

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux phénoliques (aromatiques) et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. Cette classification est représentée dans la figure ci-dessus :

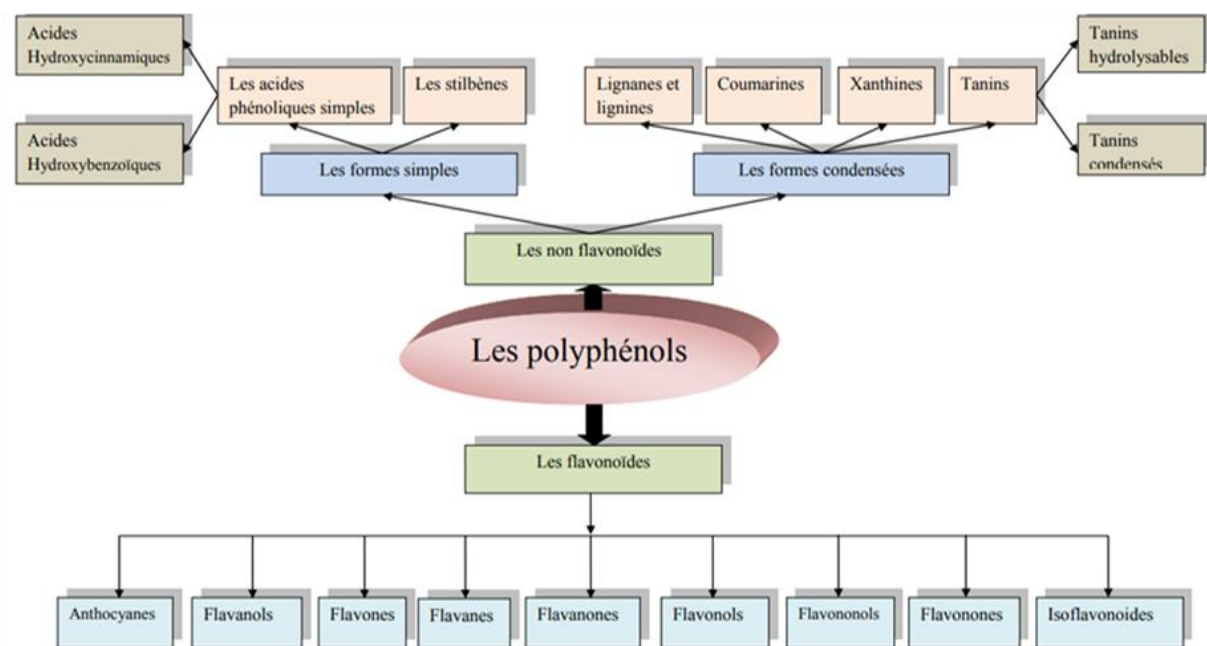


Figure 7 : Diagramme de classification des polyphénols (*Ousmer L., Tahri S., 2017*)

2.5.1. Polyphénols simples :

➤ Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques sont des métabolites secondaires aromatiques, largement répartis dans l'ensemble de la plante, mais qui sont particulièrement abondants dans les fruits acides. Le terme acide phénolique désigne en général les phénols possédant une seule fonction carboxylique acide.

Ces acides phénoliques naturels contiennent deux structures de carbone représentatives et distinctives : les structures hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques. Bien que le squelette de base reste le même, les nombres et les positions des groupes hydroxyle sur le cycle aromatique font la différence et établissent la variété des structures et de composés. Les acides phénoliques sont rarement présents à l'état libre, mais ils sont en général combinés à d'autres molécules organiques (*Mergelina, 2021*).

Le profil en acides phénoliques des différentes variétés d'agrumes est le même, mais ce sont les teneurs qui varient d'une variété à une autre. Cette différence peut être expliquée par de nombreux facteurs comme la région de culture, les conditions climatiques, l'état de maturité du fruit et la variété des agrumes (Nouha, 2015).

▪ **Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1) :**

Les acides hydroxybenzoïques ont une structure courante de type (C6-C1) (Ousmer L., Tahri S., 2017). Ces acides sont communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides, abondantes dans les végétaux (chez les Gymnospermes et les Angiospermes), et dans les aliments notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges, l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais (Achat, 2013).

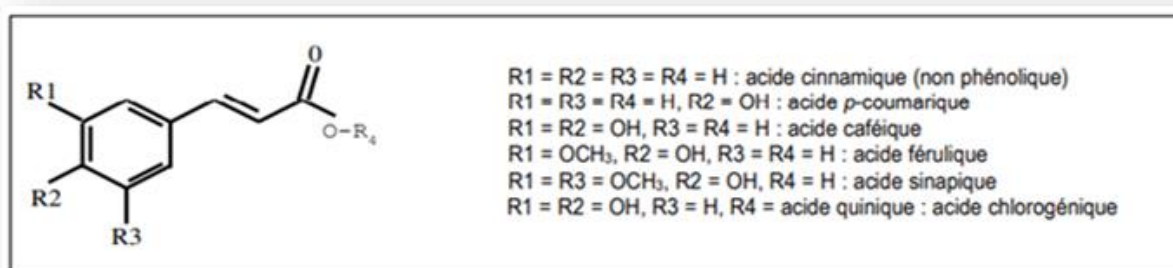


Figure 8: Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques et quelques dérivés (Achat, 2013).

▪ **Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3) :**

Les acides hydroxycinnamiques sont des composés aromatiques avec une chaîne latérale à trois carbones (C6-C3). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires (telle que la méthylation), sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules (Ousmer L., Tahri S., 2017).

Rarement libres, ils sont souvent estérifiés et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, Oarylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique. Les plus courants ; Les acides férulique, *p*-coumarique et sinapique, et l'acide caféique qui est le plus abondant, présent dans de nombreux végétaux (graine de café, tomate, olive, pomme) (Achat, 2013).

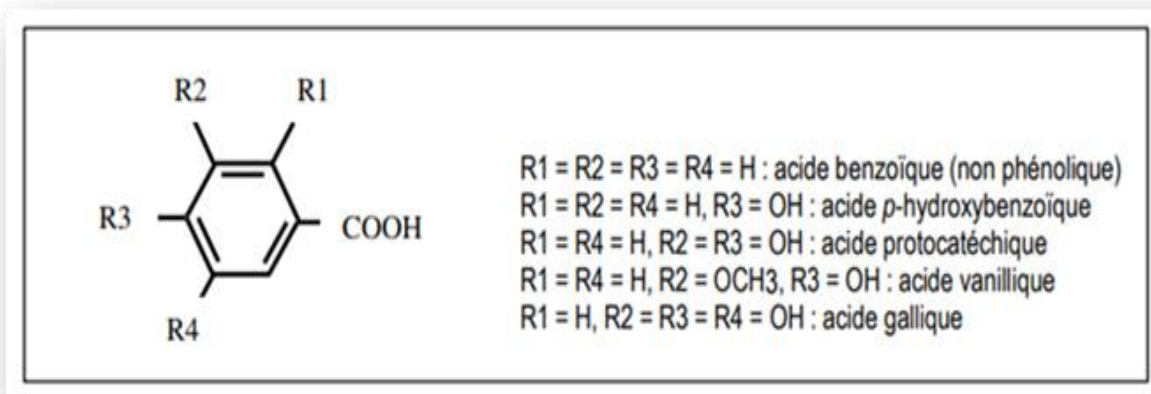


Figure 9: Structure chimiques des acides hydroxycinnamiques et quelques dérivés (*Achat, 2013*).

➤ **Flavonoïdes :**

▪ **Définition :**

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de composés phénoliques bioactifs végétaux. Ce sont les pigments les plus fréquents à côté de la chlorophylle et des caroténoïdes (*Ousmer L., Tahri S., 2017*). Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et des fruits (soit sous forme native ; anthocyanes et Flavonols, soit après oxydation par le phénomène de brunissement enzymatique), et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (*Achat, 2013*). Tous les organes du système végétal en contiennent, des racines jusqu'aux fruits : tronc, tige, fleurs, fruits, racines, feuilles, écorce mais ils sont souvent plus concentrés dans les zones externes du fruit ou du légume (*Ousmer L., Tahri S., 2017*).

▪ **Distribution et localisation des flavonoïdes :**

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles, la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement (*Habichi, et al., 2017*). Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (*Boudjellal, 2009*).

▪ **Structure chimique des flavonoïdes :**

Ce sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire ayant une structure phényl-benzopyrone, qui possède un squelette carboné en C6-C3-C6. Ils sont constitués d'un squelette de base

à quinze atomes de carbone, formant 2 noyaux aromatiques (*Nouha, 2015*) benzéniques C6 étiquetés (A et B) unis par une chaîne linéaire à trois atomes de carbone C3 (*Ousmer L., Tahri S., 2017*) sous forme d'un noyau hétérocyclique central de type pyrane (C) à oxygène dont la nature définit l'appartenance du flavonoïde à un groupe déterminé (*Nouha, 2015*).

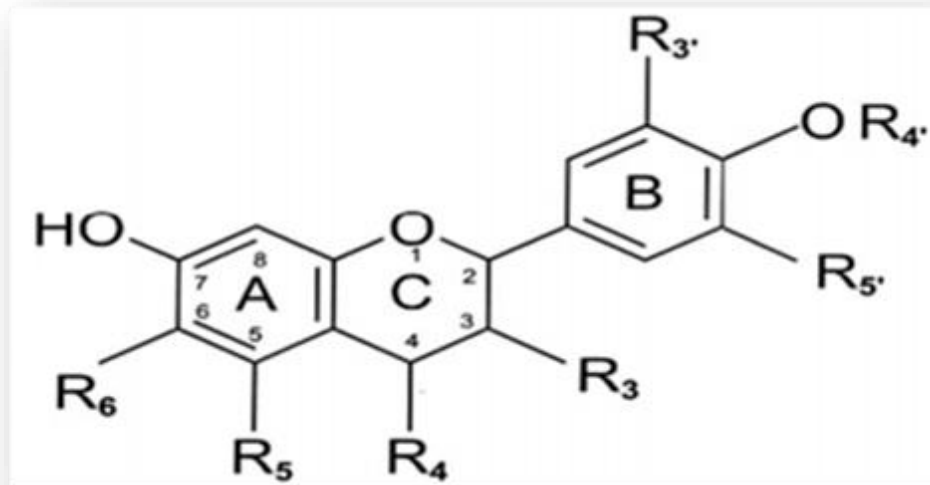
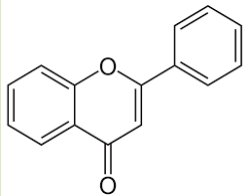
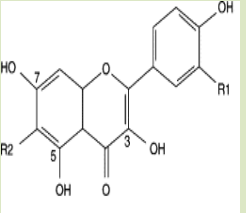
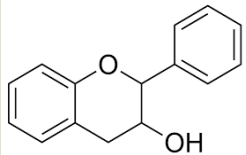


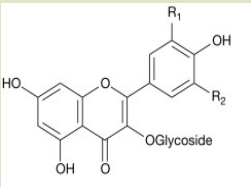
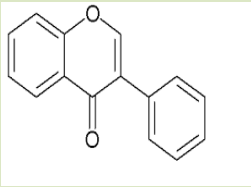
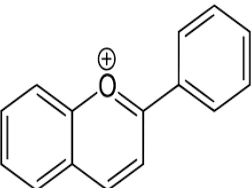
Figure 10: Structure de base des flavonoïdes (*Damian reyna, et al., 2016*).

➤ **Les différentes classes de flavonoïdes dans l'écorce d'agrumes :**

Les chimistes ont déjà identifié plus de huit mille flavonoïdes. Parmi eux, certains se retrouvent plus fréquemment dans les compléments alimentaires (*Dr. Bernhard, 2015*). Les principaux groupes de flavonoïdes présents dans les écorces d'agrumes (clémentine) sont ; les Flavanones (aglycones ; l'hésperitine dans l'orange et la clémentine, la naringénine dans le pamplemousse et l'ériodictyol dans le citron), les Citroflavonoïdes (situés spécifiquement dans la partie blanchâtre sous l'écorce qui entoure les agrumes), les Flavones, les Flavonols (catéchines), les isoflavones et les anthocyanines (*Ousmer L., Tahri S., 2017*) Chaque groupe comprend lui-même de nombreux composés qui diffèrent selon le degré d'hydroxylation et de glycosylation (*Nouha, 2015*). Les aglycones de flavanones varient selon les types d'agrumes l'hésperitine est majoritaire dans l'orange et la clémentine, et la naringénine dans le pamplemousse et l'ériodictyol dans le citron.

Tableau 4: Les principales classes de flavonoïdes (Ousmer L., Tahri S., 2017).

Structure chimique	Caractéristiques	Exemple	Source principale	Références
<p>Les flavanones</p> 	<p>-Absence de la double liaison entre C2 et C3, Ils sont glycosylés soit par du rutinose (6-O-α-L-rhamnosyl-D-glucose) soit par de la néohesperidose (2-O-α-L-rhamnosyl-D-glucose) liés en position 7.</p>	<p>-Naringénine -Naringine -Hesperitine -Hesperidine -Eriodictyol</p>	<p>Ecorce d'agrumes Agrumes, raisin</p>	<p><i>PIETTA, 2000 ; ONO et al., 2006 ; PINCEMAIL et al., 2007 ; STALKAS, 2007 MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZCANO et al., 2014 ; YANG et al., 2014 ; MARIN et al., 2015 ; OMOBA et al., 2015.</i></p>
<p>Flavonols</p> 	<p>-Les plus répandus et les plus diversifiés structurellement, se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double liaison entre C2-C3, Ils existent sous forme d'aglycones ou d'hétérosides, structure similaire à celle des flavones avec un hydroxyle en position C3 du noyau pyrone C, s'accumulent dans les tissus extérieurs et aériens (peau et feuilles).</p>	<p>Quercétine Kaempferol Galangine Fisetine Myricétine Sorhamnetine</p>	<p>brocoli, thé, tomate, oignon, épinard, chou, brocoli, baies laitue, pomme, raisin et peaux des fruits.</p>	<p><i>PIETTA, 2000; AJILA et al., 2010; SAEWAN et JIMTAISONG, 2013; MORAND et MILENKOVIC, 2014; PEREZCANO et al., 2014; TUSZYŃSKA, 2014; MARIN et al., 2015; OMOBA et al., 2015; TELESZKO et al., 2016.</i></p>
<p>Flavan 3 ols ou Flavanols</p> 	<p>-flavonoïdes les plus complexes, souvent appelés catéchines. Leurs structures diffèrent de la plupart des flavonoïdes : il n'y a pas de double liaison entre C2 et C3, et pas de carbonyle C4 dans le cycle C de f L'hydroxylation en C3 permet aux flavanols d'avoir deux centres chiraux sur la molécule (sur C2 et C3), donc quatre diastéréoisomères possibles.</p>	<p>(+)Catéchine(-) Catéchine (+) Epicatechine (-) Epicatechine</p>	<p>Chocolat, thé vert, vin rouge et fruits</p>	<p><i>TSAO, 2010 ; HAYTOWITS et al., 2013 ; SAEWAN et JIMTAISONG, 2013 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZCANO et al., 2014 ; MARIN et al., 2015 ; MRAIHI et al., 2015 ; TELESZKO et al., 2016).</i></p>

<p>Flavones</p> 	<p>-Les plus réponsus et les plus diversifiés structurellement. -Groupe phényl B comme substituant en position 3 du noyau pyrone C -Présence de double liaison entre C2 et C3 et une fonction oxo en C4.</p>	<p>-Chryisine -Apgenine -luteoline - Chryisine - Eupaline - Balcalin</p>	<p>Graine de céréales, persil, thym, tisane, pommes, thé, cerise, céleri, raisins, haricots, brocolis, poireaux, oignons, et tomate.</p>	<p><i>PIETTA, 2000 ; STALKAS, 2007; AJILA et al., 2010 ; SAEWAN et JIMTAISONG., 2013; HAYTOWITS et al., 2013 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014; PEREZ-CANO et al., 2014.</i></p>
<p>Isoflavones</p> 	<p>-Rencontrés sous forme d'aglycones ou de glycosides, la structure des isoflavones diffère des flavones en localisation du groupe phényle (cycle B), car il est substitué à la position C3 du cycle pyrone (noyau C).</p>	<p>-Genisteine -Genistine -Daidzeine -Daidzine -Ononine.</p>	<p>les légumes, y compris le soja, les haricots verts et les pois chiches. Les germes de luzerne et de trèfle, les graines de tournesol.</p>	<p><i>PIETTA., 2000 ; REYNAUD., 2005 ; TSAO., 2010 ; HAYTOWITS et al., 2013 ; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZ-CANO et al., 2014 ; MRAIHI et al., 2015.</i></p>
<p>Les anthocyanines</p> 	<p>-les antioxydants puissants, structures caractérisée par le noyau flavone avec différentes substitutions d'hydroxyle ou de méthoxyle, apparaissent principalement dans les fruits mais aussi dans les feuilles et les racines sous forme de glycosides, ce sont des pigments hydrosolubles présents uniquement dans le cytoplasme des plantes terrestres.</p>	<p>-Cyanidine -Cyanine -Peonidine -Delphinidine -Pelargonidine -Malvidine -Delphinidine</p>	<p>Raisin rouge, pommes, grains d'orge baies (fraise, cassis, mûres. . .), vin, fraises, framboises, prunes rouges, et agrumes.</p>	<p><i>PIETTA., 1999 ; CONSTANTA et al., 2006 ; DYKES et al., 2006 ; PINCEMAIL et al., 2007 ; SAEWAN et JIMTAISONG., 2013; MORAND et MILENKOVIC, 2014 ; PEREZCANO et al., 2014 ; MRAIHI et al., 2015.</i></p>

▪ **Les citroflavonoïdes :**

Selon leur origine, le terme citroflavonoïdes remplace souvent celui de bio flavonoïde. Le dictionnaire de pharmacie VIDAL comporte 21 formulations, dont on trouve le terme de citroflavonoïdes, hespéridine méthylchalcone, glucohéterosides, flavonoïdes de rutacées, extraits flavoniques d'écorces d'orange et même encore vitamine P (*Huet, et al., 1991*).

Les citroflavonoïdes sont des polyphénols présents dans l'écorce des agrumes. Ils ont des propriétés antioxydantes et agissent en synergie avec la vitamine C, présente également dans les agrumes. Les bio-flavonoïdes de citrus sont riches en rutine, hespéridine, eryodictol, la diosmine et naringénine. Une flavone attire spécialement l'attention des chercheurs, la nobiletine, aux propriétés anti-inflammatoires et antitumorales (*Edeas, 2007*).

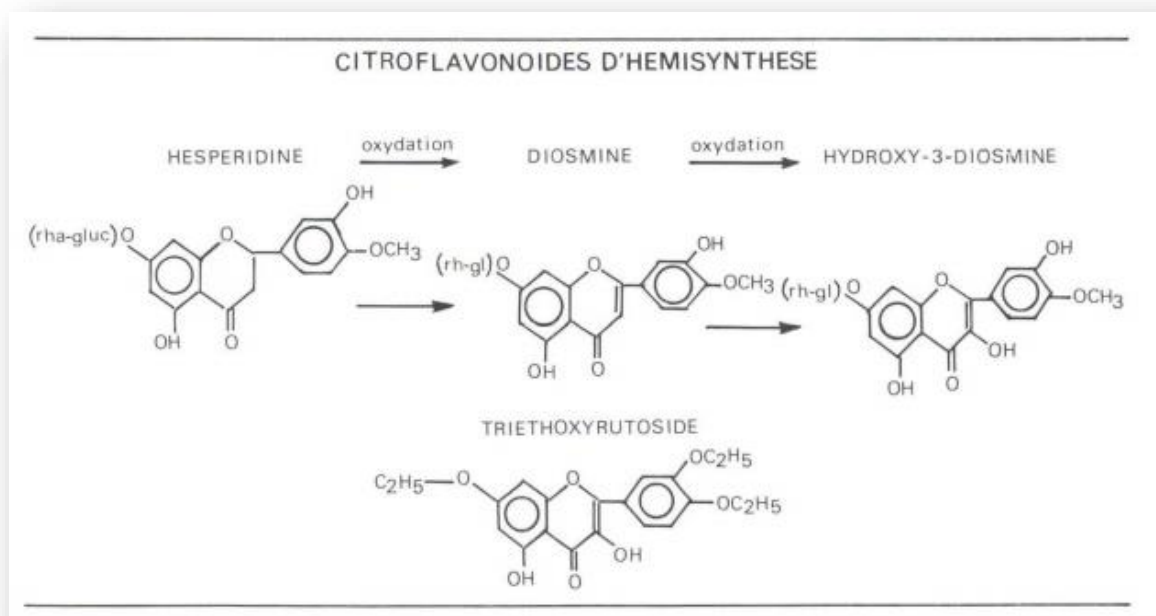


Figure 11: Structure de base des Citroflavonoïdes (*Huet, 1982*).

➤ **Propriétés et activités des flavonoïdes :**

- ❖ Les composés phénoliques extraits des écorces sont principalement utilisés comme antioxydants naturels dans la formulation des produits pharmaceutiques, en industrie agroalimentaire mais aussi dans d'autres applications industrielles en tant qu'inhibiteur de la corrosion, dans les matériaux de construction navale, dans les réactions biochimiques comme la production de biocarburants et de plastique biodégradable dans l'industrie de raffinage du pétrole brut, dans le décapage à l'acide, le nettoyage industriel, le détartrage acide, et aussi dans les procédés pétrochimiques (*Wilkins, et al., 2007 ; Pourbafrani, et al., 2010 ; Lohrasbi, et al., 2010; Nouha, 2015*).

- ❖
- ❖ La naringine est utilisée pour aromatiser les boissons, les bonbons et les produits de boulangerie, en raison de son goût amer typique (*Nouha, 2015*).
- ❖ Les anthocyanes sont utilisés dans l'industrie alimentaire comme colorants (E163) dans la confiserie, les produits laitiers et les desserts ou pour compenser la décoloration des fruits induite par certaines étapes de traitement (*Macheix, et al., 2005; Nouha, 2015*).
- ❖ Les composés phénoliques, par leur structure phénolique, sont des agents réducteurs capables de réagir avec les radicaux libres produits par notre organisme. Par conséquent, protéger les lipides, les protéines et l'ADN des dommages oxydatifs (*Koga, et al., 2001 ; Turner, et al., 2004*). Plusieurs études proposent le remplacement des antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyansol (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) par des antioxydants naturels à cause de leur toxicité impliquée dans la promotion du développement des cellules cancéreuses (*Moure, et al., 2001*). La poudre des écorces de mandarine, contenant de l'héspéridine et de la narirutine, a une activité antioxydant meilleure que celle de l'antioxydant synthétique BHA. Il a aussi été montré que l'ajout de la poudre des écorces de mandarine ne présente pas d'effet sur les propriétés organoleptiques du produit et que cet ajout permet la diminution du taux de cholestérol des personnes ayant ingéré ce produit (*Anagnostopoulou, et al., 2005 ; Peschel, et al., 2006*). Le même résultat a constaté que la poudre des écorces d'orange inhibe la peroxydation de l'huile de soja deux fois plus que le BHT et le BHA. Les écorces d'agrumes ont aussi été utilisées pour produire l'héspéridine et de la néohéspéridine nécessaires pour la synthèse de dihydrochalcones (*Nouha, 2015*).
- ❖ Les flavonoïdes d'agrumes (les flavanones et des flavones polyméthoxylés) participent à la prévention de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, l'ostéoporose, le diabète et les maladies neurodégénératives (*Bocco, et al., 1998*).
- ❖ Ils pourraient constituer une activité antigrippale et anti-herpétique grâce aux nombreux groupes hydroxyle sur les phénols responsables de leurs activités antivirales (*Iqbal, et al., 2006*).

Tableau 5: Propriétés fonctionnelles et domaines d'utilisation des composés phénoliques des écorces d'agrumes (Nouha, 2015).

Composé	Famille	Propriété	Application	Références	
Hespéridine	Flavanones	- Activité antivirale. -Activité antimicrobienne modérée contre Salmonella typhi et S.typhimurium. - - Activité antiallergique via l'inhibition de la libération de l'histamine. - - Réduction du risque du cancer du tube digestif. - - Activité sédatrice. - Activité hypoglycémiant par la régulation du métabolisme du glucose. - - Atténuation des anomalies de la rétine et du plasma. - Activité anti-obésité.	- Préparations pharmaceutiques.	<i>Kaul et al., 1985 ; Kawaguchi et al., 2004 ; Matsuda et al., 1991 ; Scalbert et al., 2005 ; Choi et al., 2011.</i>	
Eriocitrine		- Utilisé dans plusieurs complexes multivitaminés. - Maintien de l'intégrité et de la circulation périphérique. - Stabilité élevée durant le traitement et le stockage.		<i>Del Rio et al., 2004.</i>	
Naringine		- Réduction du niveau du cholestérol dans le plasma. - Réduction du risque de l'athérosclérose. - - Protection du niveau de vitamine E dans le plasma. - Amélioration du métabolisme de l'éthanol. - Exhausteur de goût (goût amer) pour les bonbons, les boissons et les produits de boulangerie. - - Stabilisant d'huile (activité antioxydante et antimutagène).		-Industrie agro-alimentaire.	<i>Giannuzzo et al., 2003 ; Nogata et al., 2006 ; Zhang et al., 2007.</i>
Néohespéridine		- Synthèse des dihydrochalcones (édulcorants).			<i>Frydman et al., 2005 ; Ortuno et al., 2006.</i>
Nobilétine, Tangerétine, Sinensétine	Flavones polyméthoxylés	-Activité anti-inflammatoire: activation de l'énergie vitale, la circulation sanguine et disperse la stagnation physique.	- Préparations pharmaceutiques.	<i>Ho et al., 2008; Huang et al., 2010; Li et al., 2012.</i>	
Diosmine	Flavones glycosylés	-Ingrédient actif de certains médicaments (maladie de l'appareil circulatoire). -Amélioration du tonus musculaire et de la résistance vasculaire à des processus inflammatoires (veineuse chronique et l'arthrite rhumatismale).		<i>Del Rio et al., 2004.</i>	
Anthocyanes	Phénols	-Propriété organoleptique : colorant.	-Industrie agroalimentaire (confiseries, produits lactés et desserts).	<i>Mackeix et al., 2006.</i>	

2.5.2. Polyphénols complexes :

➤ Tanins :

▪ Définition :

Les tanins sont des molécules à poids moléculaire élevé qui constituent un groupe majeur des composés phénoliques. Les tanins se réfèrent à l'acide tannique, ils ont une structure qui est composée d'un glucose central et 10 groupes galloyl. Ils se lient avec des protéines, des composés tels que les alcaloïdes ou des ions métalliques lourds dans une solution, ce qui les rendent insolubles et provoquent des précipitations. Sont présents dans les écorces des fruits de quelques plantes. Les tanins sont à l'origine de sensation astringence des fruits non mures et les flavones donnent la saveur sucrée, cela parce que les composés phénoliques jouent un rôle important dans la qualité alimentaire des fruits et déterminants de saveurs (*Bensenouci, et al., 2020*).

▪ Les différentes classes des tanins :

On distingue 2 classes de tanins selon leur structure :

- ❖ Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique, ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (*Cowan, 1999*).

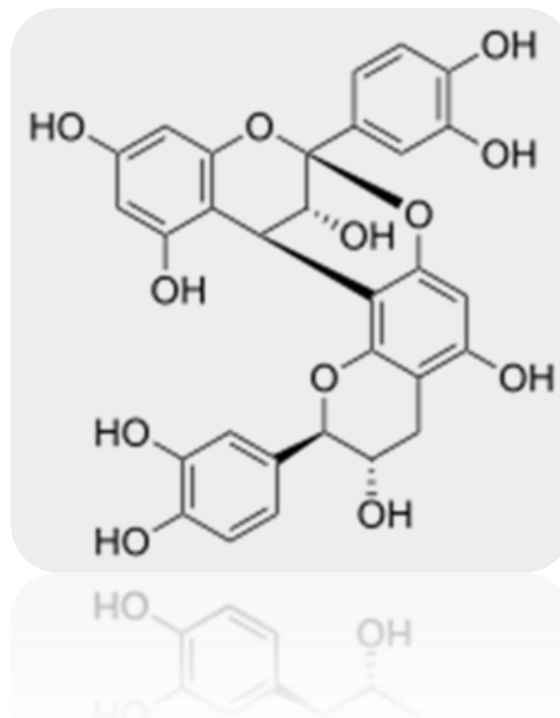


Figure 12: Structure de base des tanins hydrolysables (*Bayart, 2019*).

- ❖ Les tanins condensés sont des pro-anthocyanidines sont des polymères de monomères de polyhydroxyflavan-3-ol, reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6. Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux. En raison de leur complication avec les protéines salivaires, les tanins condensés sont responsables de l'astringence caractéristique des fruits avant maturité (raisin, pêche, pomme, poire, etc.) et de certaines boissons (vin, cidre, thé, etc.) ainsi que de l'amertume du chocolat (*Ousmer L., Tahri S., 2017*).

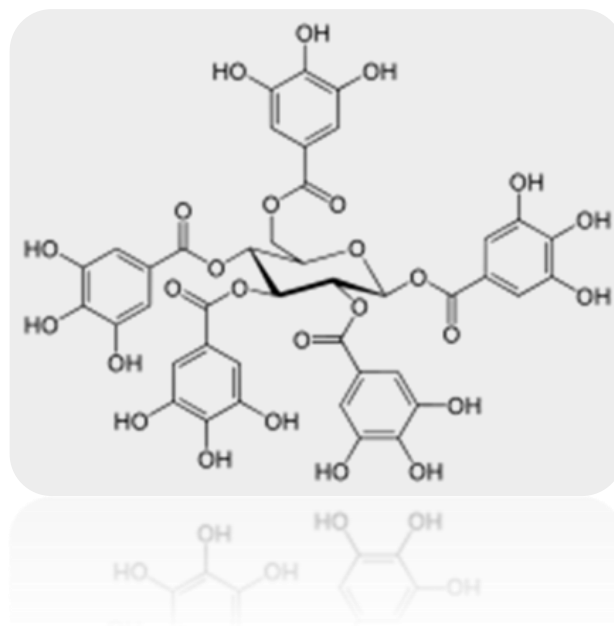


Figure 13: Structure de base des tanins condensés (*Bayart, 2019*).

▪ Activités thérapeutiques des tanins :

Les tanins sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique, pour produire divers suppléments alimentaires à forte valeur ajoutée, biologiquement actifs de par leurs activités antimicrobiennes. Selon leur classe, leur effet diffère :

- ❖ Les tanins condensés ont une activité antibactériennes contre les bactéries *S.mutans*, *E.coli*, *S.aureus* et antifongique contre *C.albicans* ainsi qu'une activité antivirale contre Influenza A, Herpès simplex (type 1), HIV.
- ❖ Les tanins hydrolysables ont une activité antibactérienne contre ; *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Helicobacter*, *E.coli*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Listeria*, une activité antifongique contre ; *C.parapsilosis* ainsi qu'une activité antivirale contre ; Epstein-Barr virus, Herpes virus HIV1 et 2 (*Ousmer L., Tahri S., 2017*).

Chapitre 3 : Le sang, l'érythrocyte et l'hémolyse sanguine

3.1. Le sang

3.1.1. Définition du sang :

Le sang est un liquide biologique vital à un aspect tissu conjonctif spécifique non fibreux. Il remplit les cavités vasculaires sanguines (cœur, artères, capillaires et veines) et circule en permanence. L'activité de transport est prépondérante et la circulation du sang est indispensable à la vie. Il présente la particularité de coaguler rapidement lors de la sortie des vaisseaux (*Asimov, 1963*).

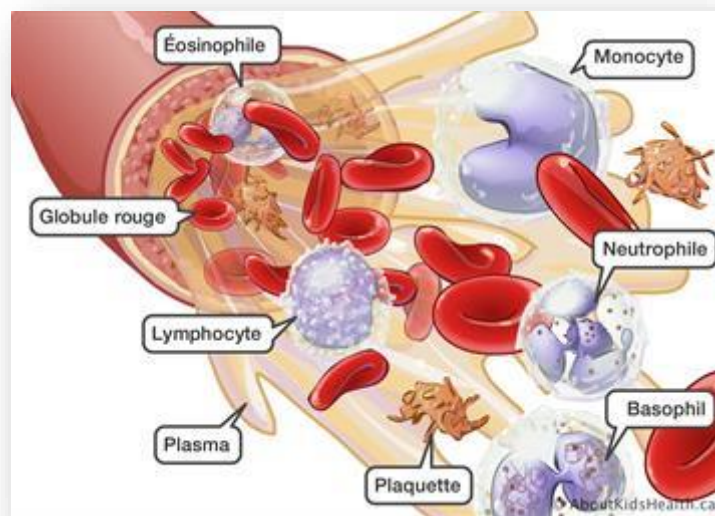


Figure 14: Les constituants du sang (*Theodorakidis, et al., 2019*).

3.1.2. Fonctions du sang :

La quantité totale de sang que contient le corps humain représente à peu près 1/14^{ème} du poids total de l'organisme. Un humain adulte est doté d'environ 5 litres de sang. Son origine est la moelle osseuse de la ceinture scapulaire, des hanches et du sternum. Il assure des fonctions diverses :

- L'homéostasie (l'hydratation, la concentration ionique et les échanges thermiques)
- La nutrition et l'épuration en apportant les gaz, les substances nutritives et en évacuant les déchets, le sang assure son entretien et son autoréparation.
- Il participe aux communications inter tissulaires en transportant de nombreuses molécules actives en particulier les hormones.
- Il participe à la défense de l'organisme par des molécules spécifiques (immunoglobulines et facteurs du complément) et en assurant le transport des cellules du système immunitaire (*Asimov, 1963*).

3.2. L'érythrocytes :

3.2.1. Caractéristiques des érythrocytes :

L'hématie est une cellule anucléée qui a la forme de petits disques biconcaves de $2\mu\text{m}$ d'épaisseur et de $7\mu\text{m}$ de diamètre. C'est la cellule sanguine la plus abondante, 5-6 millions / mm^3 . Elle est dotée d'une plasticité qui lui permet le passage à travers les capillaires étroits, puis elles reprennent la forme initiale après déformation.

L'érythrocyte possède une membrane cellulaire faite de protéines de structure et de glycoprotéines des groupes sanguins (Système ABO, Rhésus, Kell ...). Son cytoplasme possède des enzymes fabriquant de l'énergie : l'adénosine triphosphate (ATP), des sels minéraux, du glucose (substrat énergétique), et une chromoprotéine appelée l'hémoglobine (*Asimov, 1963*).

3.2.2. Membrane de l'érythrocyte :

La membrane érythrocytaire assure au globule rouge sa forme biconcave, sa plasticité et sa déformabilité. Elle porte également des déterminants de groupes sanguins et représente un modèle idéal pour l'étude de la structure et des fonctions des membranes cellulaires.

Elle représente une mosaïque fluide constituée d'une matrice lipidique disposée en une double couche dans laquelle flottent et se déplacent des protéines globulaires. Les composants glucidiques, lipidiques et protéiques ne se répartissent pas d'une manière équivalente sur les faces externes et internes de la membrane (*Silbernagl, et al., 2008*).

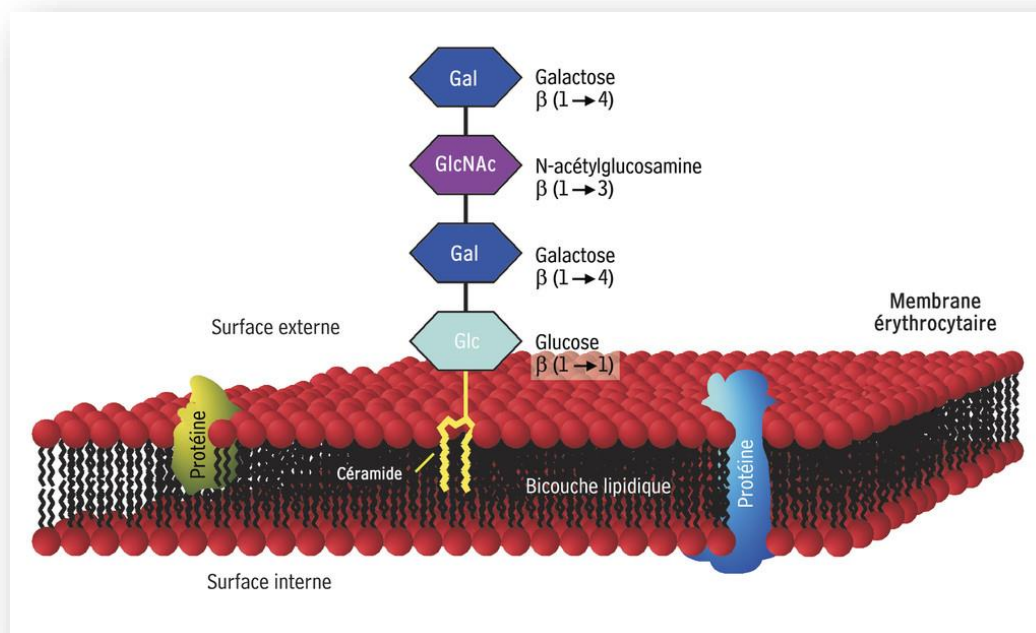


Figure 15: Structure de la substance précurseur des globules rouges (*Roselyne, et al., 2008*).

- Les glucides de la membrane du globule rouge sont des structures linéaires ou branchées, liées de manière covalente aux protéines et aux lipides membranaires. Ils sont situés sur la face externe de la cellule. Certains groupes sanguins ABH, i, I, Lewis, P sont localisés sur ces chaînes glucidiques, liés à des glycolipides et/ou glycoprotéines de la membrane du globule rouge. On suppose que ces structures glucidiques doivent jouer un rôle fondamental dans les relations entre les cellules vivantes. Elles sont concernées par de nombreuses fonctions, telles que les mécanismes de reconnaissance cellulaire, l'adhésion cellulaire et l'inhibition de contact. Sur cette base, le rôle des antigènes de groupes sanguins dans l'embryogénèse ou la cancérogénèse pourrait être d'une certaine importance (*Bailly, et al., 2020*).
- Les lipides de la membrane du globule rouge jouent un rôle important dans son organisation propre et dans ses échanges avec le plasma. Les phospholipides qui en représentent le principal composant, sont disposés en une structure en double couche : les glycosphingolipides (*Bailly, et al., 2020*).
- Les phospholipides sont disposés en une double couche dans laquelle la chaîne aliphatique de la molécule est éloignée du milieu aqueux, tandis que les groupements polaires des têtes hydrophobes se trouvent en contact direct avec le milieu externe et le cytoplasme. La répartition des lipides dans la double couche n'est pas homogène puisque l'on trouve préférentiellement la sphingomyéline et la phosphatidylcholine dans le feuillet externe, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylserine dans le feuillet interne. Ces molécules lipidiques sont très mobiles, mais seulement à l'intérieur de leur propre couche (*Bailly, et al., 2020*).

3.2.3. Hémoglobine :

L'hémoglobine est une protéine qui représente 33% du poids de l'érythrocyte, c'est le pigment qui donne la couleur rouge aux cellules grâce aux ions Fe^{2+}/Fe^{3+} . Elle assure le transport de l' O_2 des poumons vers les tissus ainsi le transport du CO_2 des tissus vers les poumons. Il sert également de tampon des H^+ libérées par les tissus (*Bailly, et al., 2020*).

Une molécule d'hémoglobine est un tétramère formé par l'association de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes alpha (ou globines alpha) composées chacune de 141 acides aminés et deux chaînes bêta (ou globines bêta) de 146 acides aminés. Chacune des chaînes adopte une conformation spatiale lui donnant une forme globuleuse et ménageant une «poche» superficielle dans laquelle se trouve logé l'hème, structure non protéique contenant un atome de fer (c'est à ce niveau que se lie l'oxygène). La cohérence du tétramère (structure quaternaire de l'hémoglobine $\alpha_2\text{-}\beta_2$) résulte de liaisons dues aux chaînes latérales hydrophobes des acides aminés situés à la périphérie de chaque globine (*Bailly, et al., 2020*).

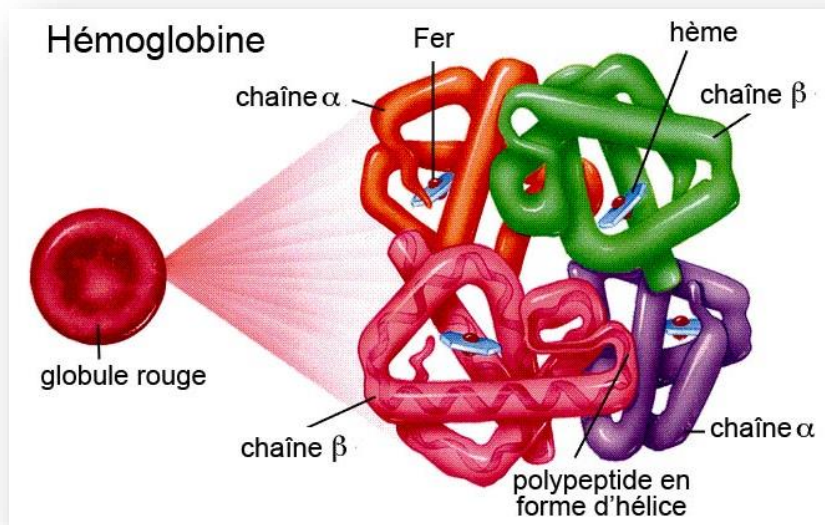


Figure 16: Schéma et structure de base d'Hémoglobine (*Probio, 2018*).

3.3. L'hémolyse sanguine

3.3.1. Définition de l'hémolyse :

Les globules rouges ont une durée de vie de 120 jours. Chaque jour, environ 1% des globules rouges meurent ou sont détériorés dans la circulation sanguine, il s'agit de l'hémolyse physiologique. Cependant, une hémolyse pathologique peut prendre place et détruire des érythrocytes avant leur vieillissement. C'est ce qu'on abordera par la suite (*Geoff, 2021*).



Figure 17: Prélèvements hémolysés (*Treves, 2016*).

3.3.2. Types d'hémolyse :

L'hémolyse peut être : Aiguë, chronique ou épisodique. Elle peut également être : Extravasculaire, intravasculaire ou les deux (*Braunstein, 2020*).

➤ L'hémolyse physiologique :

L'hémolyse physiologique est la destruction de l'érythrocyte après une durée de vie de 120 jours par vieillissement, elle est compensée immédiatement par la moelle osseuse, sans répercussion clinique ni biologique (*Kacha, 2020*). Elle peut être majoritairement par un mécanisme intratissulaire (phagocytose : 85%) ou minoritaire par un mécanisme intravasculaire par hémolyse intravasculaire (15%) (*Dr.Achab, 2019*). Donc on a deux sièges de l'hémolyse physiologique :

➤ Hémolyse extravasculaire (intratissulaire) :

Représente 85% de l'hémolyse à l'état normal, elle est assurée par les macrophages de la moelle osseuse (minimum 50 %). Le reste d'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans de la rate et le foie. Cette phagocytose porte sur des érythrocytes dont le vieillissement s'est traduite par des modifications biochimiques, des modifications morphologiques et aussi des modifications de la plasticité(*Dr.Otmani, 2009*).

Une suite de réactions va dissocier l'hémoglobine en globine et en hème :

- ❖ La globine est dégradée (catabolisme des protéines).
- ❖ Le fer de l'hème est recyclé dans l'érythropoïèse ou stocké dans les macrophages.
- ❖ L'hème est dégradé par l'hème oxydase pour produire la biliverdine puis la bilirubine.
- ❖ La bilirubine libre soluble dans les graisses mais insoluble dans l'eau, elle est libérée hors des macrophages et véhiculée dans le plasma par l'albumine, qui la transporte jusqu'aux hépatocytes.
- ❖ La bilirubine est glycuconjuguée dans les hépatocytes devient soluble.
- ❖ La bilirubine est ensuite excrétée par la bile dans le duodénum où elle est transformée en stercobiline (éliminée dans les selles) et en urobilinogène et urobiline dont une partie (15%) est réabsorbée (cycle entéro-hépatique) et finalement éliminée dans les urines (*Kacha, 2020*).

▪ Hémolyse intravasculaire :

Représente 15% de l'hémolyse physiologique et se déroule au sein même de la circulation sanguine. C'est une voie accessoire à l'état physiologique, ne concerne qu'une infime partie des érythrocytes sénescents qui voient leur membrane se détruire par lyse osmotique(*Kacha, 2020*)des GR vieillis ou

fragmentation (diminution de déformabilité) dans les capillaires de taille réduite (*Pr.Zandecki, et al., 2012*) ou par perte de déformabilité au niveau de la microcirculation des capillaires (*Kacha, 2020*).

Dans ce cas, l'hémoglobine est libérée dans le plasma ou elle forme un complexe avec l'haptoglobine, synthétisé par le foie d'où l'hémoglobinémie élevée. Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradée (la taille du complexe haptoglobine-hémoglobine ne lui permet pas de traverser le glomérule rénal) (*Dr.Otmani, 2009*), puis éliminée dans les urines d'où hémoglobinurie et hémosidérinurie (qui peut altérer la fonction rénale jusqu'à l'anurie et l'insuffisance rénale) (*Dr.Ouchenane, 2015*).

➤ L'hémolyse pathologique :

L'hémolyse pathologique est due à un vieillissement prématuré des GR, une destruction indépendante de leur âge en moins de 120 jours. Il s'agit d'une exagération du phénomène physiologique avec diminution de la durée de vie du GR ce qui entraîne une anémie hémolytique souvent très grave (*Dr.Otmani, 2009*). On distingue deux tableaux cliniques :

- Hémolyse chronique intratissulaire : concerne essentiellement les anémies hémolytiques congénitales (anomalie d'un des constituants du globule rouge), corpusculaire (*Dr.Ouchenane, 2015*).
- Hémolyse aigue intravasculaire : concerne essentiellement les anémies hémolytiques acquises par anomalie de l'environnement du globule rouge, extra-corpusculaire (*Dr.Ouchenane, 2015*).

3.3. Anti-hémolytiques :

Un médicament anti-hémolytique retarde ou inhibe la lyse des globules rouges. Plusieurs existent, nous citerons l'acide folique, le complément de fer, la vitamine B12 et les corticoïdes (*Bachy, et al., 2015*). Ces dernières années, le domaine de la recherche scientifique et la médecine traditionnelle a tendance de traiter les anémies hémolytiques en investigant de nouvelles substances anti-hémolytiques d'origine végétale à cause de leurs richesses en molécules bioactives et leur diverse propriété pharmacologique, pour remplacer les anti-hémolytiques synthétiques.

De nombreuses études sur différentes plantes démontrent l'effet anti-hémolytique des extraits végétaux tel que les polyphénols, antioxydants naturels, 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 dans la couche lipidique externe de la membrane érythrocytaire et modifie 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*). Néanmoins, le mécanisme d'action des biomolécules composant ces extraits n'est pas encore élucidé et plusieurs hypothèses ont été émises.

D'une autre part, les polyphénols diminueraient la concentration membranaire de cholestérol, ce qui améliorerait la fluidité membranaire de l'érythrocyte. Les polyphénols peuvent se lier à la surface de la membrane de l'érythrocyte, influant ainsi sur la position du cholestérol (*Aberrane, et al., 2019*).



Matériel et méthodes

Ce travail a été effectué au niveau 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 ABOU BEKR BELKAID de Tlemcen.

Notre travail a porté sur l'étude de l'activité anti-hémolytique des extraits de l'écorce de clémentine (*Citrus clementina*). Ceci afin de déterminer la concentration optimale des polyphénols, citroflavonoïdes et aussi les tanins qui permettent de protéger les globules rouges de l'hémolyse.

1. Préparation du matériel végétal :

1.1. Prétraitement :

L'écorce de chaque fruit de clémentine est rincée à l'eau de robinet, afin d'éliminer les impuretés, égouttée puis séchée à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant dix jours pour préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Après séchage, elle est réduite séparément en une poudre fine à l'aide d'un moulin électrique puis tamisée avec un tamis. La poudre obtenue prête à être utilisée, est conservée dans des flacons ombrés en verre à 4°C.



Figure 18: L'écorce de Clémentine en poudre (*Pinterest, 2014*).

1.2. Délipidation (dégraissage) :

Une délipidation de la matière végétale est une technique d'extraction (technique standard) décrite en 1879 par **Franz Von Soxhlet**. Son principe est d'éliminer les pigments et les lipides par macération dans l'hexane. Un extracteur de Soxhlet (ou appareil de Soxhlet) est une pièce de verrerie nommée après son inventeur Franz Von Soxhlet. Utilisé en chimie analytique et en chimie organique, il permet l'extraction par solvant continue d'une espèce chimique contenue dans une poudre solide.

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 placé dans la chauffe ballon.

Le passage des vapeurs d'hexane à travers l'échantillon emportant la matière grasse dans le ballon.

La poudre obtenue nommée tourteau, est séchée dans l'étuve.

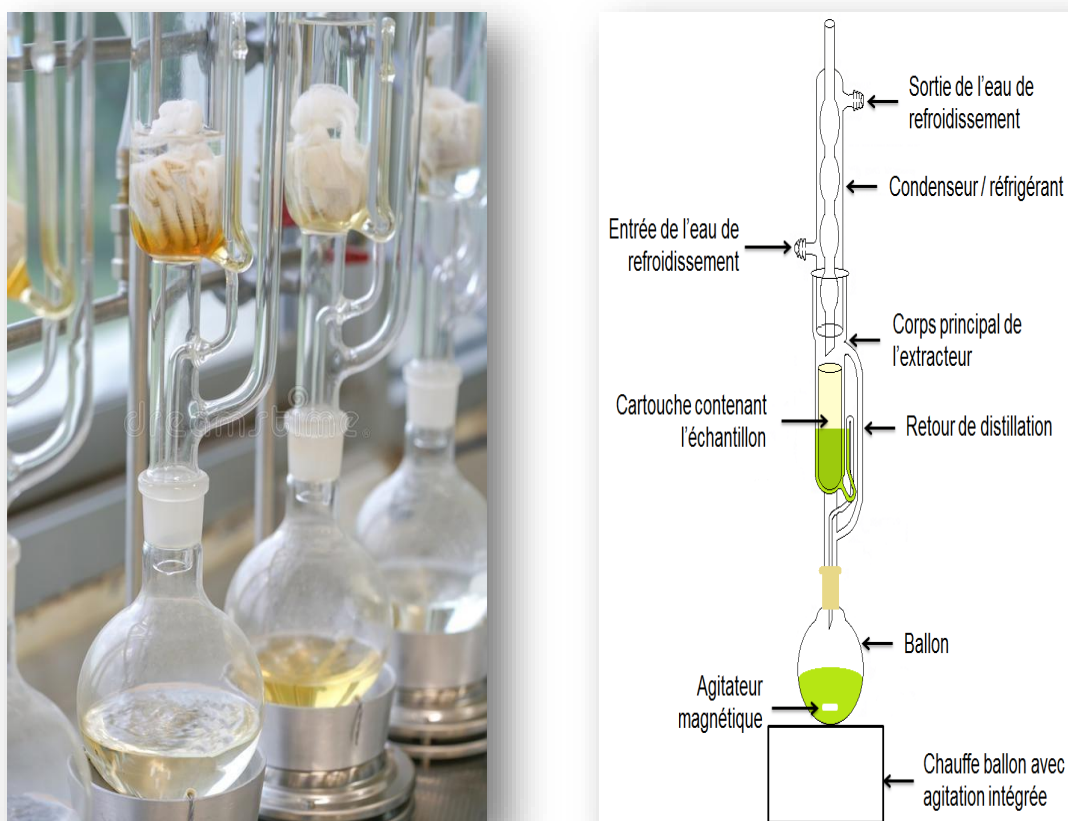


Figure 19 : Extracteur de Soxhlet (Nurkovic, 2021).

2. Extraction des polyphénols totaux :

Extraction à chaud des composés phénoliques est réalisée selon la méthode de **Yu et Dahlgren**, par l'utilisation de l'appareil sous reflux pendant 2 heures. Dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant, 5 g de la poudre végétale est mise en contact de mélange méthanol /eau distillée (70V/30V), l'ensemble est porté à reflux pendant 2h à une température de 60°C. La filtration permet par la suite la séparation des deux phases ; la phase aqueuse et la phase solide. La phase aqueuse (méthanol/eau distillée) est évaporée par un évaporateur rotatif à une température de 50 °C pendant 2h.

3. Extraction des citroflavonoïdes :

Le principe utilisé par **Bruneton** pour l'extraction des flavonoïdes, diffère selon leur type. Il dépend du degré de solubilité du type de flavonoïdes dans des solvants organiques. Certains sont solubles dans l'eau et l'alcool, d'autres dans des solvants organiques.

Les étapes sont les suivantes : Après extraction et évaporation des polyphénols, les résidus secs sont repris par de l'eau chaude de même volume. Dans une ampoule à décantation, 10 ml de l'acétate d'éthyle sont épuisés, permettant l'extraction des flavonoïdes. Cette étape est répétée 2 à 3 fois pour extraire le maximum des flavonoïdes. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu sec est récupéré dans 1 ml de méthanol.

4. Extraction des tanins :

Selon la méthode de **Zhang et ses compagnons**, une quantité de 10 g de tourteau est laissé pour macération dans 200 ml du mélange acétone/eau distillée (85/15 v/v) durant 3 jours à température ambiante. Le mélange est filtré puis évaporé dans le rota vapeur à 45°C afin d'éliminer l'acétone. En utilisant une ampoule à decanter, la phase aqueuse est reprise dans 50 ml de dichlorométhane 2 fois afin d'éliminer les pigments et les traces des lipides. La phase aqueuse est extraite puis lavée avec 50 ml d'acétate d'éthyle 4 fois de suite. Le mélange des phases acétate éthylique est évaporé à sec 45°C dans l'étuve durant une nuit complète.

5. Préparation de la suspension des érythrocytes :

Une prise de sang a été effectuée sur des individus sains à partir du pli du coude. Les échantillons de sang frais sont collectés puis mis dans des tubes héparinisés. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 tour/min dans un centrifugeur pendant 10 minutes, dans le but de séparer les constituants du sang. Après l'élimination du plasma et les cellules polynucléaires, le culot d'érythrocytes est lavé 3 fois de suite avec de l'eau physiologique. Le volume a été mesuré et reconstitué sous forme de suspension de 10% (v/v) d'érythrocytes avec une solution physiologique.

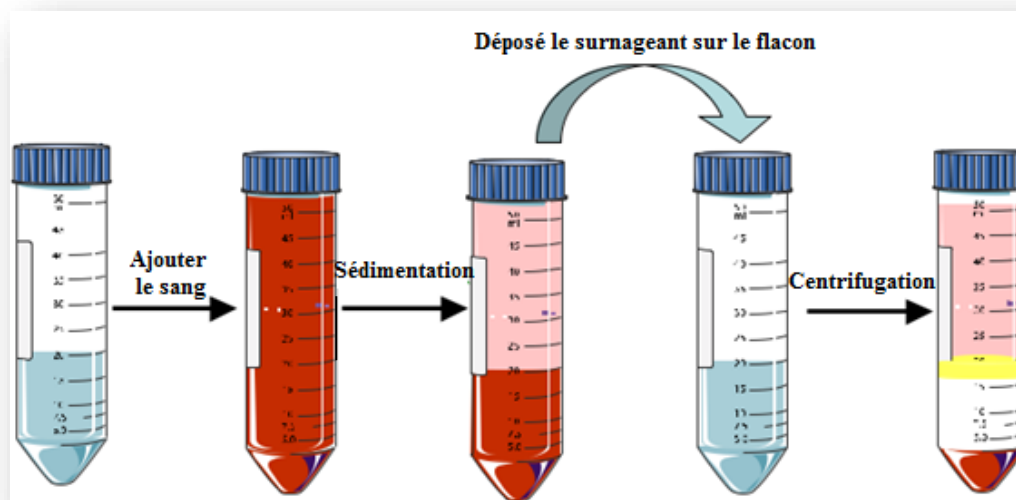


Figure 20: Préparation de la suspension des érythrocytes (GR) (Hivebench, 2017).

6. Test de cytotoxicité :

6.1. Principe :

Il s'agit d'une technique colorimétrique qui a pour but de déterminer la mortalité cellulaire induite par un composé particulier à des concentrations différentes dans un échantillon.

Le principe est de mettre en contact les érythrocytes avec les extraits méthanolique de l'écorce de la clémentine à différentes concentrations (50-2000 $\mu\text{g/ml}$), dans une solution isotonique et de suivre le taux hémoglobine libérée par les érythrocytes.

6.2. Mode opératoire :

A partir d'une solution mère d'extrait de polyphénols, citroflavonoïdes et tanins sont préparées plusieurs dilutions (1500, 750, 375, 187, 94, 47 $\mu\text{g/ml}$). Les mêmes procédures sont établies avec l'acide gallique, les volumes pris diffèrent.

Une Prise de 800 μl des extraits à différentes concentrations d'extrait sont introduites dans des tubes à hémolyse. 200 μl de globules rouges à 10 %, sont ajoutés, les tubes sont ensuite incubés pendant 30 minutes à 37°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. La lecture de la densité optique est réalisée à 560 nm contre le blanc.

Dans les mêmes conditions et la même démarche expérimentale préparée ; Un control positif: 200 μl de globule rouge avec 800 μl d'eau distillé et un control négatif : 200 μl de globules rouges avec 800 μl d'eau physiologique.

Matériel et méthode

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 a été mélangé avec un volume de 0,4ml de la suspension de GR.

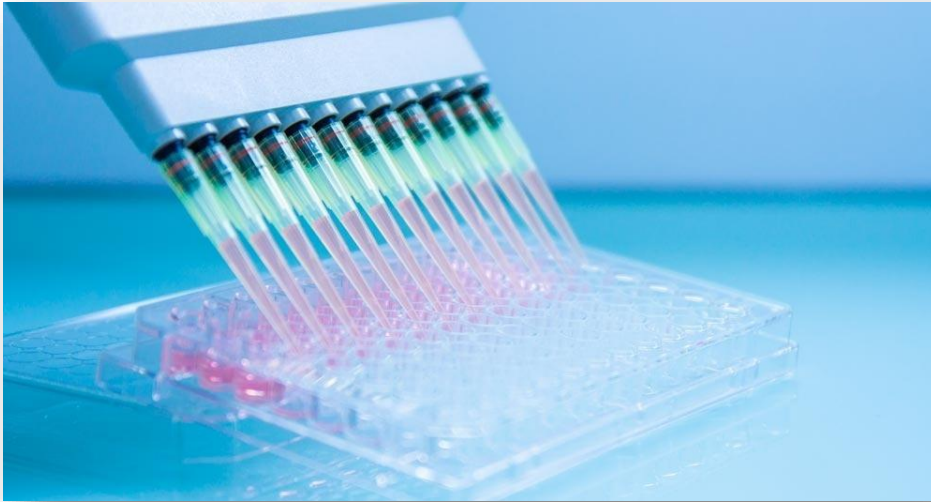


Figure 21: Test de cytotoxicité d'extrait de polyphénols, citroflavonoïdes et tanins (*In vitro Drug Testing, 2015*).

7. Test d'hémolyse :

7.1. Principe :

Ce test consiste à déterminer la capacité de l'extrait à empêcher la libération de l'hémoglobine au cours de l'hémolyse des érythrocytes, induite par des changements de température et du pH.

7.2. Mode opératoire :

Des dilutions sont préparées à partir d'une solution mère de l'extrait, de l'acide gallique et du Diclofénac. Un volume de 0,5 ml d'extraits, d'acide gallique et diclofénac à différentes concentrations (15, 30, 75, 150, 300) $\mu\text{g/ml}$ sont introduits dans des tubes à hémolyse. Dans chaque tube est ajouté un volume de 1,5ml de solution tampon phosphate (0,9 % NaCl, $\text{pH}=7,4$). Ensuite un volume de volume de 2ml d'une solution hypo-saline (0,36 % NaCl) est ajouté. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 20min. Un volume de 0,5ml de solution de suspension d'érythrocytes est ajouté à chaque tube. Les tubes sont incubés pour une deuxième fois à 56°C pendant 1 heure. Après refroidissement, les tubes sont centrifugés à 2500 tours /minutes pendant 5 minutes. La lecture du surnageant est réalisée à 560 nm dans un lecteur de plaque ELISA.



Résultats et interprétation

1. Test de cytotoxicité :

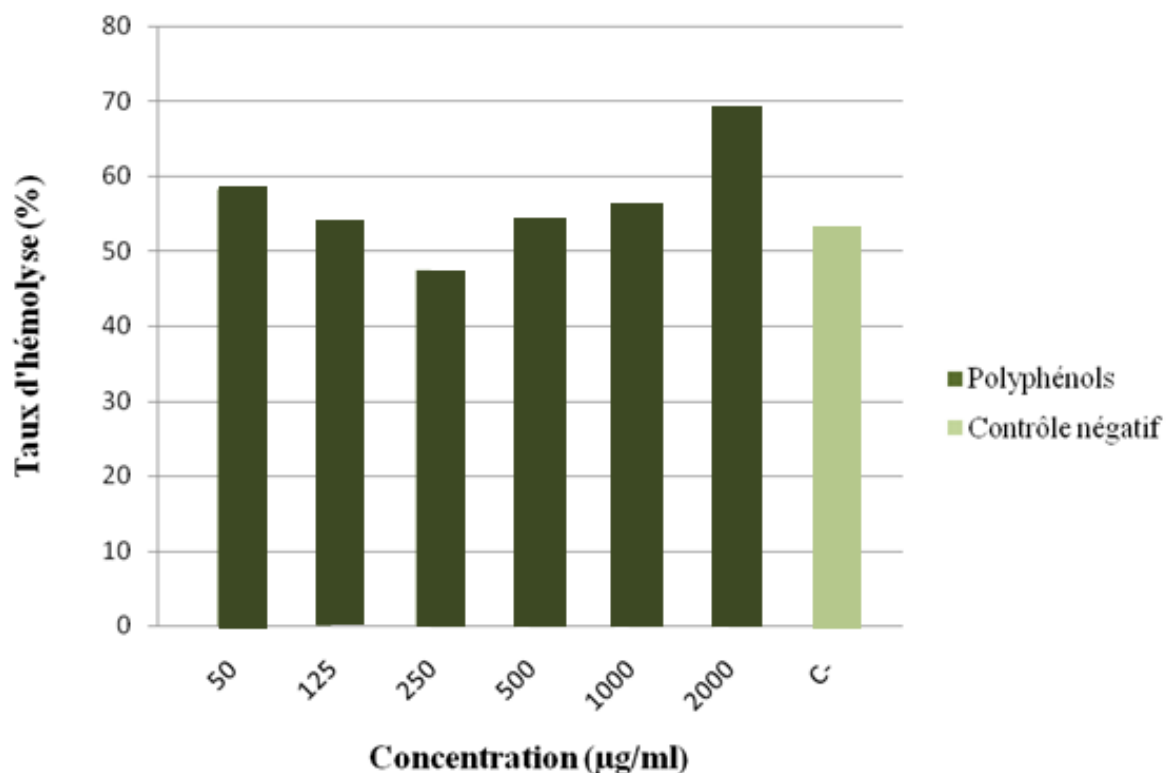
1.1 . Polyphénols totaux :

Le test de cytotoxicité a été réalisé *in vitro*, sur des érythrocytes humains traités par différentes concentrations des extraits de l'écorce de clémentine, en comparaison avec une molécule de référence ; l'acide gallique.

Le pourcentage de l'hémolyse a été évalué pour chaque extrait, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des érythrocytes, les comparant à des contrôles ; le contrôle négatif (C-) constitué d'une solution érythrocytes/eau physiologique, et le contrôle positif (C+) constitué d'une solution érythrocytes/eau distillée.

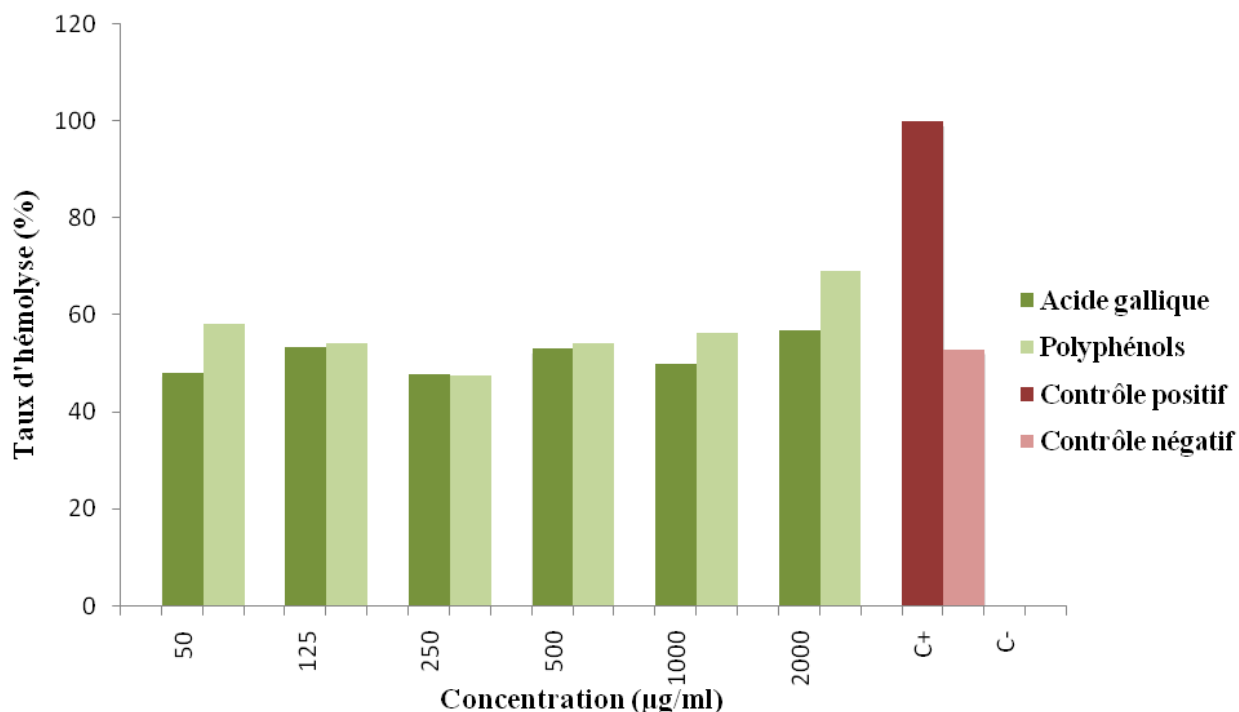
Les résultats obtenus sont représentés dans les figures :

Figure 22: Effets des différentes concentrations des polyphénols sur la toxicité des globules rouges.



Les résultats 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 23: 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 %.

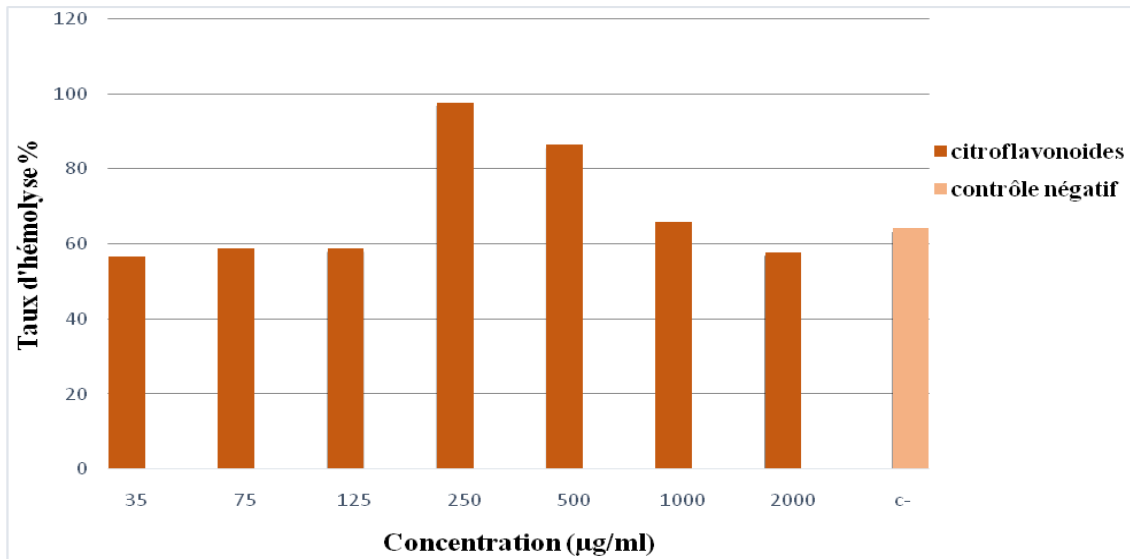
1.2. Citroflavonoïdes :

Le test de cytotoxicité a été réalisé *in vitro*, sur des érythrocytes humains traités par des différentes concentrations d'extrait de citroflavonoïdes de l'écorce de la clémentine, en comparaison avec des molécules de référence, comme l'acide gallique.

Le pourcentage d'hémolyse a été évalué pour chaque concentration, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des érythrocytes, et en comparaison à des contrôles; le contrôle négatif (C-) constitué d'une solution de érythrocytes/eau physiologique.

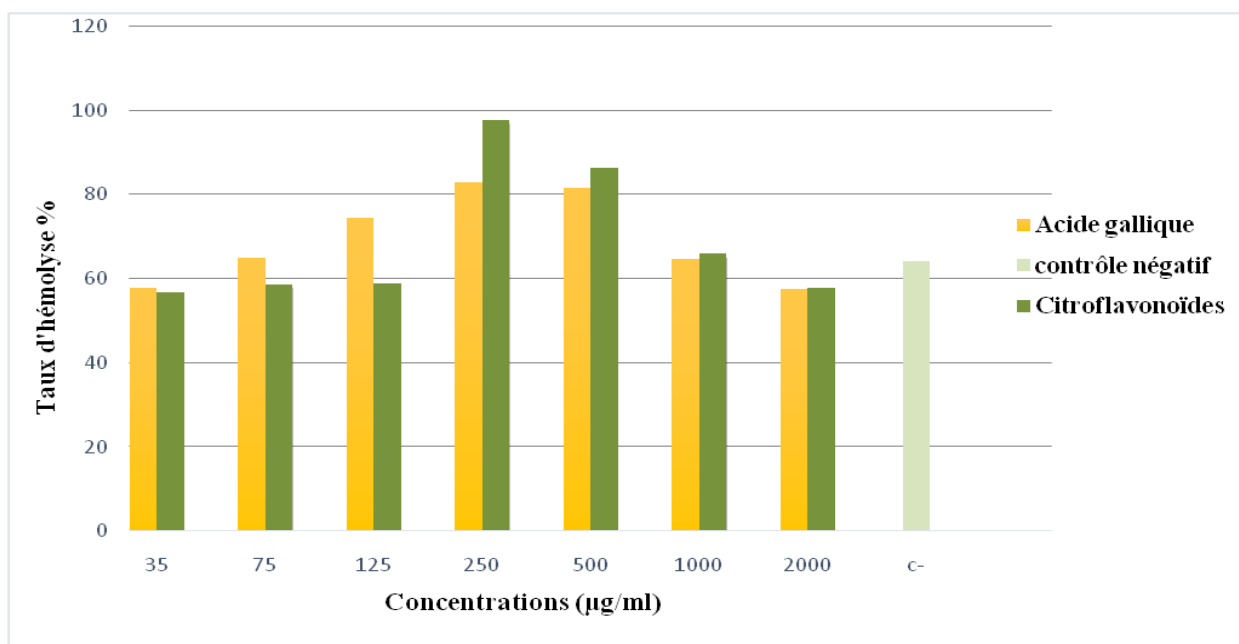
Résultats et interprétation

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



Les résultats montrent que les citroflavonoïdes 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 citroflavonoïdes présentent un taux d'hémolyse inférieur au contrôle négatif.

Figure 25: Comparaison des différentes concentrations en acides gallique et citroflavonoïdes sur la toxicité des globules rouges.



Résultats et interprétation

Comparé à l'acide gallique, les citroflavonoïdes présentent une moindre toxicité pour les concentrations 35, 75 et 125 $\mu\text{g/ml}$.

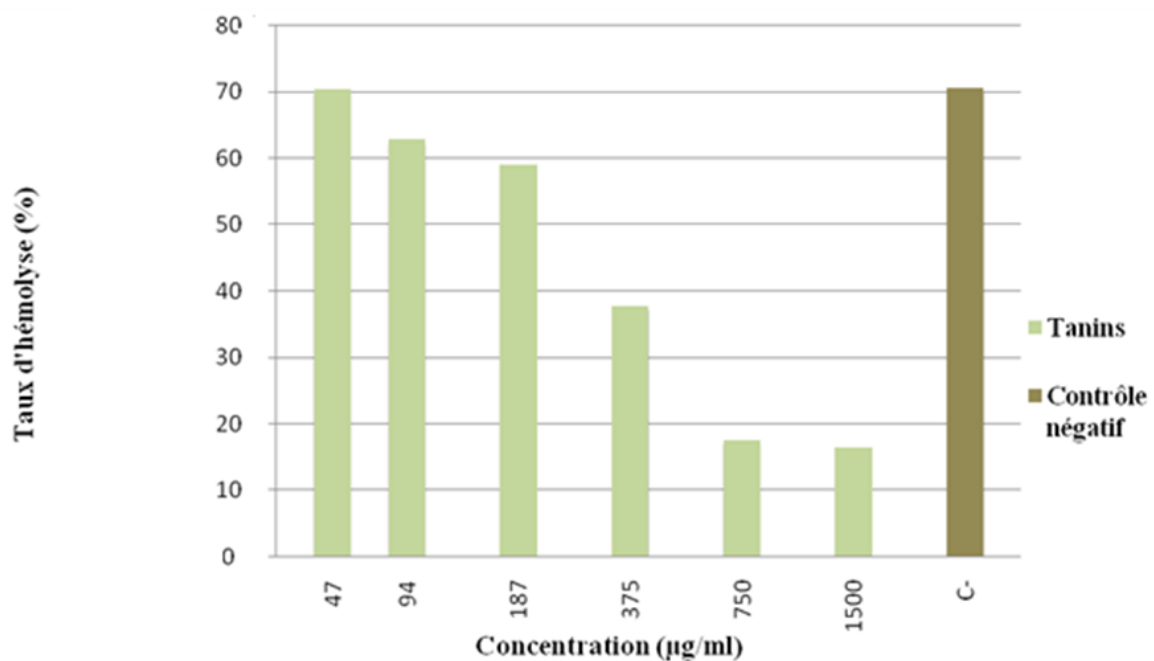
1.3. Tanins :

Le test de cytotoxicité a été réalisé *in vitro*, sur des érythrocytes humains traités par différentes concentrations d'extrait de tanins de l'écorce de clémentine, en comparaison avec des molécules de référence.

Le pourcentage de l'hémolyse a été évalué pour chaque extrait, en mesurant l'absorbance de l'hémoglobine libérée des érythrocytes, et en comparaison à des contrôles ; un contrôle négatif constitué d'une solution érythrocytes/eau physiologique, et un contrôle positif constitué d'une solution érythrocytes/eau distillée.

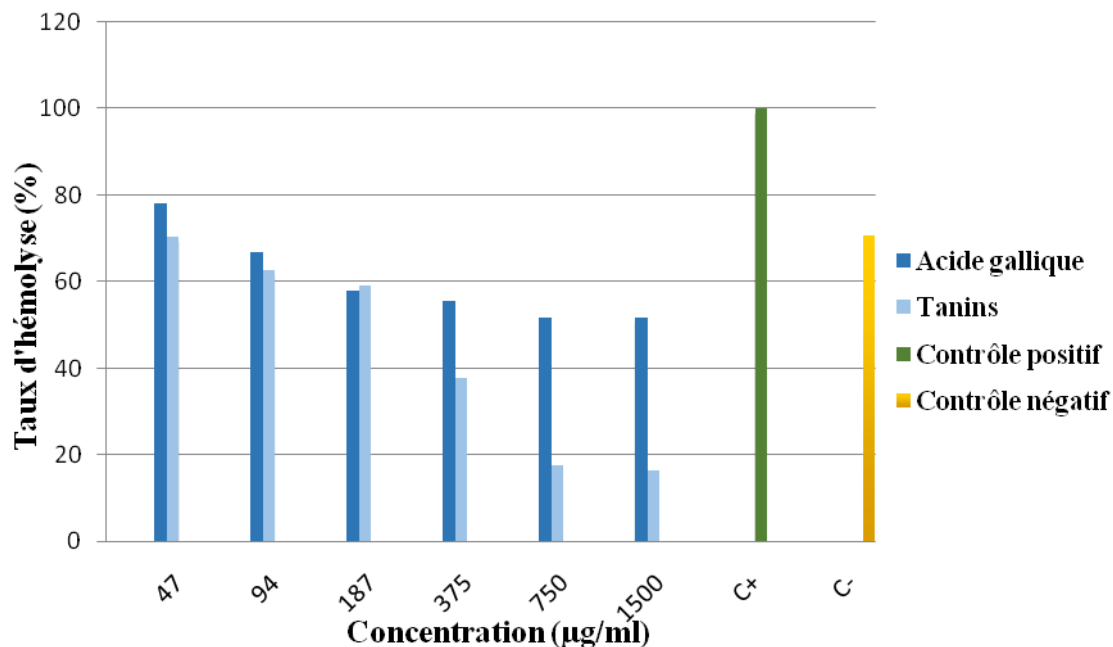
Les résultats obtenus sont représentés dans les figures :

Figure 26: Effet des différentes concentrations de tanins sur la cytotoxicité des globules rouges.



Les résultats montrent le taux d'hémolyse varie est inversement proportionnel aux concentrations des tanins. Le taux d'hémolyse est de 70.42 % pour la concentration 47 $\mu\text{g/ml}$ de tanins. Ce taux diminue jusqu' à 16.46 % à différentes concentrations 1500 $\mu\text{g/ml}$ de tanins. Toutes les concentrations en tanins (allant de 47 à 1500 $\mu\text{g/ml}$) présentent un taux d'hémolyse diminué comparés au contrôle négatif.

Figure 27: Comparaison des différentes concentrations en acide gallique et tanins sur la cytotoxicité des globules rouges.



Les résultats montrent le pourcentage d'hémolyse à différentes concentrations d'échantillon de tanin en comparaison avec la molécule de référence qui est l'acide gallique. Selon les résultats obtenus, le pourcentage hémolytique en présence de tanin est diminué comparé à l'acide gallique et ce quel que soit la concentration.

2. Test d'hémolyse :

2.1. Polyphénols totaux :

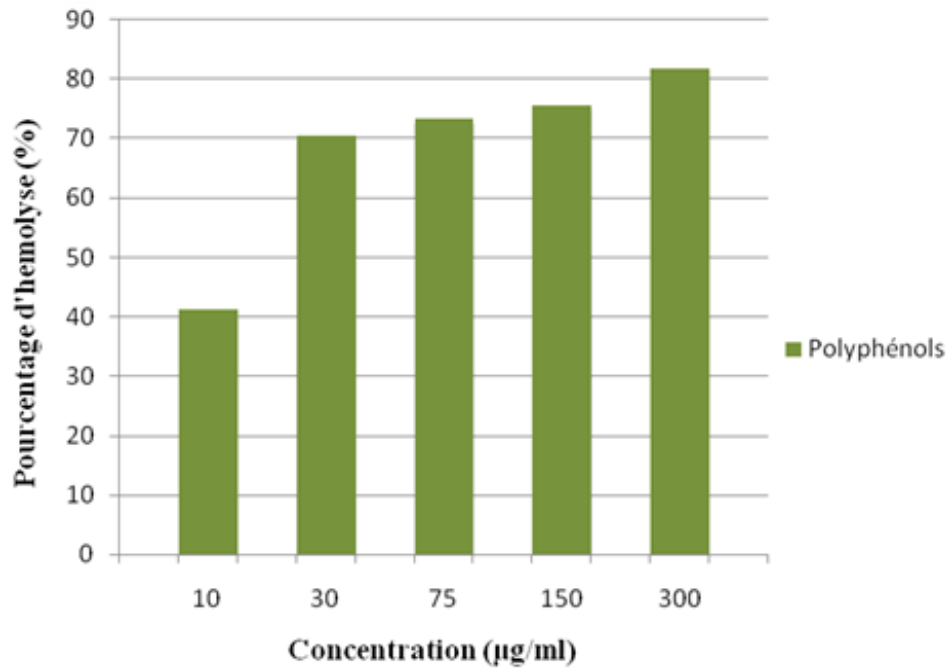
L'étude de l'activité anti-hémolytique a été réalisée *in vitro* sur des érythrocytes humains, en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains.

La stabilité membranaire a été évaluée en mesurant la libération de l'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration des différents extraits en comparaison avec des molécules de référence ; le diclofénac sodique étant un médicament anti-inflammatoire, et l'acide gallique étant un composé phénolique constituant des plantes médicinales.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures suivantes :

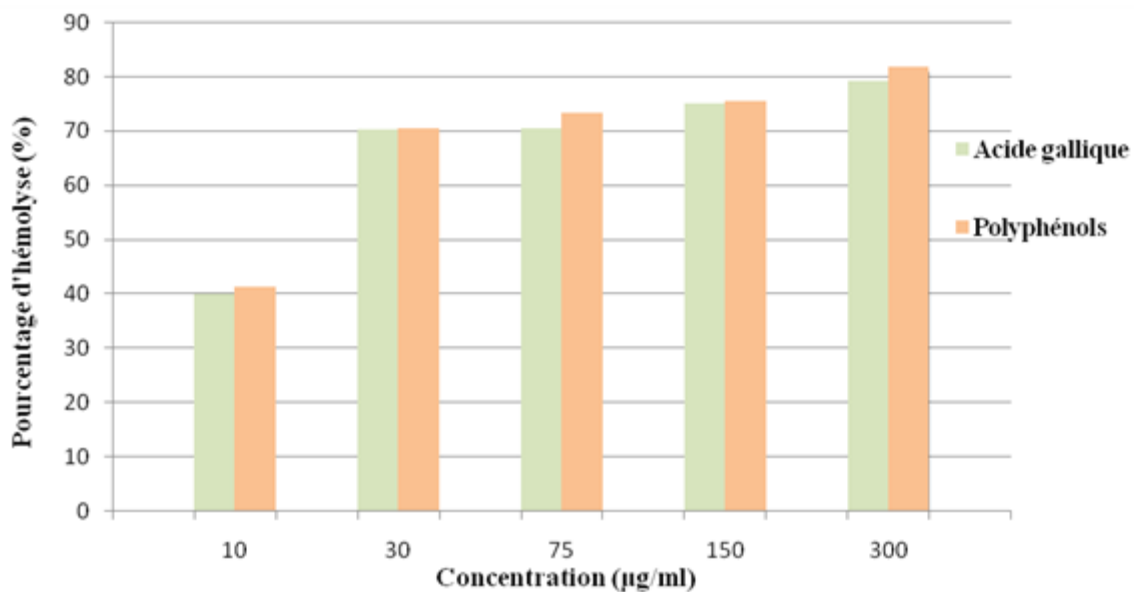
Résultats et interprétation

Figure 28: Effet des différentes concentrations des polyphénols sur le taux d'hémolyse.



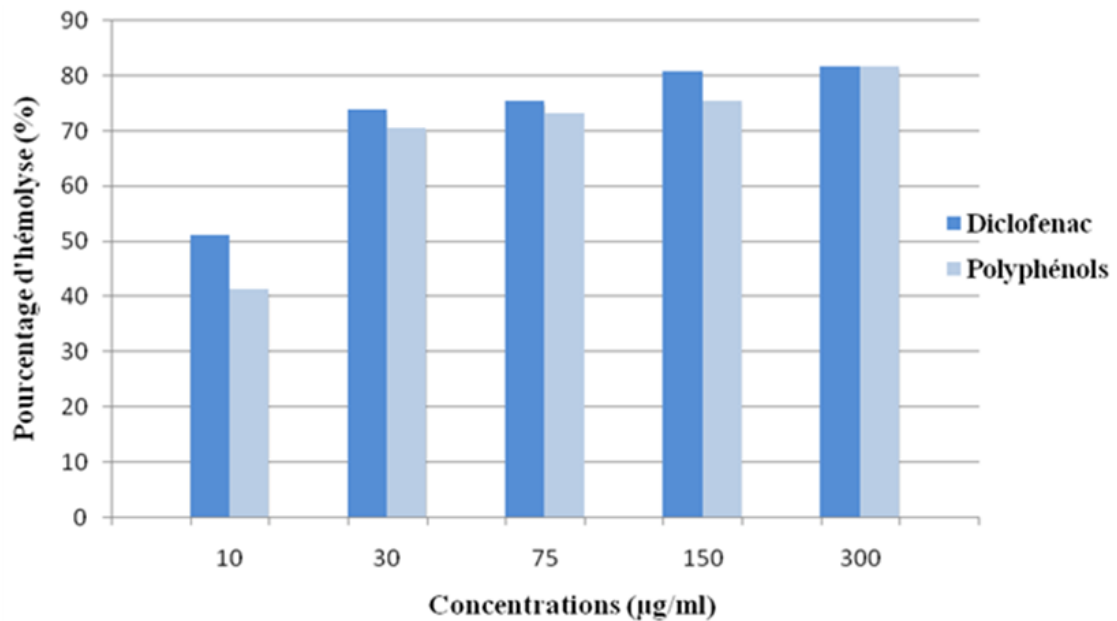
Les résultats montrent que l'extrait à faible concentration 10µg/ml a un effet stabilisateur de la membrane érythrocytaire important avec un pourcentage 41.3%. Cette activité hémolytique continue à évoluer de manière croissante dose-dépendante pour atteindre un taux d'hémolyse très important 81.9% à la concentration maximale 300µg/ml.

Figure 29: Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et polyphénols.



Comparé à l'acide gallique, les résultats montrent que l'extrait exerce une lyse plus élevée de la membrane érythrocytaire.

Figure 30: Comparaison du taux d'hémolyse entre diclofénac et les polyphénols.



Les résultats montrent que l'extrait présente une meilleure protection contre la lyse des érythrocytes, comparé au diclofénac pour les concentrations 10, 30, 75, 150 $\mu\text{g/ml}$.

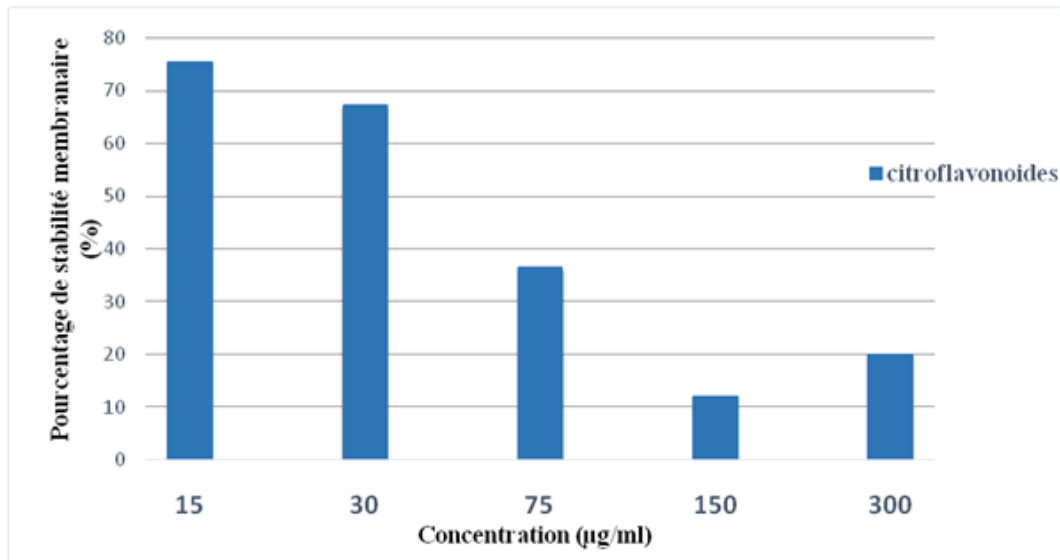
2.2.Citroflavonoïdes :

L'étude de l'activité anti-hémolytique a été réalisée *in vitro* sur des érythrocytes humains, en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains (GRH).

La stabilité membranaire a été évaluée en mesurant la libération d'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration d'extrait de citroflavonoïdes, en comparaison avec des molécules des référence ; l'acide gallique, et le diclofénac sodique.

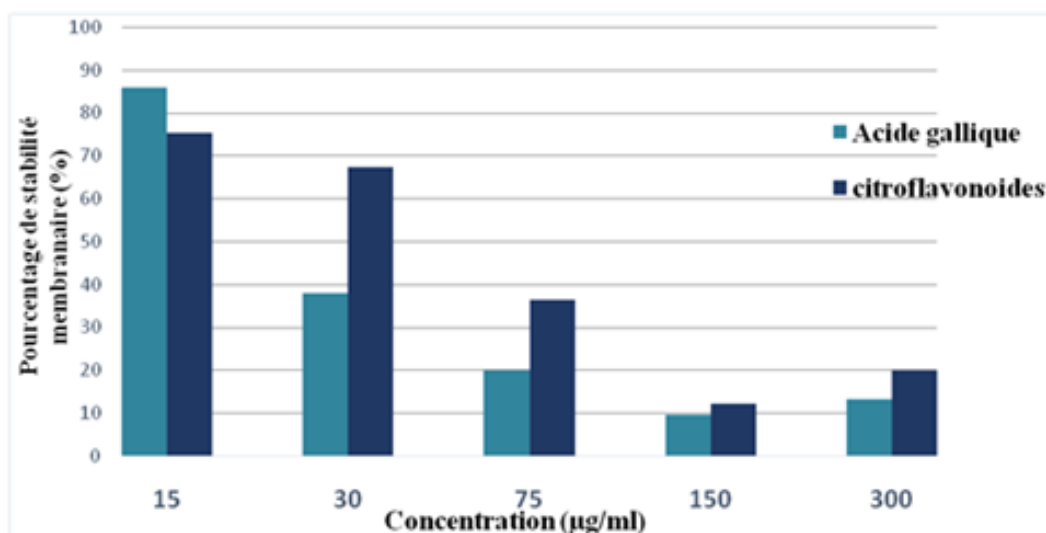
Les résultats obtenus sont représentés dans les figures :

Figure 31: Effet des différentes concentrations des citroflavonoïdes sur le taux d'hémolyse.



Les résultats montrent que les concentrations minimales 15 µg/ml des citroflavonoïdes 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 32: Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et les citroflavonoïdes.



Les résultats montrent que l'acide gallique à la concentration 15 µg/ml présente l'effet optimal 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.

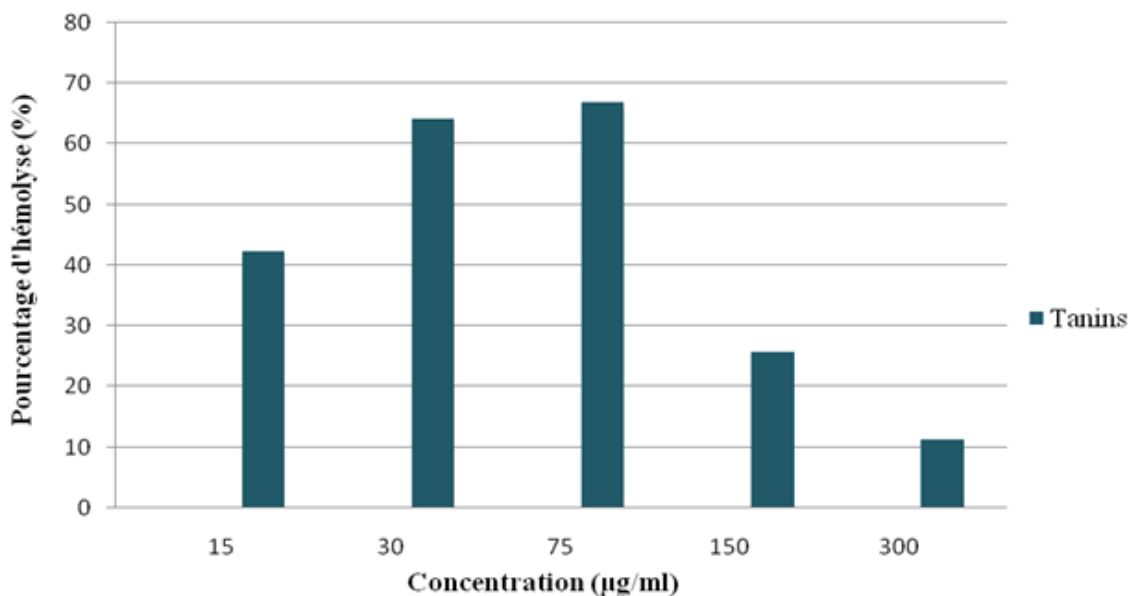
2.3. Tanins :

L'étude de l'activité anti-hémolytique a été réalisée *in vitro* sur des érythrocytes humains, en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains.

La stabilité membranaire a été évaluée en mesurant la libération d'hémoglobine à 560 nm pour chaque concentration d'extraits en comparaison avec des molécules de référence ; le diclofénac sodique comme étant un médicament anti-inflammatoire, et l'acide gallique étant un composé phénolique constituant des plantes médicinales.

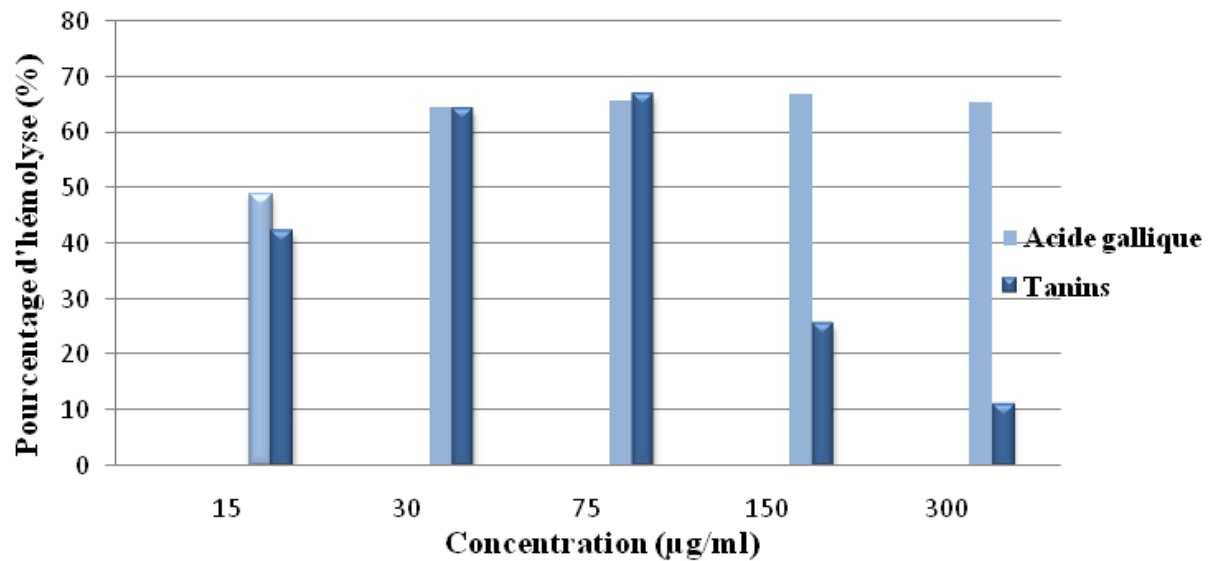
Les résultats obtenus sont représentés dans les graphes :

Figure 33: Effet des différentes concentrations des tanins sur le taux d'hémolyse.



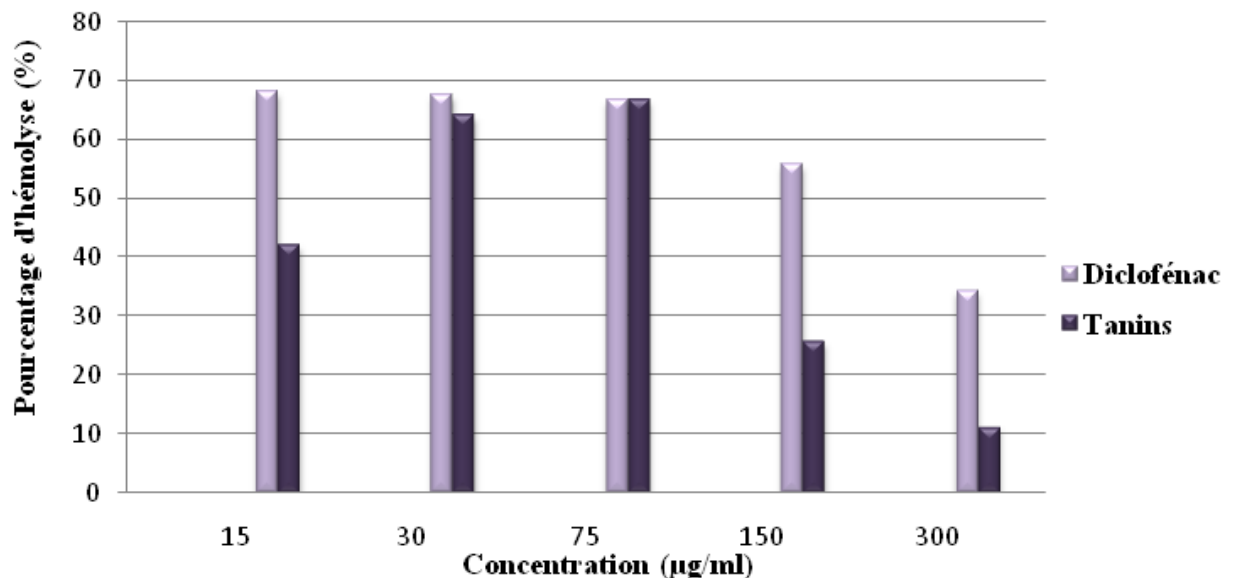
Les résultats montrent le pourcentage d'hémolyse par rapport à différentes concentrations de tanin. On remarque qu'à la concentration 15 µg/ml, l'hémolyse est de 42.23% puis elle augmente à son maximum 66.85% à 75 µg/ml. Elle diminue pour les concentrations 150 et 300 µg/ml pour atteindre 16.42%.

Figure 34: Comparaison du taux d'hémolyse entre l'acide gallique et les tanins.



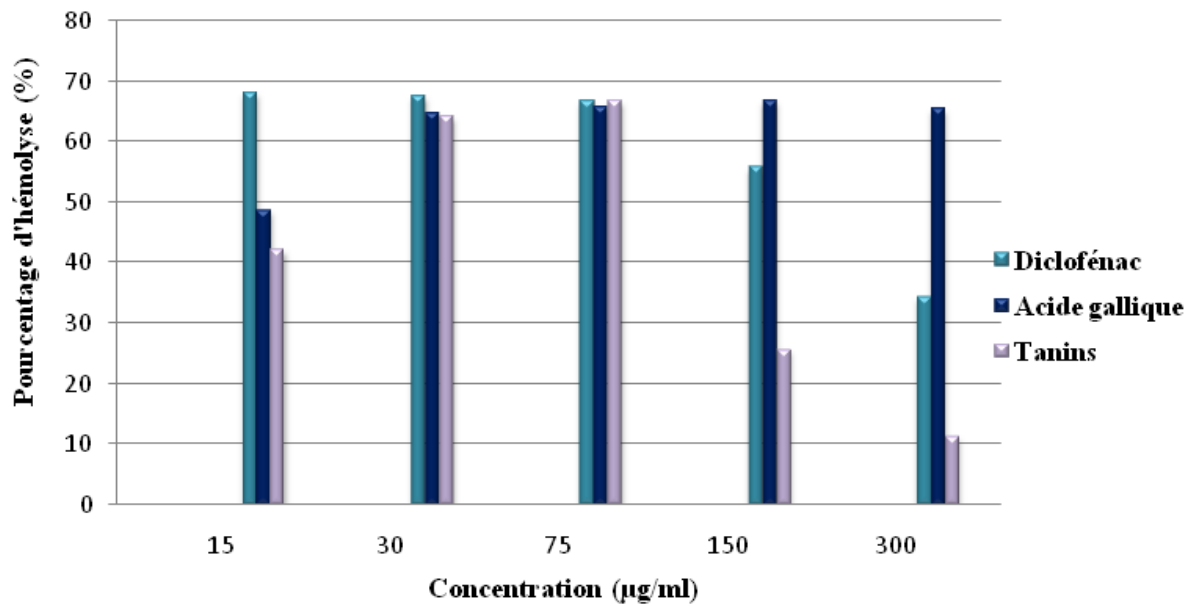
Les résultats montrent l'effet hémolytique des tanins comparativement avec l'acide gallique à différentes concentrations. D'après ces résultats, le pouvoir anti-hémolytique de l'acide gallique est moins important que celui des tanins puis ce que le pourcentage d'hémolyse de l'acide gallique est plus élevée que celui des tanins. Ceci étant observé pour les concentrations 15, 30, 150 et 300 µg/ml.

Figure 35: Comparaison de taux d'hémolyse entre le diclofénac et tanins.



Ces résultats nous ont permis de comparer l'hémolyse des globules rouges à différentes concentrations entre les tanins et le diclofénac. Ils montrent un taux d'hémolyse diminué pour les tanins comparé au diclofénac et ce pour toutes les concentrations.

Figure 36: Comparaison du taux d'hémolyse entre le diclofénac, l'acide gallique et les tanins.



Ces résultats montrent que les tanins ont une très bonne protection contre l'hémolyse comparée au diclofénac et acide gallique. L'effet anti-hémolytique des tanins atteint un summum à la concentration de 300 µg/ml.



Discussion

Les polyphénols possèdent une large activité biologique *in vitro* (Antibactériennes, Anti cancérigène, Anti-inflammatoire, Anti-hémolytique... etc.) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques (**Bensenouci, et al., 2020**).

L'objectif de ce travail est d'étudier *in vitro* l'activité anti-hémolytique des polyphénols, citroflavonoïdes et tanins extraits à partir de l'écorce de la clémentine.

Le test de cytotoxicité est un test réalisé *in vitro*, qui permet d'évaluer le seuil de toxicité des extraits vis-à-vis des érythrocytes. 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 (**Bensenouci, et al., 2020**).

D'après les travaux de **Chopade et al en 2012**, l'ingestion des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, dans la membrane plasmique des érythrocytes améliorent la stabilité de ces dernières contre la lyse hypotonique. C'est dû à l'augmentation du 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 les travaux de **Galati et al en 2002** sur l'origine de la perturbation membranaire des érythrocytes, les polyphénols alimentaires étaient métabolisés par la peroxydase, formant des radicaux phénoxyles pro-oxydants. Ces radicaux 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'oxydent avec l'hémoglobine ce qui cause la perturbation de la structure membranaire et donc l'hémolyse des érythrocytes.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de polyphénols totaux à un pouvoir cytotoxique le plus bas à la concentration de 250 µg/ml, c'est à cette concentration que l'extrait présente une moindre hémolyse comparée à l'acide gallique. L'effet cytotoxique de l'extrait des polyphénols totaux augmente et atteint un taux de 69.05% à la concentration de 2000 µg/ml. Le pouvoir hémolytique des extraits est probablement lié à leurs compositions chimiques. A fortes doses, les polyphénols peuvent conférer des propriétés toxiques.

Concernant l'effet des tanins, les résultats obtenus montrent qu'ils ont un pouvoir cytotoxique bas à toutes les concentrations, notamment à la concentration 1500 µg/ml, comparée à l'acide gallique.

L'effet cytotoxique des tanins est inversement proportionnel avec l'augmentation des concentrations de l'extrait en tanin.

Concernant les citroflavonoïdes, les résultats obtenus montrent que l'extrait a un pouvoir cytotoxique plus bas pour les concentrations 35, 75 et 125 µg/ml comparé à l'acide gallique. L'effet cytotoxique de l'extrait de citroflavonoïdes augmente et atteint un maximum à la concentration 250 µg/ml. Les citroflavonoïdes s'avèrent, en analysant tous les résultats, qu'ils sont les moins toxiques à de faibles concentrations.

Pour le test anti-hémolytique, c'est un test réalisé *in vitro*, en utilisant la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains. L'évaluation de la stabilité membranaire en présence des polyphénols a été déterminée par la chaleur et l'hypotonie facteurs provoquant l'hémolyse. L'hypotonie crée un déséquilibre entre le milieu intracellulaire et extracellulaire, selon le gradient de concentration, l'eau pénètre dans les érythrocytes. Ces dernières se gonflent et deviennent sphériques. La perméabilité membranaire est accompagnée d'un mouvement des ions : entrée de Na⁺ et H₂O₂ sortie de K⁺, La membrane se rompt après une augmentation de volume, la cellule subit ainsi l'hémolyse permettant la sortie de l'hémoglobine et les autres composants intracellulaires. Comme l'hypotonie, les températures élevées, changent la morphologie des érythrocytes les rendant vulnérables à l'hémolyse en perturbant leurs membranes plasmiques (*Bensenouci, et al., 2020*).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait de polyphénols totaux à faible concentration 10µg/ml a un effet stabilisateur de la membrane érythrocytaire considérable avec un taux d'hémolyse de 41.3%. L'activité hémolytique continue à augmenter de manière croissante jusqu'à ce qu'elle atteigne un taux d'hémolyse le plus élevé 81.9% à la concentration maximale 300µg/ml. Comparé à l'acide gallique, l'extrait de polyphénols totaux à la concentration maximale de 300 µg/ml permet une meilleure protection contre la lyse de la membrane érythrocytaire. Comparé au diclofénac, les résultats montrent que l'extrait présente une meilleure protection contre la lyse des érythrocytes, pour les concentrations 10, 30, 75, 150 µg/ml.

Concernant l'extrait de tanins, les résultats montrent qu'à fortes concentrations 150 et 300 µg/ml, l'extrait a un effet stabilisateur de la membrane érythrocytaire avec un taux très important d'hémolyse de 16.42%. L'activité hémolytique des tanins augmente à son maximum 66.85% à 75 µg/ml. Le pouvoir anti-hémolytique de l'acide gallique est moins important que celui des tanins puis ce que le pourcentage d'hémolyse de l'acide gallique est plus élevée que celui des tanins pour les concentrations 15, 30, 150 et 300 µg/ml. Comparé au diclofénac, les résultats montrent un taux d'hémolyse diminué pour l'extrait de tanins pour toutes les concentrations. L'extrait présente une meilleure protection contre la lyse des membranes érythrocytaires.

Concernant les citroflavonoïdes, les résultats montrent que l'extrait à des concentrations minimales 15 µg/ml des citroflavonoïdes exercent une activité de protection contre la lyse de la membrane érythrocytaire maximale 75,31%. En augmentant les concentrations de l'extrait des citroflavonoïdes, le pourcentage de la protection diminue 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 importante de la protection de la lyse érythrocytaire 19,86%. Les résultats montrent que l'acide gallique à la concentration 15 µg/ml présente l'effet optimal protecteur de la membrane érythrocytaire 85,89% comparé à l'extrait. C'est 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.

L'étude de l'effet protecteur contre la lyse membranaire induite par la chaleur et l'hypotonie, les résultats montrent que l'extrait des polyphénols 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 extraits 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*).

D'après les travaux de **Gershfeld& Murayama en 1988**, les érythrocytes subis à des températures relativement élevées, deviennent progressivement sphériques. Cette déformation est la cause de la diminution de la capacité de 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.

Le Diclofénac, l'acide gallique et les polyphénols sont efficace pour inhiber l'hémolyse. Le diclofénac étant un anti-inflammatoire non stéroïdien très efficace, a un effet protecteur pour la membrane érythrocytaire. Il est doté d'une capacité de former une liaison hydrogène avec les molécules d'eau ou tête de phospholipide, 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. Comparé au diclofénac l'extrait a faible concentration 10µg/ml présente la meilleure protection contre l'hémolyse des érythrocytes 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.



Conclusion

Conclusion

L'étude des activités biologiques médicales devient de plus en plus le centre d'intérêt de nombreux chercheurs ces dernières années et cela dans divers pays, l'Algérie en faisant partie. Ces études ne cessent de prouver la nécessité d'élargir le spectre de l'utilisation des polyphénols, ces pertinentes molécules isolées à partir de plantes médicinales.

La démarche de cette étude est parfaitement transposable aux coproduits d'agrumes qui sont naturellement riches en antioxydants. On s'est particulièrement intéressé à la clémentine, fruit d'origine algérienne dont sa valeur reste à découvrir.

Cette étude a porté sur l'extraction des polyphénols, des citroflavonoïdes et des tanins de l'écorce de la clémentine pour l'utilisation des extraits comme inhibiteur d'hémolyse *in-vitro*. Pour cela les globules rouges humains ont été utilisés comme produits modèles.

A la suite de cette expérimentation il en ressort les conclusions suivantes :

- Les polyphénols sont toxiques à fortes doses dont la concentration de 2000 $\mu\text{g/ml}$ présente le taux d'hémolyse le plus élevé 69.05%, cependant le taux d'hémolyse le plus bas 47.5% pour les polyphénols est rencontré pour la concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$.
- Les tanins ont démontré une diminution de la perméabilité des globules rouges dont le taux d'hémolyse le plus bas 16,46% pour les tanins est rencontré pour la concentration de 1500 $\mu\text{g/ml}$.
- Pour les citroflavonoïdes, les résultats montrent qu'ils sont les moins toxiques à des faibles concentrations 35 $\mu\text{g/ml}$ représente le taux d'hémolyse le plus bas 56,61%.

A la lumière de ces résultats, les polyphénols sélectionnés dans ce travail, présentent une forte activité anti hémolytique et sont donc particulièrement intéressants pour leurs applications dans le domaine pharmaceutique, et pour leur capacité à préserver l'intégrité des membranes des globules rouges.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude ne constitue qu'une ébauche dans le domaine de recherche des antioxydants naturels, il serait intéressant d'étayer ce travail par :

- Investigation quantitative et qualitative, afin de déterminer tous les composés actifs dans les différentes parties du fruit de clémentine et d'identifier toutes molécules responsables de différents activités biologiques.

- Investigation plus profonde sur la toxicité des polyphénols, et sur le dosage optimal des polyphénols, et de leurs effets toxiques.
- Investigation sur d'autres méthodes plus prometteuses pour l'exploitation du potentiel anti-hémolytique, dans le but d'intensifier l'opération de l'extraction. Comme l'utilisation d'approches combinées appliquées de manière séquentielle telles que la technique d'extraction assistée par ultrasons ou la technique simultanée d'extraction par enzymes, ainsi que d'autres méthodes plus précises.
- Investigation sur le mécanisme d'inhibition des polyphénols de l'hémolyse des érythrocytes. D'avantage études permettront une compréhension plus approfondie sur le couplage et la synergie entre les molécules et les relations structures/activités des molécules contenues dans les écorces de clémentine.
- Utilisation d'autres solvants d'extraction en chaine afin d'avoir une meilleure solubilité des composés actifs et donc un meilleur rendement d'extraction.

L'ensemble des résultats de cette étude sont obtenus *in vitro*, ils ne représentent que la première étape dans la recherche de molécules bioactives d'origine naturelle. Des études *in vivo* sont donc souhaitable afin de concevoir un progrès plus important et de mettre en évidence la valeur de la clémentine et des polyphénols.



Références bibliographiques

Références



Aarabi, A., et al. 2016. Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. *Italian Journal of Food Science*. 2016, Vol. 28, pp. 362-375.

Aberrane, Sadjia et Mehalla, Massilia. 2019. Etude de l'activité anti-inflammatoire et anti-hémolytique de l'extrait aqueux de feuilles de Malva Sylvestris.L. *Biochimie Appliquée. Biologie*. 2019.

Achat, Sabiha. 2013. Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. *Institut National Agronomique De Tunis |Université de Lorraine École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires. École Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules*. 24 11 2013.

Afridi, Hassan.I, et al. 2006. Evaluation of toxic metals in biological samples (scalp hair, blood and urine) of steel mill workers by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Toxicology and Industrial Health*. 10 2006, Vol. 22, 09, pp. 381-393.

Ajila, C.M., et al. 2016. Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016, pp. 1-22.

Albagnac, G., Varoquaux, P. et Montigaud, J.C. 2002. Technologie de transformation des fruits. *Lavoisier*. 2002, pp. 302-304.

Albuquerque, A.J.R., et al. 2013. Polyphenols as a source of antimicrobial Agents against Human Pathogens. *Nova Science Publishers*. 2013, pp. 276-293.

Amic, Alain. 2020. Citrus x clementina - Clémentinier. *Quelle est cette plante.fr*. [En ligne] 22 10 2020. [Citation : 26 04 2021.]
<https://www.quelleestcetteplante.fr/especes.php?genre=Citrus&variete=x%20clementina>.

Anagnostopoulou, M.A., et al. 2005. Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC–diode array detection–electrospray ionization mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2005, pp. 19, 138-148.

Arabbi, P.R., Genovese, M.I.S. et Lajolo, F.M. 2004. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. *J. Agric. Food Chemistry*. 2004, Vol. 52, pp. 1124-1131.

Arbona, Vicent, et al. 2005. Carbohydrate Depletion in Roots and Leaves of Salt-Stressed Potted Citrus clementina L. *Carbohydrate Depletion in Roots and Leaves of Salt-Stressed Potted Citrus*. 06 01 2005. pp. 153-160.

Asimov, Issac. 1963. *Le cops*. Verviers : Gerard and Co, 1963.

Aubert, Bernard. 2001. première partie - Genèse du développement de la culture des agrumes. [auteur du livre] Joseph Marie Bové Bernard Aubert. *Scientifique et Artistique de l'Histoire Naturelle des Orangers*. 2001, chapitre 1:Contexte Historique, p. 40. C&M - Connaissance & Mémoires.



- Bachy, E., Houot, R. et Dony, A. 2015.** Hématologie adulte et pédiatrique. *Onco Hématologie (Ellipses)*. 2015, Vol. 9, pp. 44-46.
- Bailly, Pascal, Chiaroni, Jacques et Roubinet, Francis. 2020.** Les groupes sanguins érythrocytaires, John Libbey Eurotext. *Immuno-Hématologie Erythrocytaire*. 20 07 2020.
<https://www.toutsurlatransfusion.com/immuno-hematologie/globules-rouges/structure.php>.
- Bayart, Marie. 2019.** Élaboration et caractérisation de biocomposites à base d'acide polylactique et de fibres de lin: compatibilisation interfaciale par dépôt de revêtements à base d'époxy, de dioxyde de titane, de lignine ou de tanin. *Thèse de doctorat*. 26 06 2019.
- Bennici, Andrea et Tani, Corrado. 2004.** Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 01 2004, Vol. 199, 6, pp. 464-475. DOI 10.1078/0367-2530-00174.
- Bensenouci et Boughalem. 2020.** Effet antihémolytique antiradicalaire et anti-inflammatoire de l'écorce de la clémentine. 2020.
- Bicu, I. et Mustata, F. 2011.** Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. *Bioresource Technology*. 2011, Vol. 102, pp. 10013-10019.
- Bionest. 2021.** Les agrumes. *Bionest.es.fr*. [En ligne] 2021. [Citation : 24 Avril 2021.]
<https://bionest.es/fr/les-agrumes>.
- Blain, H., et al. 2000.** Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *La revue de médecine interne*. 2000, Vol. 21, 11, pp. 978-988.
- Blanchet, Philippe. 2011.** *Le provençal pour les nuls*. 2011. p. 76.
- Bocco, A., et al. 1998.** Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, Vol. 46, 6, pp. 2123-2129.
- Bonarska-Kujawa, D., et al. 2010.** Changes Caused by Fruit Extracts in the Lipid Phase of Biological and Model Membranes. *Food Biophysics*. 2010, Vol. 6, 1, pp. 58–67.
- Boudjellal, Khamssa. 2009.** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* L. *MEMOIRE pour l'obtention du diplôme en Biologie (Biochimie Appliquée)*. 2009.
- Braunstein, Evan M. 2020.** Revue générale des anémies hémolytiques. *MD, PhD, Johns Hopkins School of Medicine*. 2020.
- Bretó, M.P., et al. 2001.** The Diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a Vegetatively Propagated Crop Species. *The Diversification of Citrus clementina Hort. ex Tan.,.* 11 2001. Vol. 21, 2, pp. 285-293. ISSN 10557903.
- Bruneton, J. 2008.** Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes. *médicinales*. Ed: Tec & Doc Lavoisier. 2008, pp. 198-260.
- Byrne, C.M, et al. 2004.** Alternating Copolymerization of Limonene Oxide and Carbon Dioxide. *Journal of American Chemical Society*. 2004, Vol. 126, pp. 11404-11405.

Références bibliographiques



- Camille, Jacquemond, Curk, Franck et Heuzet, Marion. 2013.** Les clémentiniers et autres petits agrumes. Editions Quae, 04 12 2013, pp. 32-35.
- Carbonell, Caballero et al., J. et. 2020.** Taxon: Citrus ×clementina hort. ex Tanaka. *United States Department of Agriculture "GRIN-Global"*. [En ligne] 24 01 2020. [Citation : 27 04 2021.] <https://npgstest2.agron.iastate.edu/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=314344>.
- Charles, N.S., Peter, A.W. et Derek, W.G. 2010.** Fundamentals of Inflammation. *Cambridge University Press*. 2010, pp. 2-3.
- Chau, C.F., Huang, Y.L. et Lin, C.Y. 2004.** Investigation of the cholesterol-lowering action of insoluble fibre derived from the peel of Citrus sinensis L. cv. Liucheng. *Food Chemistry*. 2004, Vol. 87, pp. 361-366.
- Chaudhuri, S., et al. 2007.** Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007, Vol. 41, 1, pp. 42-48.
- Chutia, M., et al. 2009.** Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology*. 2009, Vol. 42, pp. 777-780.
- Clifford, M.N. 1999.** Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida. 1999, Vol. 41, 5, pp. 393-397.
- Costanzo, Giulia. 2020.** *Comparative studies on different Citrus cultivars*. 2020.
- Cowan, M. 1999.** Plant products as antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, 564-582.
- Crozier, A. 2003.** Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants'' Diet and Health''*. Ed. Goldberg. 2003, pp. 27- 48.
- Curk, F., et al. 2013.** Performance evaluation of commun clementine on various citrus rootstocks. 2013, Vol. 150, pp. 278-282.



- D'Archivio, M., et al. 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto-Superiore-di-Sanità*. 2007, Vol. 43, 4, pp. 348-361.
- Dai, J et Mumper, R.J. 2010.** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010, Vol. 15, pp. 7313-7352.
- Dallas, C., et al. 2008.** Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine*. 2008, Vol. 15, pp. 783-792.
- Damian reyna, A.A., Gonzalez hernandez, J.C et parga, Chavez. 2016.** Current procedures for extraction and purification of citrus flavonoids current extraction of citrus. *Revue of Colombia. Biotechnology*. 2016, Vol. 18, 1, pp. 135-147.

Références bibliographiques

- Dangoumau, J. 2006.** Pharmacologie générale. Edition 2006 Département de pharmacologie. *Université Victor Segalen Bordeaux.2.* 2006. <http://www.scribd.com/doc/24947187/pharmacolo>.
- Debuisson, Alain. 2018.** Clémentinier (Clémentine), *Citrus clementina*. *Au Jardin.info*. [En ligne] 01 2018. [Citation : 27 04 2021.] <https://www.aujardin.info/plantes/citrus-clementina.php>.
- Decroix, Rodolphe. 2021.** Clémentine : bienfaits et vertus pour la santé. 2021. www.jardiner-malin.fr.
- Dictionnaire de l'Académie française.** Orange. *Centre national de ressources textuelles et lexicales (CNRTL)*. [En ligne] [Citation : 21 04 2021.] <https://www.cnrtl.fr/>.
- Dictionnaire du petit LAROUSSE Illustré. 2012.** Orange. Paris : s.n., 2012. p. 759.
- Dr. Bernhard, Url. 2015.** EFSA / EU Register on nutrition and health claims. 2015.
- Dr. Achab, Dihya. 2019.** L'HÉMOLYSE. COURS DE BIOCHIMIE CLINIQUE (4eme ANNEE PHARMACIE). *UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI TIZI OUZOU*. 2019.
- Dr. Otmani, H. 2009.** L'hémolyse physiologiques et pathologique . *Module d'hémologie*. 2009.
- Dr. Ouchenane. 2015.** Hémolyse. *Module d'Hématologie (4 eme année médecine)*. 2015.
- Dr. Sahraoui, M. 2001.** LES FLAVONOÏDES. *Laboratoire de pharmacognosie* . 2001.
- Dykes, L. et Ronny, L.W. 2006.** Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science*. 2006, Vol. 44, pp. 236-251.



- Edeas, M. 2007.** Citroflavonoïdes. Phytothérapie. *Article de synthèse Pharmacognosie. Président de la Société française des antioxydants*. 2007, Vol. 5, 4, pp. 210-211.
- Erdman, J., et al. 2007.** Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop May 31-June 1, 2005, Washington, DC1-4. *Journal of Nutrition*. 2007, Vol. 137, pp. 718-737.



- Fabron, Simonai, Valeria, Flora et Paolo, Rapisarda. 2016.** Nutritional composition of clementine. 2016.
- Farahpour, H. et Habibi, M. 2008.** Evaluation of the wound healing activity of an ethanolic extract of Ceylon cinnamon in mice. *Vet Med*. 2008, Vol. 57, 1, pp. 1-5.
- Fcafotodigital. 2020.** Clémentine organiques fraîches sur une table en bois rustique - Photos. *Gettyimages*. [En ligne] 2020. <https://www.gettyimages.fr/detail/photo/fresh-organic-mandarins-on-rustic-wooden-table-image-libre-de-droits/916844162?adppopup=true>.
- Fernandez-Lopez, J., et al. 2004.** Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science and Technology*. 2004, Vol. 15, pp. 176-185.
- Fisher, K. et Phillips, C. 2006.** The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*,

Références bibliographiques

Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, Vol. 101, pp. 1232-1240.

Furetière. L'orange. *Monsu.desiderio.free.fr*. [En ligne] [Citation : 22 Avril 2021.] <http://monsu.desiderio.free.fr/jardin/orange.html>.

G

G.Albagnac, P.Varoquaux et J-C.Montigaud. 2002. Technologies de transformation des fruits. [éd.] LAVOISIER / TEC ET DOC. LAVOISIER / TEC ET DOC, 04 2002, pp. 302-304. Collection : Sciences et techniques agroalimentaires.

Geoff, Daniels. 2021. Human Blood Groups, 3rd edition, Wiley-Blackwell, 2013. *Immuno-Hématologie Erythrocytaire*. 20 07 2021.

Ghedira, K. 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*. 2005, Vol. 3, 4, pp. 162–169.

—. 2005. Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 2005, Vol. 4, pp. 162-169.

Gorinstein, S., et al. 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*. 2001, Vol. 74, pp. 309-315.

Guillaume. Orange Agrumes, variétés, production, saisonnalité | Libertyprim. *Libertyprim*. [En ligne] [Citation : 25 Avril 2021.] <https://www.libertyprim.com/fr/lexique-familles/88/orange-lexique-des-agrumes.htm>.

Guive, Mirfendereski. 2005. Etymology" Bowlful of fruity meaning: Part 2". *Iranian*. [En ligne] 12 Décembre 2005. [Citation : 21 Avril 2021.] <https://iranian.com/>.

Guo, G. W. et Liang, Y. X. 2001. Aluminum-induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis. *Brain Research*. 12 01 2001, Vol. 888, 2, pp. 221-226. Extre: PMID 11150478.

Guyetant, Serge. 2012. La réaction inflammatoire. Les inflammations. *Collège Français des Pathologistes*. 2012.

H

Habichi, Rabia et Alachaher, Niama. 2017. Dosage des citroflavonoïdes dans le jus et la peau d'orange (Clémentine). *Mémoire, En vue de l'obtention du Diplôme de master en Biologie (Alimentation et nutrition)*. 2017.

Havea. Plantes et actifs Orange Douce Bio (Huile essentielle). *Havea*. [En ligne] [Citation : 24 Avril 2021.] <https://www.havea.com/orange-douce-bio-huile-essentielle.html>.

Hawthorne, S.B., et al. 2000. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A*. 2000, Vol. 892, pp. 421-433.

Hayat, K., et al. 2009. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*. 2009, Vol. 70, pp. 63-70.

Références bibliographiques

- Hegde, P., Agrawal, P. et Gupta, P. K. 2016.** Polyphenols - a useful biomaterial. *Journal of Environmental Research and Development*. 2016, Vol. 10, 3, pp. 547-554.
- Hivebench. 2017.** Isolement de neutrophiles humains - sang total. *Hivebench "Open Protocol"*. [En ligne] 17 05 2017. <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.
- Hollman, P., et al. 2010.** Antioxidant activity of polyphenols and cardiovascular health: application of the PASSCLAIM criteria. *Journal of Nutrition*. 2010, Vol. 29, pp. 989-1009.
- Huet, R. 1982.** Constituants des agrumes à effet pharmacodynamique : les citroflavonoïdes. *Exposé présenté au cours des Journées médico-scientifiques organisées par le Centre de Recherche écobioologique entre d'Etude de la Foire internationale agrumicole de Reggio Calabria*. 1982, pp. 267-271.
- Huet, Raymond et CIRAD-IRFA. 1991.** Les huiles essentielles d'agrumes. *Fruit*. 01 01 1991, Vol. 46, 4, pp. 501-513.
- Huxley, Anthony Julian et Griffiths, Mark. 1992.** *Dictionary of Gardening, Royal Horticultural Society (Great Britain)*. [éd.] Macmillan Press. 2e édition. 1992. Vol. 1, Citrus reticulata "Clementine". ISBN 0333474945, 9780333474945.



- Ignat, I., Volf, I. et Popa, V. 2011.** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 2011, Vol. 126, pp. 1821-1835.
- In vitro Drug Testing. 2015.** In vitro Drug Testing in Unique Human Multiple Myeloma, Lymphoma, Leukemia cell lines. *Diag2Tec's Headquarters*. [En ligne] 2015.
- Iqbal, A., Fatruk, A. et Owais, M. 2006.** Modern phytomédecine. 2006.
- Iwalewa, E.O., et al. 2007.** Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*. 2007, Vol. 6, 25, pp. 1532-1545.
- James Phillips, MD, and Adam C. Henderson, MD. 2018.** Hemolytic Anemia: Evaluation and Differential Diagnosis. *Womack Army Medical Center, Fort Bragg, North Carolina*. 2018.
- Jean-François, Fortier, et al. 2019.** Dictionnaire; Lexique mots Tanin . *AquaPortail* . [En ligne] 29 12 2019. [Citation : 07 07 2021.] <https://www.aquaportail.com/definition-5295-tanin.html>.



- Kacha, F.,. 2020.** Hémolyse. *Faculté des sciences médicales. Département de médecine*. 2020.
- Kada, Seoussen. 2018.** Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologiques. *Doctorat en Sciences*. 2018.
- Kammoun Bejar, A., et al. 2011.** Effect of Infrared Drying on Drying Kinetics, Color, Total Phenols and Water and Oil Holding Capacities of Orange (Citrus Sinensis) Peel and Leaves. *Journal of Food Engineering*. 2011, Vol. 7, 5, pp. 1-25.

Références bibliographiques

- Kang, H.J., et al. 2006.** Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresource Technology*. 2006, Vol. 97, pp. 614-620.
- Kaur, K.D., et al. 2014.** Significance of coarse cereals in health and nutrition. *Journal of Food Science and Technology*. 2014, Vol. 51, 8, pp. 1429-1441.
- Keerthi, M., et al. 2014.** Review on polyphenols as nature's gift. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014, Vol. 3, 4, pp. 445-455.
- Kessel, L., et al. 2014.** Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops. *Ophthalmology*. 2014, Vol. 121, 10, pp. 1915-1924.
- Klein, Michel Lisa. 2021.** Agrumes. *Lucky Miam*. [En ligne] 02 2021. [Citation : 07 07 2021.] <https://www.luckymiam.com/agrumes/>.
- Koga, T. et Meydani, M. 2001.** Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Journal of Clinical Nutrition*. 2001, Vol. 73, 5, pp. 941-948.
- Kumar, H., et al. 2014.** Phenolic compounds and their health benefits: A review. *Journal of Food Research and Technology*. 2014, Vol. 2, 2, pp. 46-59.



- Leopoldini, Monica, Russo, Nino et Toscano, Marirosa. 2011.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 2011, Vol. 125, pp. 288-306.
- Li, Y., et al. 2016.** Extraction optimization of polyphenols, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities from *Prunus salicina* Lindl. *Food Science and Technology*. 2016, Vol. 36, 3, pp. 520-525.
- Liu, H., et al. 2008.** Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules*. 2008, Vol. 13, pp. 2521-2544.
- Liu, L., et al. 2003.** Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*. 2003, Vol. 24, pp. 3333-3343.
- Liu, Y., Shi, J. et Langrish, T.A.G. 2006.** Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Journal of Chemical Engineering Data*. 2006, pp. 120, 203-209.
- Lohrasbi, M., et al. 2010.** Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. *Bioresource Technology*. 2010, Vol. 101, pp. 7382-7388.



- Ma, Y., et al. 2009.** Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2009, Vol. 16, pp. 57-62.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Sarni-Manchado, P. 2006.** Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. [éd.] P. Sarni-Manchado et Cheynier. *Les polyphénols en agroalimentaire*. 01 2006, pp. 1-28. Collection Sciences et techniques agro-alimentaires.

Références bibliographiques

- Macheix, J.-J., Fleuriot, A. et Jay-Allemand, C. 2005.** Les composés phénoliques des végétaux. *Lousane*. Les Presses Polytechniques et Universitaires Romande, 2005.
- Madi, A. 2008.** Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Saugé) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. *Mémoire de Magister Université de Constantine*. 2008, pp. 12-49.
- Majdalawieh, A.F et Fayyad, M.W. 2015.** Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *Int Immunopharmacol*. 2015, Vol. 28, pp. 295-304.
- Makoto, Iris, et al.** Oranger, Orange douce. *Aujardin.info*. [En ligne] [Citation : 24 Avril 2021.] <https://www.aujardin.info/plantes/citrus-sinensis.php>.
- Manach, C., et al. 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Journal of Clinical Nutrition*. 2004, Vol. 79, 5, pp. 727-747.
- Marc, David-Muller et Pr. Veronique, BACCINI. 2013.** TISSU SANGUIN : LE GLOBULE ROUGE ET SA PATHOLOGIE. *LES PRINCIPAUX TYPES D'ANEMIES*. 2013.
- Marin, F.A., et al. 2007.** By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*. 2007, Vol. 100, pp. 736-741.
- Maxwell, E.G., et al. 2012.** Pectin an emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science and Technology*. 2012, Vol. 24, 2, pp. 64-73.
- Mergelina, Luis. 2021.** Clémentine biologique, une collation juteuse sans pépins. *Bionest.es.fr*. [En ligne] 2021. [Citation : 24 04 2021.] <https://bionest.es/fr/clementine-biologique/>.
- Miu, Andrei C. 2006.** The silicon link between aluminium and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 01 09 2006, Vol. 10, pp. 39-42.
- Mojzer, B., et al. 2016.** Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 2016, Vol. 21, 901, pp. 1-38.
- Morand, C. et Milenkovic, D. 2014.** Polyphénols et santé vasculaire : mise en évidence du rôle direct des polyphénols dans les effets bénéfiques des agrumes dans la protection vasculaire. *Innovations Agronomiques*. 2014, Vol. 42, pp. 47-62.
- Moure, A., et al. 2001.** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 2001, Vol. 72, pp. 145-171.
- Mraihi, F., et al. 2015.** Wild grown red and yellow hawthorn fruits from Tunisia as source of antioxidants. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, Vol. 8, pp. 570-578.
- Muster, D. 2005.** Médicaments de l'inflammation. *EMC - Stomatologie*. 2005, Vol. 1, 1, pp. 21-29.
- 
- Nicolas, Vinel. 2019.** La liste des anti-inflammatoires stéroïdiens. 2019.
- Nkhili, E. 2009.** Polyphénols de l'Alimentation μ Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. *Thèse de Doctorat. Avignon*. 2009, p. 327.
- Noack, M. et Kolopp, Sarda. 2018.** Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Rev Fr Lab*. 2018, Vol. 489, 3, pp. 28- 37.

Références bibliographiques

Noack, Mélissa, Marie, Nathalie et Kolopp, Sarda. 2018. Cytokines et inflammation : physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Revue Francophone Des Laboratoires*. 2018, Vol. 499, pp. 28-37.

Nouha, M'hiri. 2015. Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise demi sanguine » et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone. [éd.] Travaux réalisés dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre l'Institut National Agronomique de Tunis et l'Université de l'Université de Lorraine Lorraine. *Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat en « Sciences Agronomiques » et de Doctorat en « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »*. 25 11 2015, pp. 27-28.

Nurkovic, Eldar. 2021. Équipement de laboratoire pour la distillation Séparation des substances composantes du mélange liquide avec l'évaporation et la condensation Chimie industrielle Recherche pharmaceutique Flacon d'Erlemeyer, appareil. *Dreamstime.com*. [En ligne] 2021.



Online Etymology Dictionary | Origin, history and meaning of English words. Origin and meaning of orange. *Online Etymology Dictionary | Origin, history and meaning of English words*. [En ligne] [Citation : 21 Avril 2021.] https://www.etymonline.com/word/orange#etymonline_v_7106.

Orange bio - Citrus sinensis - Oranger - Fruit méditerranéen. Orange bio - Citrus sinensis - Oranger - Fruit méditerranéen. *Esprit santé*. [En ligne] [Citation : 23 Avril 2021.] <https://www.espritsante.com/articles/orange-bio-citrus-sinensis-oranger-fruit-mediterraneen>.

Ousmer L., Tahri S. 2017. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques de Citrus sinensis et Citrus aurantium. 2017.



Pavithra, M., et al. 2013. Antioxidant and antimicrobial activity of flowers of Wendlandia thyrsoidea, Olea dioica Lagerstroemia speciosa and Bombax malabaricum. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013, Vol. 3, 6, pp. 114-120.

Peschel, W., et al. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*. 2006, Vol. 97, pp. 137-150.

Pinterest. 2014. Poudre de Clémentine. *Pintrest*. [En ligne] 10 12 2014. <http://le-miam-de-ninou.blogspot.com/2014/12/poudre-de-clementine.html>.

Piriyaprasarth, S. et Sriamornsak, P. 2011. Flocculating and suspending properties of commercial citrus pectin and pectin extracted from pomelo (Citrus maxima) peel. *Carbohydrates Polymers*. 2011, Vol. 83, 2, pp. 561-568.

Podor, Laszlo. 2020. Clementine tree flowers - Photos. *Gettyimages*. [En ligne] 2020. <https://www.gettyimages.fr/detail/photo/orange-tree-flowers-image-libre-droits/579647420?adppopup=true>.

Podsedeck, A., et al. 2000. Compositional characterisation of some apple varieties. *European Food Research and Technology*. 2000, Vol. 210, pp. 268-272.

Références bibliographiques

Pourbafrani, M., et al. 2010. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology*. 2010, Vol. 101, pp. 4246-4250.

Pr.Gérard, Abadjian. 2014. Pathologie Générale. Inflammation et Cicatrisation. *USJ*. 2014.

Pr.Zandacki, Marc et Pr.Valérie, Ugo. 2012. L'hémolyse et son exploration. *Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers. Université Angers Faculté de médecine*. 2012.

Probio. 2018. Hématologie (Hémoglobine). *SORA SE*. [En ligne] 07 05 2018. <http://probiologiste.blogspot.com/2018/05/hemoglobine.html>.



Ramful, Deena, et al. 2010. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*. 28 11 2010, pp. 278,75-87. PMID: 20100535.

Raynaud, Nathalie. 2007-2008. Les agrumes. *Saveurs du Monde*. [En ligne] 2007-2008. [Citation : 24 Avril 2021.] http://www.hotellerie-restauration.ac-versailles.fr/IMG/pdf/Les_agrumes._N_Raynaud.08_10_2008-2.pdf.

Renard, C., et al. 2014. Le devenir des polyphénols et caroténoïdes dans les fruits et légumes traités thermiquement. *Innovations Agronomiques*. 2014, Vol. 42, pp. 125-137.

Roifman, I, et al. 2011. Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review. *Can J Cardiol*. 2011, Vol. 27, pp. 174-182.

Roselyne et Leblanc, Benoît. 2008. Substance précurseur des globules rouges. *Le monde en image (des collection pour l'éducation)*. [En ligne] 2008. <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55919&demande=desc>. Extrait de Immunohématologie, page 94.

Russo, M., et al. 2014. Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fibre: Availability in lemon's by-products. *Journal of functional foods*. 2014, Vol. 9, pp. 18-26.




Sauvant, P., Pepin, D et Guillot, J. 1999. Effects of Humic Substances and Phenolic Compounds on the In Vitro Toxicity of Aluminium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 01 09 1999, Vol. 44, 1, pp. 47-55.

Silbernagl, Staphan et Agamemnom, Despopoulos. 2008. Atlas de physiologie. Création inflammatoire, 2008.

Singh, A., Singh, K. et Quraishi, A. 2010. Effect of fruit extracts of some environmentally benign green corrosion inhibitors on corrosion of mild steel in hydrochloric acid solution. *Journal of Materials and Environmental Science*. 2010, Vol. 1, pp. 162-174.

Skerget, M., et al. 2005. Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 2005, Vol. 89, pp. 191-198.

Références bibliographiques

- Souccar, Thierry. 2017.** Quand et comment les oranges sont-elles arrivées dans nos vergers ? *LaNutrition*. [En ligne] 21 11 2017. [Citation : 25 Avril 2021.] <https://www.lanutrition.fr/bien-dans-son-assiette/aliments/fruits/orange/petite-histoire-de-lorange>.
- Soussa, C., et al. 2013.** In silico metabolism studies of dietary flavonoids by CYP1A2 and CYP2C9. *Food Research International*. 2013, Vol. 50, pp. 102-110.
- Stalikas, D. 2007.** Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 2007, Vol. 30, pp. 3268-3295.
- Swintek, Stephen. 2020.** Orange tree harvest in barren desert - Photos. *Gettyimages*. [En ligne] 2020. <https://www.gettyimages.fr/detail/photo/orange-tree-harvest-in-barren-desert-image-libre-de-droits/180274525?adppopup=true>.
- 
- Team, This Old House Reviews. 2020.** Everything You Need to Know About Clementine Trees. *This old house*. [En ligne] 22 08 2020. [Citation : 27 04 2021.] <https://www.thisoldhouse.com/gardening/21333881/clementine-trees>.
- Teh, S., Bekhit, A.E. et Birch, J. 2014.** Antioxidative Polyphenols from Defatted Oilseed Cakes: Effect of Solvents. *Antioxidants*. 2014, Vol. 3, pp. 67-80.
- Teysse, Christel, et al. 2020.** Clémentine/Mandarine : calories et composition nutritionnelle. 2020. Aprifel.com.
- Teysse, et al. 2020.** Clémentine mandarine calories et composition nutritionnelle. 2020.
- Theodorakidis, Alexandra et Rosendall, John Paul. 2019.** *About kids health*. [En ligne] 16 03 2019. <https://www.aboutkidshealth.ca/fr/legales>.
- Tian, Q., et al. 2001.** Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutrition and Cancer*. 2001, Vol. 40, pp. 180-184.
- Tokaloğlu, Şerife et Gürbüz, Fatma. 2010.** Selective determination of copper and iron in various food samples by the solid phase extraction. *Food Chemistry*. 01 11 2010, Vol. 123, 1, pp. 183-187.
- Trabut, Louis. 1926.** *Les hybrides de Citrus nobilis : La Clémentine*. 1926. pp. 484-489. Vol. 6, Publisher: Persée - Portail des revues scientifiques en SHS.
- Treves, C. 2016.** Qu'est-ce qu'une hémolyse ? Quelles en sont les conséquences sur les. *BioPAN*. 2016.
- Trésor de la langue française informatisé "TLFi".** Définitions lexicographiques et étymologiques d'« orange ». *Centre national de ressources textuelles et lexicales "CNRTL"*. [En ligne] [Citation : 21 Avril 2021.] <https://www.cnrtl.fr/etymologie/orange>.
- Tumbas, V.T., et al. 2010.** Antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel. *Biblid*. 2010, Vol. 40, pp. 195-203.
- Turner, R., et al. 2004.** Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein. *Free Radical Research*. 2004, Vol. 38, 2, pp. 209-216.

Références bibliographiques



Vernay, P, Gauthier-Moussard, C et Hitmi, A. 2007. Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere*. 16 04 2007, Vol. 68, 8, pp. 1563-1575. Extra: PMID 17434568.

Ververis, C., et al. 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*. 2007, Vol. 98, 2, pp. 296-301.

Vincent, Richard. 2019. Anti-inflammatoires non-stéroïdiens. *Collège national de pharmacologie médicale*. [En ligne] 14 05 2019. [Citation : 11 05 2021.] <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/anti-inflammatoires-non-steroidiens..>

Virot, M., et al. 2008. Green procedure with a green solvent for fats and oils" determination Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation limonene followed by microwave Clevenger distillation. *Journal of Chromatography A*. 2008, Vol. 1196, pp. 147-152.



Wang, X., Chen, Q. et Lu, X. 2014. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*. 2014, Vol. 38, pp. 129-137.

Wang, Y.C., Chuang, Y.C. et Hsu, H.W. 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*. 2008, Vol. 106, 1, pp. 277-284.

Wilkins, M. R., Widmer, W. et Grohmann, K. 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry*. 2007, Vol. 42, 12, pp. 1614-1619.

Wissam, Z, et al. 2012. Effective extraction of polyphenols and proanthocyanidins from pomegranate's peel. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012, Vol. 4, 3, pp. 675-682.



Zatta, Paolo, et al. 2004. A fatal case of aluminium encephalopathy in a patient with severe chronic renal failure not on dialysis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 11 2004, Vol. 19, 11, pp. 2929-2931. Extra: PMID 15496577.

Zerhouni, Mokhtar. 2008. lorange : Une baie particulière. *Sante-dz - Guide de la santé en Algérie*. [En ligne] 10 05 2008. [Citation : 25 Avril 2021.] <https://www.sante-dz.com/conseils/2008/5/10/tout-sur-lorange-une-baie-particuliere>.

Zia-ur-Rehman. 2006. Citrus peel extract-A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*. 2006, Vol. 99, pp. 450-454.



Résumé

Résumé :

La clémentine (*Citrus clementina*) est une variété hybride de mandarine et d'orange. Comme d'autres agrumes, elle est une bonne source d'antioxydants. Ce travail a pour but de mettre en valeur l'activité anti-hémolytique *in vitro* des polyphénols, des citroflavonoïdes et des tanins de l'écorce de la clémentine. Ceci afin de déterminer la concentration optimale qui permettra de protéger les érythrocytes de l'hémolyse. Les résultats obtenus ont montré que : les polyphénols sont toxiques à fortes doses dont la concentration de 2000µg/ml présente le taux d'hémolyse le plus élevé 69.05%, cependant le taux d'hémolyse le plus bas 47.5% est rencontré pour la concentration de 250µg/ml. Concernant les citroflavonoïdes, les résultats montrent qu'ils sont les moins toxiques à de faibles concentrations 35µg/ml représentant un taux d'hémolyse de 56,61%. Pour les tanins, ils ont démontré une diminution de la perméabilité des globules rouges dont le taux d'hémolyse le plus bas (16,46%) est rencontré pour la concentration de 1500µg/ml. Ces résultats démontrent que l'activité anti-hémolytique *in vitro* des polyphénols, des Citroflavonoïdes et des tanins de l'écorce de la clémentine est dose/ dépendante.

Mots clés : Écorce, Clémentine, Polyphénols, Citroflavonoïdes, Tanins, Activité anti-hémolytique.

Abstract:

Clementine (citrus clementina) is a hybrid derived from Mandarin and orange. Like other citrus fruits, it is an excellent source of antioxidants. The aim of this study is to highlight the Anti-hemolytic activity of polyphenols, citroflavonoids and tannins found in clementine's peel, in order to determine the optimal concentration that will protect the red blood cell from hemolysis. Among the results obtained, we mention the most important: Polyphenols are toxic at high doses of which the concentration of 2000µg / ml has the highest hemolysis rate 69.05%, however the lowest hemolysis rate 47.5% for polyphenols is encountered for the concentration of 250µg / ml. The citroflavonoids, the results show that they are the least toxic at low concentrations 35µg / ml represents the lowest hemolysis rate 56.61%. For tannins have demonstrated a decrease in the permeability of the red blood cells, the lowest hemolysis rate of which is 16.46% for the tannins is found for the concentration of 1500 µg / ml. These results demonstrate that the antihemolytic activity *in vitro* of polyphenols, citroflavonoids and tannins in clementine bark is dose / dependent.

Keywords: Peel, Clementine, Polyphenols, Citroflavonoids, Tannins, Anti-hemolytic activity.

الملخص :

كليمنتين (كليمنتينا الحمضيات) عبارة عن مجموعة هجينة من الماندرين والبرتقال. مثل الفواكه الحمضية الأخرى ، فهو مصدر جيد لمضادات الأكسدة. يهدف هذا العمل إلى تسليط الضوء على النشاط المضاد للانحلال في المختبر لمادة البوليفينول ، السيتروفلافونويدس و العفص لحاء الكليمنتين. هذا لتحديد التركيز الأمثل الذي سيحمي خلايا الدم الحمراء من انحلال الدم. من بين النتائج التي تم الحصول عليها، نذكر أهمها: تعتبر مادة البوليفينول سامة عند تناولها بجرعات عالية والتي يكون تركيز 2000 ميكروجرام / مل منها أعلى معدل لانحلال الدم 69.05% ، ومع ذلك فإن أقل معدل انحلال دموي 47.5% للبوليفينول يكون بتركيز 250 ميكروجرام / مل. بالنسبة للسيتروفلافونويد ، أظهرت النتائج أنها الأقل سمية بتركيزات منخفضة 35 ميكروجرام / مل تمثل أقل معدل انحلال دم 56.61%. أظهرت العفص انخفاضاً في نفاذية خلايا الدم الحمراء ، حيث تم العثور على أقل معدل لانحلال الدم بنسبة 16.46% للعفص لتركيز 1500 ميكروجرام / مل. توضح هذه النتائج أن النشاط المضاد للانحلال في المختبر للبوليفينول والسيتروفلافونويد والعفص في لحاء الكليمنتين هو الجرعة/المعتمدة.

الكلمات المفتاحية : اللحاء ، الكليمنتين ، البوليفينول ، السيتروفلافونويدس ، العفص ، نشاط مضاد للدم.