



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID –TLEMCEM-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences
de la Terre et de l'Univers**



Département de biologie

Laboratoire:

Physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Master en biologie

Option: physiologie et physiopathologie cellulaire

Thème

Effet de la variation des concentrations des polyphénols et
tanins sur l'intégrité de la membrane des érythrocytes

Présenté par :

MOUSSI ZAHIRA **ET** YAHIA BERROUIGUET GHIZLENE

Soutenu le : 24/07/2019 Devant le jury composé de :

Présidente: Mme MOKHTARI N Professeur, université de Tlemcen

Promotrice: Mme BEKHTI SARI F MCB, université de Tlemcen

Examinatrice: Mme LOUKIDI B MCA, université Tlemcen

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciements

Au terme de notre travail nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience de le réaliser.

Nous tenons tous particulièrement à adresser nos remerciements les plus vifs d'abord à notre encadreur Mme bekhti.F, qui nous a fait l'honneur de nous inspirer ce sujet et nous guider tout au long de son élaboration, de nous conseiller et de nous orienter. On lui exprime nos profonds respects et nos chaleureux remerciements, nous lui sommes très reconnaissantes.

Je tiens à remercier Mme MOKHTARI, Professeur à l'université de Tlemcen, sa gentillesse ainsi pour l'honneur qu'elle nous fait de faire partie de ce jury et de présider cette soutenance.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Loukidi.B, maitre de conférences à l'université de Tlemcen, qui nous a fait l'honneur de bien vouloir examiner ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les doctorants du laboratoire PPABIONUT qui m'ont aidé durant la réalisation de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les enseignant(e)s qui m'ont aidé durant les cinq ans.

Dédicace :

C'est avec des sentiments de joie et de fierté que j'ai achevé ce travail de patience et de longue haleine, un mémoire qui vient couronner mes années d'études. C'est avec une profonde émotion qu'on dédie ce mémoire :

A mes très chers parents que j'aime beaucoup, qui ont veillé sur mon éducation et qui ont sacrifié les meilleurs moments de leur vie pour ma réussite. Jamais je ne peux les remercier assez de m'avoir donné le meilleur d'eux même.

A ma chère maman, Je retrouve dans ce simple travail la force que tu ma transmise et récoltes aujourd'hui le fruit du gain que tu as semé hier. C'est grâce à toi que je suis aujourd'hui au stade final de ma formation, Que dieu te gardent.

A mon marie, avec qui je continuerai ma vie avec plein de bonheur inchallah. Merci pour ta disponibilité toujours à mes cotés et tous ce que tu fais pour moi.

Mes très chers frères et sœurs qui m'ont aidé beaucoup dans mes études et ma toute famille.

Mes professeurs et enseignants de tout mon cursus d'étude.

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.

Liste des abréviations

AGPI : acide gras polyinsaturée

ADN : acide désoxiribonucléique

DPPH: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

DO: densité optique

Fe²⁺: Ions ferreux

Fe³⁺: Ions ferriques

GR : globules rouges

GSH: Glutathion réduit

GSSG: Glutathion oxydé

MDA : malondialdéhyde

mg/g : milligramme par gramme

mg : milligramme

ml : millilitre

mmole : milli mole

Nm: nanomètre

NADPH: nicotinamide

PBS : tampon phosphate salin

TBHP : L'hydroperoxyde de *tert*-butyle

RL : Radicaux Libres

ROS: Espèces réactives de l'oxygène

TBA: Acide thiobarbeturique

TCA : Trichloro-acetic acide

t/min : tour par minute.

V/V : volume/volume

μL : micro litre

μmol/L : micro mol par litre

% : pourcentage

Liste des tableaux

<u>Tableau 01</u> : Composition de l'orange	5
<u>Tableau 2</u> : Description botanique de la clémentine.....	7
<u>Tableau 03</u> : Valeur nutritive de quelques fruits de citrus	8
<u>Tableau 04</u> : Les bienfaits de la clémentine.....	9
<u>Tableau 05</u> : Les principales espèces réactives de l'oxygène et leur structure chimique	11
<u>Tableau 06</u> : Structure des squelettes des polyphénols.....	13

Liste des figures

Figure 01 : Description botanique de citrus sinensis.....	3
Figure 02 : Coupe transversale schématique d'une clémentine (Citrus clementina)	4
Figure 03 : Description botanique de clémentinier.....	7
Figure 04 : Schéma d'un radical libre	10
Figure 05 : Structure de base des flavonoïdes.....	14
Figure 06 : Principales classes des flavonoïdes.....	15
Figure 07 : Neutralisation d'un radical libre.....	17
Figure 08 : Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes.....	17
Figure 09 : Effets biologiques des polyphénols.....	19
Figure 10 : Délipidation du matériel végétal dans l'hexane.....	22
Figure 11 : Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.....	29
Figure 12 : Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non au TBHP sur les teneurs en MDA.....	29
Figure 13 : Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non sur TBHP sur les teneurs en GSH.....	30
Figure 14 : Effet de différentes concentrations de polyphénols sans tannins combinés ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.....	30
Figure 15 : Effet de différentes concentrations de polyphénols sans tannins combinés ou non sur TBHP sur les teneurs en MDA.....	31
Figure 16 : Effet de différentes concentrations de polyphénols sans tannins combinés ou non sur TBHP sur les teneurs en GSH.....	31
Figure 17 : Effet de différentes combinaison (polyphénols / tannins) combinés ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.....	32
Figure 18 : Effet de différentes combinaison (polyphénols / tannins) combinés ou non au TBHP sur les teneurs en MDA	32
Figure 19 : Effet de différentes combinaison (polyphénols / tannins) combinés ou non au TBHP sur les teneurs en GSH.....	33

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Introduction

Synthèse bibliographique

CHAPITRE 1

I.	Les agrumes	1
I.	1. Généralité des agrumes	1
I.	2. Valorisation des écorces d'agrumes	1
I.	3. Origine et Historique	2
II.	L'ORANGE	2
II.	1. Généralités	2
II.	2. Origine et historique	3
II.	3. L'oranger	3
II.	4. Description morphologique d'orange	4
II.	5. Composition d'orange	5
III.	La clémentine	6
III.	1. Généralités sur la clémentine	6
III.	2. Historique	6
III.	.3. Classification botanique	6
III.	.4 . Description botanique	7
III.	5. Valeur nutritive de la clémentine	8
III.	6. Les bienfaits de la clémentine	8

CHAPITRE II

I.	Le stress oxydant	10
I.	1. Qu'est -ce-qu' un radical libre	10
I.	2. Rôles des radicaux libres	10
I.	3. Les principaux radicaux libres	11
II.	. Les antioxydants	11

II.	1. Polyphénols.....	12
II.	1. Généralités.....	12
II.	2. Classification	12
II.	1.2.1 Acides phénoliques	13
III.	1.2.2. Flavonoïdes	14
II	1.2.2.1 Structure des flavonoïdes	14
II.	1.2.2.2 Classification des flavonoïdes	14
II.	1.2.2.2.1 Généralités sur les citroflavonoïdes	15
II.	1.2.2.2.2 Localisation dans la plante.....	16
II.	1.2.2.2.3. Rôles des flavonoïdes chez les plantes	16
II.	1.2.2.3. Propriétés biologique des Flavonoïdes	17
II.	1.2.3. Les Tannins	20
II.	1.2.3.1 Les tannins hydrolysables	20
II.	1.2.3.2. Tannins condensés	20
	<u>II .1.2.4 Propriétés antioxydants des tannins.....</u>	20
III.	Conséquences du stress oxydant	20
	<u>Matériel et méthodes</u>	
	I. Préparation des échantillons :	
	I.1. Prétraitement du matériel végétal	22
	I.1.1 Séchage.....	22
	I.1 .2 Broyage et tamisage	22
	II. 1 Extraction des polyphénols	22
	II 2 Elimination des tanins.....	23
	II. 3 Extraction sélective des tanins	23
III.	Préparation des dilutions	
III.	1. Préparation des dilutions de polyphénols totaux, des polyphénols sans tanins et des tanins.....	24
	III.2. Préparation des combinaisons de poly/tann.....	24
	IV. 2 Test d'hémolyse	24
	IV. 2 .1 Principe	24
	IV. 2 .2 Mode Opératoire	24
	IV. 2-3-Taux d'hémolyse	24

IV. 2-4-Hémolyse Totale	25
-------------------------------	----

V. Mesure des marqueurs de stress oxydatif.....	25
--	-----------

V. 1 Dosage MDA	25
------------------------------	-----------

V. 1 .1 Principe	25
------------------------	----

V. 2 Dosage du GSH	26
---------------------------------	-----------

V. 2 .1 Principe	26
------------------------	----

VIII : Analyse statistique

Résultats et interprétation

I. Polyphénols totaux	27
------------------------------------	-----------

I.1. Taux d'hémolyse	27
----------------------------	----

I.2. Les teneurs en MDA	27
-------------------------------	----

I.3. Les teneurs en GSH	27
-------------------------------	----

II. Les polyphénols sans tannins

II.1. Taux d'hémolyse	27
-----------------------------	----

II.2. Les teneurs en MDA	27
--------------------------------	----

II.3. Les teneurs en GSH	28
--------------------------------	----

III .Combinaison (polyphénols / tannins)

III.1. Taux d'hémolyse	28
------------------------------	----

III.2. Teneurs en MDA	28
-----------------------------	----

III.3. Les teneurs en GSH.....	28
--------------------------------	----

Discussion

Conclusion

Références bibliographique

Introduction générale

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux (**Levy, 1969**). Le stress oxydatif est impliqué dans un large spectre de maladies qui ont un impact énorme sur la santé. Ces maladies à l'origine du stress oxydatif sont dues généralement suite à la production excessive des espèces réactive d'oxygène (ERO) et les espèces réactive d'azote (ERN) qui pourraient devenir toxiques pour les composants majeurs de la cellule ; les lipides, les protéines et les acides nucléique (**Valkoet al., 2006**). Ceci provoquerait un dysfonctionnement cellulaire et serait impliqué dans diverses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) et le processus de vieillissement (**Aruoma, 2003**).

L'homme n'est pas capable d'assurer la biosynthèse de la plus part des antioxydants, en particulier ceux de nature phénolique. Il doit les trouvés dans la ration journalière (**Bravo, 1998**). Les écorces d'agrumes sont riches en composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques qui sont caractérisés par leurs activités anti-oxydantes, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne (**Bocco et al., 1998 ; Ma et al., 2009 ; Huang et al., 2010**).

De nos jours, les agrumes sont les fruits les plus consommés dans le monde. La production mondiale des agrumes se situe auteur de 66,4 million de tonnes en 2010 (**Loeillet, 2010**). En Algérie 55,000 hectare (ha) de superficie sont productives en 2011 dont 56% se situent au centre de pays (**Houaoura, 2013**).

Un grand nombre de recherches ont démontré que les polyphénols des agrumes disposent de plusieurs applications thérapeutiques, les études épidémiologiques prouvent que la consommation de l'orange et des produits à base d'orange peuvent protéger la santé contre différentes maladies à cause de sa richesse au diverses molécules antioxydantes dont l'acides ascorbique, les caroténoïdes et les polyphénols (**Kim et al., 2002**). Grace à cette richesse, l'extraction des composés phénoliques à partir des agrumes a considérablement attiré l'intérêt scientifiques pour les utiliser comme des antioxydants naturels, conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique (**Ramful et al., 2010**). Les polyphénols jouent un rôle d'antimutagène, d'anti-inflammatoire, d'antimicrobien, d'anti-tumorale ou d'antivirale (**Sala et al., 2002**).

Les oranges sont une très bonne source de composés phénoliques (**Balasundram et al., 2006**). Ces puissants antioxydants sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions extérieures, Ces derniers se trouvent en

grande proportion dans l'écorce (plus de 15% que la pulpe) (**Gorinstein et al., 2001 ; Goulas et Manganaris, 2012**).

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une valorisation des extraits de l'écorce de la clémentine d'orange en tant que composé bioactifs. Le but de ce travail est d'étudier l'impact des différentes concentrations de polyphénols, des tannins tout deux extraits de l'écorce de la clémentine et leurs combinaisons sur l'hémolyse et sur le stress oxydatif. Ceci afin de déterminer la concentration optimale en polyphénols qui permet de protéger les globules rouges de l'hémolyse et du stress oxydant en augmentant l'activité antioxydant et diminuant les produits de l'oxydation. Pour cela nous avons réalisé un test d'hémolyse en présence des polyphénols totaux, des polyphénols sans tanins et la combinaison (polyphénols/tanins) combinés ou non d'un générateur de radicaux libres : le TBHP accompagné par le dosage de deux paramètres du stress oxydant : le glutathion et le malondialdéhyde.

synthèse bibliographique

I. Les agrumes**I. 1. Généralité des agrumes**

Les agrumes sont les fruits dont la production est la deuxième plus importante au monde avec plus de 115 millions de tonnes par an, 517milles tonnes ont été produits en Algérie qui occupe la 18èmeplace.

- Les agrumes sont des petits arbres ou arbustes, dont la taille peut varier de 2 à 10 mètres de haut suivant les espèces. Leur frondaison est généralement dense et leurs feuilles sont persistantes, à l'exception des *Poncirus*. Leurs fruits et toutes les parties de l'arbre (écorce, feuilles, branches, et fleurs) contiennent des glandes à essence.
- Les agrumes se distinguent par leur grande diversité de leurs familles et de leurs ordres. Les agrumes englobent plusieurs variétés, parmi lesquelles on trouve le citron, l'orange, le pamplemousse, la lime, le pomelo etc. (**Ladaniya, 2008 ; Khan et al., 2010**).

I. 2. Valorisation des écorces d'agrumes :

- Les écorces d'agrumes sont une matrice hautement valorisable vue sa richesse en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques) ayant des applications très variées dans les industries agroalimentaires, cosmétique, nutraceutique et dans les industries de production de biocarburant et de matériaux biodégradables (**Ledesma-Escobar & Luque De Castro, 2014**).
- Les écorces d'agrumes représentent un gisement important de composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les flavonoïdes présents dans les agrumes sont les flavanones glycosylés et les flavones polyméthoxylés (**Mouly, 1994; Kawaii Et Al., 1999; Manthey & Grohmann, 2001**).
- Les flavonoïdes des écorces d'agrumes sont caractérisés par leur activité antioxydant, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne (**Bocco et al., 1998 ; Ma et al.,2009; Huang et al.,2010**).

I. 3. Origine et Historique :

Le terme Agrume provient du latin *acrumen* qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (BENEDISTE et BACHES, 2002). Les agrumes sont originaires du Sud-est Asiatique (Ollitrault *al.*, 1997). Ce sont des arbres de la famille des Rutacées composés de 156 ou de 16 espèces, selon que les auteurs ont ou n'ont pas pris en compte les hybrides (Swingle et Reece, 1967).

L'histoire d'agrumes commence environ 4000 ans avant J-C, les agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour des montagnes de l'Himalaya et du sud-est asiatique. La culture

des agrumes a commencé en Chine probablement 500 ans avant J-C. le cédrat est le premier agrume introduit en Europe par Théophraste en 310 ans avant J-C. Alors que le dernier agrume avoir arrivé en Europe fut le mandarinier au début du 19^{ème} siècle. Depuis lors, il est devenu l'un des agrumes les plus populaires et une source de développement continu (Bousbia *et al.*, 2009).

L'agrumiculture des pays du bassin Méditerranéen est diversifiée, tant au niveau des variétés cultivées (oranges, mandarines, Thomson, clémentines, pomelos, citrons, limes, pamplemousses pour ne citer que les plus courants) reflète d'une certaine manière la richesse et la variabilité de ces arbres, du fait de l'extension de cette culture (VIRBELALONSO, 2011).

II. L'ORANGE**II. 1. Généralités :**

C'est un agrume, fruit comestible de l'oranger. Comme son nom l'indique, elle est en couleur orange de la famille des Rutacées, de forme sphérique à ovale à la peau orangée rougeâtre, épaisse et assez rugueuse contenant une huile essentielle d'odeur caractéristique. Elle se découpe en quartiers comme sa cousine la mandarine. L'orange est un fruit juteux, sucré, excitant et il contient de la vitamine C. Les orangers, arbres qui produisent l'orange sont cultivés dans les régions tempérées et chaudes, comme les pays méditerranéens (Milind et Dev, 2012).



Figure1 : Description botanique de *Citrus sinensis* (Versteeg, 1979).

II. 2. Origine et historique :

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

II. .3. L'oranger :

L'oranger est un arbre au port harmonieux et de croissance rapide, pouvant atteindre 10 m de hauteur environ, avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé. La floraison très parfumée et sont très odorantes à 5 pétales blancs recourbés vers l'arrière, les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir, de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange. La pulpe se divise en quartiers composés de vésicules juteuses et de graines dures de couleur blanche. L'oranger est l'un des agrumes le plus répandu au monde et le plus connu. Il existe plusieurs variétés les plus connues la Sanguine, Thomson navel, valencia latte, Washington navel Powell, Florida pinéale, orange portugaise etc.... (Loussert, 1989).

II. 4. Description morphologique de l'orange :

La structure d'une orange est caractérisée par les composants suivants (Ramful et al., 2010) (Figure 2):

1-L'écorce: se décline en deux parties :

❖ **L'épicarpe:** c'est la couche extérieure colorée (zeste), appelée « flavedo » qui doit sa couleur jaune orangé aux flavanones. elle contient des glandes à huiles essentielles qui donnent l'odeur particulière à l'orange. Elle représente 8 à 10% du fruit.

❖ **Le mésocarpe:** c'est la couche intérieure blanche, appelée « albédo » à consistance spongieuse plus ou moins épaisse par rapport à la taille du fruit, elle ne contient aucun flavanone soluble, Elle représente 12 à 30% du fruit.

2-La pulpe (ou endocarpe): c'est la partie comestible divisée en quartiers juteux dont le nombre varie de 9 à 11; Elle est constituée par un ensemble de poils charnus ou vésicules renfermant le jus. Elle est souvent plus ou moins acide et sucrée ou amère et elle représente 50 à 80% du fruit.

3-Les pépins: se trouvent près du centre de l'orange, ils ont une teneur élevée en huile; ils représentent 0 à 4% du fruit.

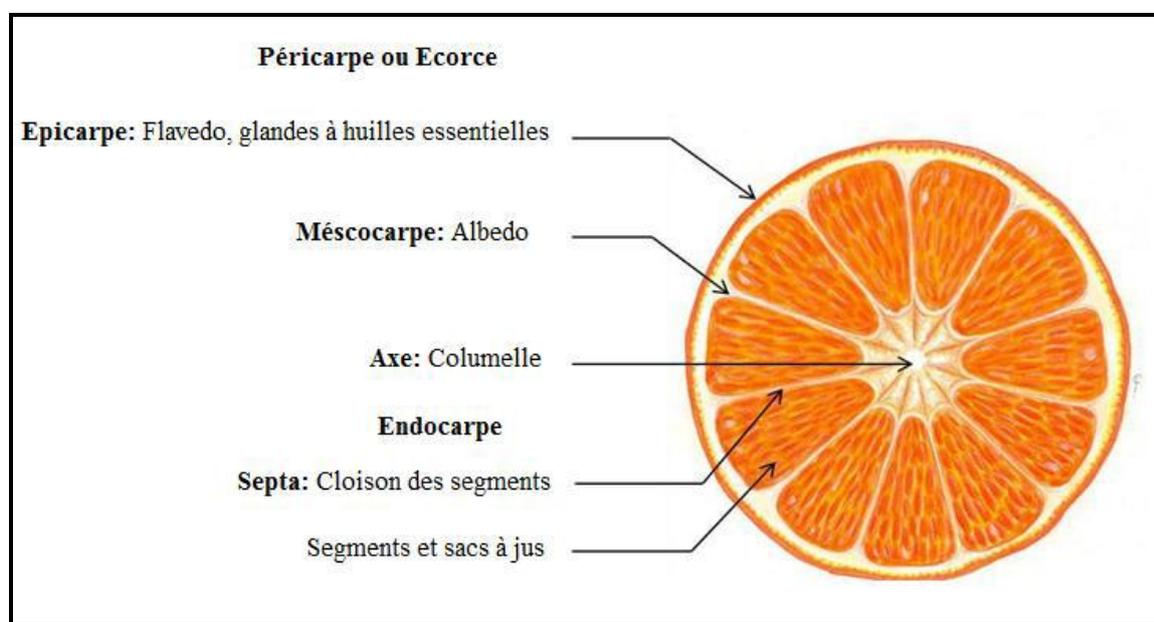


Figure 2 : Coupe transversale schématique d'une clémentine (*Citrus clementina*) (Milind, 2008)

5. Composition d'orange :

L'orange est une source importante de composés caractérisés par une activité anti oxydante. Il contient des teneurs élevées en caroténoïdes, en acide ascorbique et en flavonoïdes. (**Gardner et al. (2000)**), mais aussi des composant organique, énergétique, glucidiqueEt ces principaux composés de l'orange sont résumés dans le (Tableau 01).

Tableau 01 : principaux constituants de l'orange (Anonyme, 2007)

<u>Constituants</u>	<u>Teneurs</u>
Glucides	8.5 à 12 % dans le fruit à maturité, représente par le saccharose (40 %) Fructose et glucose
Acides organiques	1.2 %, surtout de l'acide citrique et de l'acide malique
Autres composés Energétiques	Lipides concentres dans les pépins peu de protéines
Vitamines	Teneur élevée en vitamine C (40 a 80 mg pour 100g). Vitamines hydrosolubles qui sont toutes des vitamines du groupe B (B1 et B9, en particulier), vitamine A (0.05 a 0.2 mg pour 100g). vitamine E (0.24mg pour 100g).
Minéraux	Calcium, Magnésium, Potassium et Phosphore
Oligoéléments	Fer, Cuivre, Zinc, Manganèse, Nickel, Iode, trace de Bore et de Sélénium
Fibres	Une teneur de 2.4 % en moyenne, elles ont l'originalité d'être riches en pectine (environ 50 %)
Flore mésophile	Levures et lactobacilles indispensables à sa bonne digestion
Substances aromatiques	Ce sont des composés complexes caractéristiques de ce fruit (aldéhydes, esters... etc.), des essences odorantes

III. . La clémentine :**III. 1. Généralités sur la clémentine :**

La clémentine est un agrume, fruit du clémentinier (*Citrus clémentina*), un arbre hybride de la famille des Rutacées, issue du croisement entre un mandarinier (*Citrus réticulata*) et un oranger (*Citrus sinensis*). La peau est brillante, de couleur orange à rougeâtre, finement granulée, ayant une épaisseur qui varie selon les clones de 2,5 à 4,5 mm. La pulpe est riche en jus, tendre et parfumée. Les fruits sont d'un poids moyen de 60g. Le bassin méditerranéen est la principale zone de production de clémentines; l'Espagne, le Maroc et l'Algérie en sont les grands pays producteurs (Swingle, 1967).

III. .2. Historique :

Le Frère Clément vivait en Algérie, à Misserghin, au début du XX^e siècle, où il s'occupait d'un orphelinat agricole, et notamment des plantations. Intéressé, voire passionné, par l'arboriculture, il entretenait et développaient vignes et vergers. Il a largement contribué à la prospérité des vingt hectares de pépinière de l'orphelinat, et sans doute davantage, en introduisant en Algérie plusieurs centaines d'espèces d'arbres. On dénombre que le Frère a développé jusqu'à 10.000 plants d'arbres et 600 espèces de rosiers, sans oublier les nombreuses greffes heureuses.

Ces résultats remarquables firent de lui une encyclopédie botanique vivante, savoir acquis au cours de ses expérimentations car sans aucune formation.

L'histoire raconte que le Frère Clément, avec l'aide du botaniste Charles Trabut, aurait procédé à une greffe de mandarinier avec une variété de bigaradier orange amère à feuilles de saule, le Granito qui donna naissance à ce nouvel agrume baptisé "clémentine". (Louis, 1926).

III. .3. Classification botanique

- famille des rutacées : *Citrus clémentina*
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Rosidæ
- Ordre : Sapindales
- Famille : Rutaceæ

III. .4 Description botanique :

La description botanique de la clémentine (*Citrus clémentina*) a des caractères bien défini et Le tableau 2 établit ci-dessous présente les principaux caractères botaniques de la clémentine.

Tableau 2: Description botanique de la clémentine (Trabut, 1926).

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



Figure 3 : Description botanique de clémentinier (Agostini, 1996)

I. **.5.Valeur nutritive de la clémentine :**

La composition en éléments nutritifs des agrumes est différente d'une espèce à une autre. La clémentine est parmi les espèces les plus énergétiques, Sur le plan nutritionnel la perception de ce fruit réside principalement sur son contenu en vitamine C et d'autres composants comme les polyphénols, et les minéraux présentant une activité antioxydante (tableau 03).

Tableau 03 : Valeur nutritive de quelques fruits de citrus (pour 100g de fruit). (Ortiz, 2002 : Virbel-Alonso, 2011).

Teneur en eau	86,9(%)
Energie	46(cal)
Glucides	10,5 (g)
Protéines	0,7 (g)
Lipides	0,2 (g)
Calcium	26 (mg)
Fer	0,35 (mg)
Potassium	145 (mg)
Sodium (mg)	Traces
Provitamine A	330 (IU)
	0,04 (mg)
Riboflavin VB₂	0,03 (mg)
Vitamine C (mg)	41 (mg)
Polyphénols totaux	190 (mg)

UI : *Unité Internationale*

III. **5. Les bienfaits de la clémentine :**

Ces fruits sont très importants pour l'organisme, car elles permettent de surmonter et prévenir des carences nutritionnelles dans le cas de pathologie liée aux régimes alimentaires.

Tableau 04 : Les bienfaits de la clémentine (Sagee et al., 1996).

<p>➤ <u>Protection du réseau vasculaire :</u></p>	<p>Les flavonoïdes présents dans les clémentines permettent de prévenir les risques de maladies cardiovasculaires en équilibrant le bilan lipidique.</p>
<p>➤ <u>Aide au système immunitaire :</u></p>	<p>En mangeant deux clémentines c'est déjà la moitié de l'apport journalier conseillé en vitamine C. Les vertus de cette vitamine sont nombreuses, elle stimule notamment</p>
<p>➤ <u>Santé des os :</u></p>	<p>La clémentine est l'allié de nos os : les caroténoïdes qu'elle contient en quantité non-négligeable les protègent et les renforcent</p>
<p>➤ <u>Anti-crampes :</u></p>	<p>Le potassium est l'élément minéral qui est présent en plus grande quantité dans la clémentine. Il a une action positive sur les crampes et sur l'arthrose</p>
<p>➤ <u>Anti vieillissement de la peau :</u></p>	<p>La clémentine est riche en vitamine E, antioxydant puissant qui permet notamment de régénérer les cellules de la peau. La vitamine E est aussi utilisée pour soulager les douleurs menstruelles.</p>
<p>➤ <u>Préserve la vue</u></p>	<p>La vitamine A que contient la clémentine est un rempart contre la dégradation des fonctions visuelles</p>
<p>➤ <u>Prévention des maladies du cœur</u></p>	<p>La vitamine B présente dans la clémentine protège l'organisme contre les troubles cardiaques.</p>

1. Stress oxydant

Alors le stress oxydant est défini comme étant un déséquilibre de la balance entre la production des (espèces réactives oxygénées) et la capacité anti oxydante. La production de ces derniers peut être faible et de courte durée, alors, les antioxydants endogènes sont suffisants pour assurer un équilibre redox de la cellule.

Différentes situations de déséquilibre de cette balance peuvent être observées suite à une situation d'agression intense et prolongées de l'organisme, dans ce cas, la production d'ERO est supérieure à la capacité anti oxydante, le déséquilibre prolongé conduit à une situation de stress. Le stress oxydant est à l'origine de nombreuses pathologies tel que le diabète, l'œdème pulmonaire, l'Alzheimer (Atawodi.,2005)

I. 1. Qu'est-ce-qu'un radical libre :

Un radical est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules la plupart du temps une grande instabilité, ce qui signifie qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans les cellules et que leur durée de vie en solution est très courte. Il a donc la capacité de capter ou céder un électron à une autre molécule de son entourage, pour être stable. (Borg et Reeber., 2004 ; Canneaux et al., 2011).

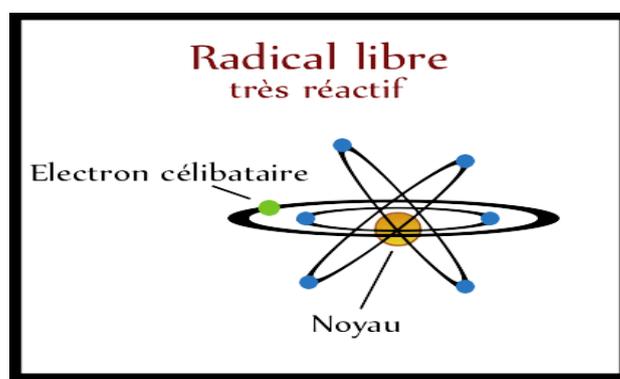


Figure 04 : Schéma d'un radical libre (Maulice, 2010).

I. 2. Rôles des radicaux libres :

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques utiles pour l'organisme à dose raisonnables comme l'apoptose et la transduction du signal cellulaire (Pincemail et Defraigne, 2004).

Ils sont produits par les cellules phagocytaires pour être utilisés dans la lutte contre les bactéries

(Delattre et al., 2005) et ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de La dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes (Favier, 2003), à la production énergétique, au règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire (Ardestani et Yazdanparast 2007)

I. 3. Les principaux radicaux libres :

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être d'origine exogène : une alimentation pauvre en antioxydants, produits des radiations (UV et rayons X), pollution de l'air (N, NO₂), amiante, métaux toxiques, solvants organiques, anesthésiques, pesticides, drogues.

Par contre l'origine endogène des ERO sont principalement les chaînes respiratoires mitochondriales de cellules des organismes aérobies (environ 2 % de l'oxygène consommé au niveau mitochondriales sont transformés en ERO particulièrement réactionnelles),

Tableau 05 : Les principales espèces réactives de l'oxygène et leur structure chimique (Haton,2005).

<u>Radicale hydroxyle</u>	<i>OH•</i>	<u>Peroxyde d'hydrogène</u>	<u>H₂O₂</u>
<u>L'oxygène singulet</u>	<u>1O₂</u>	<u>Radicale peroxyde</u>	<u>ROO•</u>
<u>Radicale alkoxyde</u>	<u>RO•</u>	<u>Hypochlorite</u>	<u>-OCl</u>
<u>Peroxynitrite</u>	<u>ONOO•</u>	<u>Radicale hydroperoxyde</u>	<u>HOO•</u>
<u>Radicale Anion superoxyde</u>	<i>O₂•-</i>		

II. Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés qui peuvent atténuer, inhiber ou prévenir l'oxydation des matières oxydables en éliminant les radicaux libres et en diminuant le stress oxydatif (Kim et Lee., 2004).

I. 1. Les Polyphénols**I. 1.1. Généralités**

Les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines. (**Dangles et al. 1992 ; Hagerman et al. 1998 ; Sarni-Manchado et Chynier, 2006**).

Ce sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux. Ils sont présents dans toutes les parties de la plante (tiges, feuilles, racines,... etc.). Un composé phénolique est un composé organique non azoté qui possède un noyau aromatique avec un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique (esters, glycosides,...etc.) (**Bruneton, 1999**).

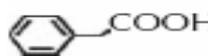
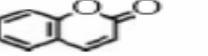
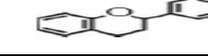
Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl-coenzyme A et de phénylalanine. Ces composés possèdent plusieurs propriétés : effet antioxydant, effet anticarcinogénique, anti-allergique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobien (**Ksouri et al., 2007; Middleton et al., 2000**)

II. 1.2. Classification :

Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (**OH**) (**Hennebelle et al., 2000**). On peut distinguer différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base (**Sarni et al., 2006**).

Ils comprennent essentiellement les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols; les tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes; les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables (**Dacosta, 2003**). Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont considérés comme les principaux composés phénoliques (**Madi, 2008**) (tableau 06)

Tableau 06: Structure des squelettes des polyphénols (Crozier *et al.*, 2006).

Nombre de carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C6-C1	Acides phénols	Acide gallique	
8	C6-C2	acétophénone	Gallacetophénone	
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide r-hydroxyphénylacétique	
9	C6-C3	Acides hydroxycinamiques	Acide r-coumarique	
9	C6-C3	Coumarines	Esculitine	
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone	
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferine	
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Resveratrol	
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes	Naringénine	

II. 1.2.1 Acides phénoliques :

Un acide phénolique est un composé organique qui possède au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique et ne possèdent pas de squelette flavane. Les acides phénoliques sont divisés en deux classes :

Les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (**Richter, 1993**).

II. 1.2.2. Flavonoïdes :**• Généralités :**

Ce sont des pigments quasi universels des végétaux presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles assurant ainsi la protection des tissus contre les agressions des ultraviolets (**Bruneton, 1993 ; Rajnerayanama et al., 2001**). C'est la couche externe des écorces d'orange, le flavedo, qui a prêté son nom aux flavonoïdes. Ce terme proviendrait également du flavus qui signifie jaune (**Malešev et Kuntić, 2007**). Ils constituent la classe la plus importante des composés phénoliques, plus de 5000 composés ont été décrits.

II. 1.2.2.1 Structure des flavonoïdes :

Les flavonoïdes dérivent du flavane qui contient 15 atomes de carbone rangés dans la configuration

C6-C3-C6 ; soit deux noyaux aromatiques A et B reliés entre eux par un hétérocycle oxygéné (C) (**Beecher, 2003**).

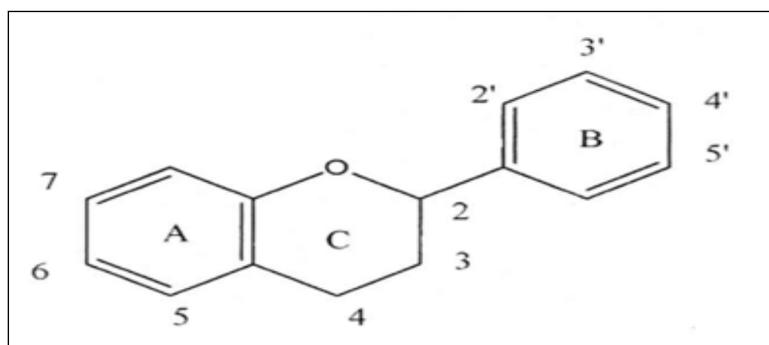


Figure 05: Structure de base des flavonoïdes (**Ghedira, 2005**).

II. 1.2.2.2 Classification des flavonoïdes :

Selon leurs structures moléculaires, Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes. La différence dans l'anneau hétérocyclique est responsable de la classification de ces composés dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavanones, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes (**figure 06**). Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides **Nkhili, 2009 (Tableau 2)**.

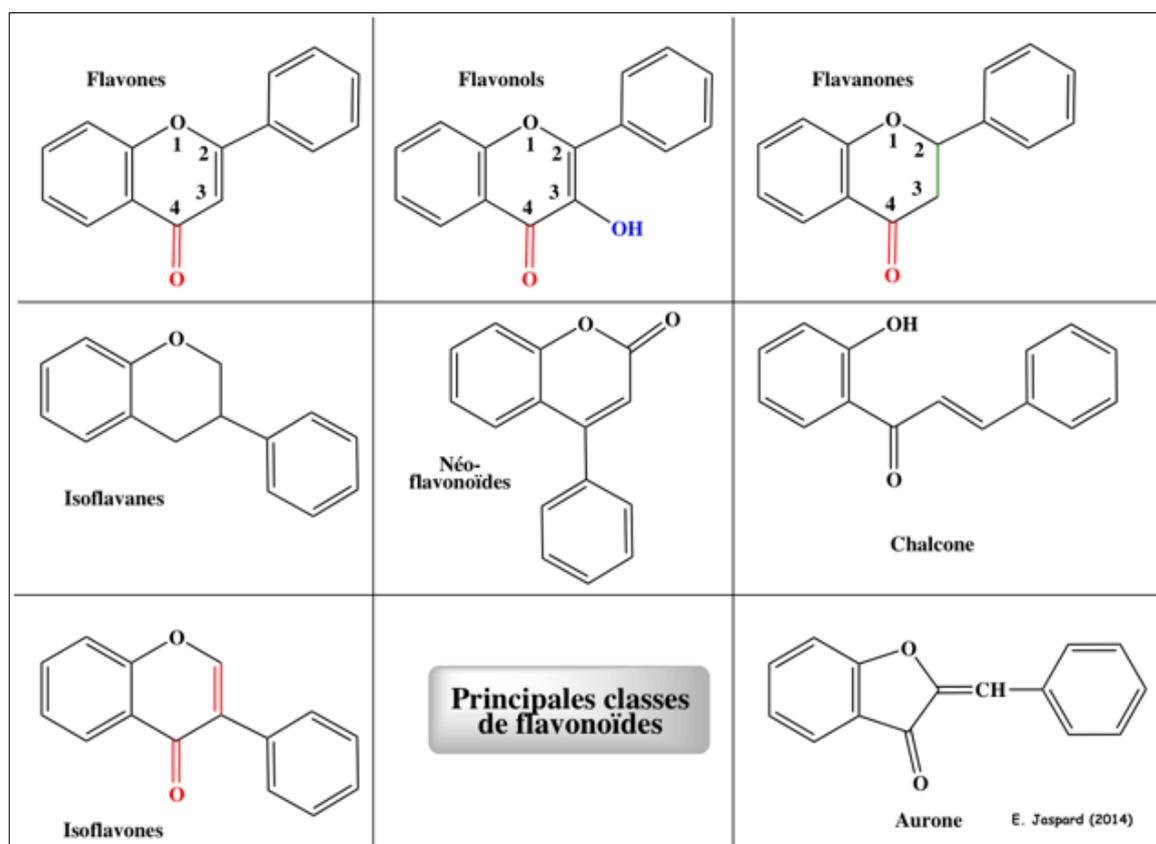


Figure 06. Principales classes des flavonoïdes (**Hallman et al., 2004**)

II. 1.2.2.2.1. Généralités sur les citroflavonoïdes :

Les citroflavonoïdes sont des polyphénols de la famille des flavonoïdes que l'on trouve spécifiquement dans l'écorce des agrumes (orange, citron, pamplemousse, mandarine, orange amère). Ce sont des pigments neutralisant les radicaux libres. Ils sont des antioxydants et améliorent l'absorption de la vitamine C (**Edeas, 2007**).

Les citroflavonoïdes sont riches en rutine, hespéridine, éryodyctol et naringénine (**Jagetia et al., 2003**). Les principaux citroflavonoïdes sont les flavanones et les flavones

- **Les Flavanones** : sont rarement présents dans les fruits exceptés dans les agrumes où on les retrouve en grande quantité, concentrés dans les écorces dont les plus abondants sont la naringénine et l'hespéridine. Ces flavanones sont le plus souvent glycosylés (**Chira et al., 2008**).

- **L'hespéridine** : (hespéridine-7-rutinoside)

La quantité d'hespéridine présente dans l'écorce d'orange est environ de 20% supérieure à celle présente dans la pulpe. C'est l'un des principaux citroflavonoïdes qui métabolise les lipides dans le sang et réduit la graisse (**Ouali et al., 2007**).

- **La naringénine** : confrère un goût amer en raison de sa fraction de glucose; c'est le principal flavonoïde de pamplemousse et l'orange amère, tandis que l'orange douce présente de faibles quantités de naringénine significatif (**Dupaigne, 1969**).

- **Les flavones** : sont présents dans les écorces d'oranges et constituent les flavones polyméthoxylés telles que la nobilétine, qui a des propriétés anti-inflammatoires et antitumorales, et des flavones glycosylés qui sont présents en faible quantités dans les écorces tels que la diosmine (**Edeas, 2007**).

II. **1.2.2.2.2. Localisation dans la plante**

Les flavonoïdes sont répartis dans les vacuoles des cellules où se trouvent sous forme glycosylés ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité pour la cellule, tandis que leur synthèse s'effectue dans les chloroplastes. 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 (**Boudjella, 2009**).

II. **1.2.2.2.3 Rôles des flavonoïdes chez les plantes :**

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-

dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Marfak, 2003).

De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation, la morphogenèse, la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (Lhuillier, 2007).

II. 1.2.2.3 Propriétés biologique des Flavonoïdes :

1. Activité antioxydante :

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés antioxydantes de ces composés naturels (Fuhrman et al., 1995).

L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (Halliwell, 1994 ; Cotelle, 2001).

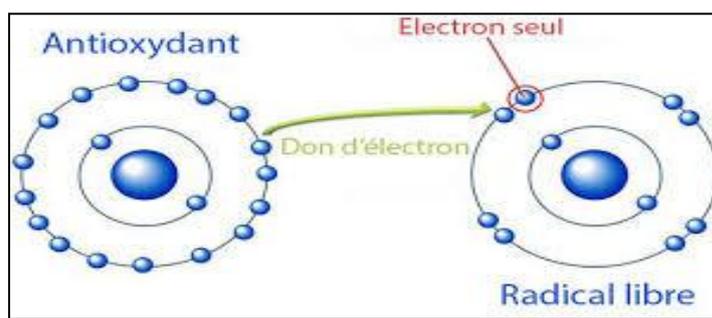


Figure 07: Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant

• a. Piégeage direct des radicaux libres

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Grâce à leur faible potentiel redox, les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes (FI-OH), sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes (ROO^\bullet), alkoxydes (RO^\bullet) et hydroxyle par transfert d'hydrogène selon la formule suivante :

$\text{FI-OH} + \text{X}^\bullet \rightarrow \text{FI-O} + \text{XH}$ Où X^\bullet représente l'un des EOR mentionnés ci-dessus (Meziti, 2009 ; Nkhili, 2009).

Le radical carboxyle résultant (FI-O^\bullet) peut réagir avec un autre radical libre pour former une

Structure quinone stable.

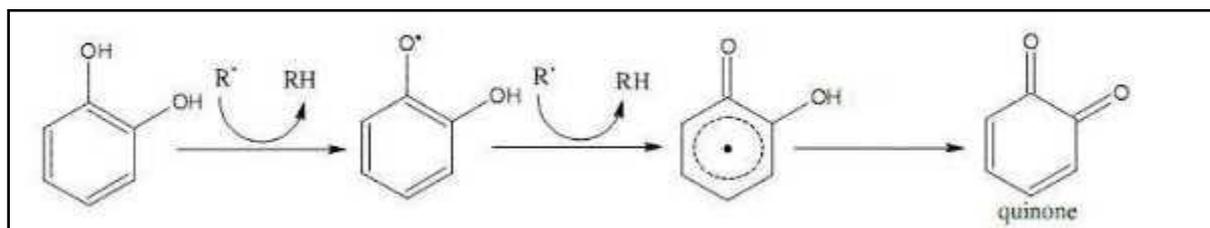


Figure 08: Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (Marfak, 2003).

b. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques.

Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes Enzymes du système de défense antioxydant (Meziti, 2009). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène.

Divers polyphénols abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques (Nkhili, 2009). Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques .

c. Inhibition enzymatique

L'inhibition de la production des EOR par les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des EOR (Nkhili, 2009).

Les polyphénols sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du $O_2\cdot^-$ et d'autres EOR, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipoxygénase, et la glutathion S-Transférase Meziti, 2009.

2. Activité antibactérienne :

les flavonoïdes sont considérés de très bons agents antimicrobiens (Harborne et Williams., 2000) et il y a aussi de nombreuses études ont rapporté les activités antimicrobiennes des flavonoïdes. (Haraguchiet *al.*, 1998 ; Iinuma et *al.*, 1994 ; Iniesta et *al.*., 1990).

L'effet toxique des composés phénoliques sur les micro-organismes dépend de ces derniers (leur poids moléculaire, leur concentration, et leur solubilité), de l'espèce microbienne considérée et des conditions du milieu.

Pour être plus actif, l'agent antimicrobien doit se fixer sur l'enveloppe externe du micro-organisme et la traverser. Cette fixation entraîne des changements de charges électriques de la membrane de la bactérie (**Barouki, 2006**). L'effet antibactérien des composés phénoliques met en jeu trois mécanismes (**Hadi, 2004**) :

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- La séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne.
- L'inhibition du métabolisme microbien.

3.Effets antiallergiques

Les effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, ces deux dernières sont responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles.

Di Carlo (1999) a étudié les effets antiallergiques de la quercétine, il a trouvé que ce flavonoïde exerce ses effets, en inactivant l'enzyme ATPase Ca²⁺-dépendante, de même l'action de la quercétine est supérieure à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament antihistaminique.

4.Autres activités des flavonoïdes

À côté des activités citées précédemment, les flavonoïdes possèdent d'autres activités:

Les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**Middleton et Elliott., 1996**), ils sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (**Mookerjee et al., 1986 ; Namgoong et al., 1994**).

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase (**Chaudhry, 1983**). Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (**Babar Ali et al., 2007**), anti-allergènes, vasodilatateurs (**Falleh et al., 2008**) et antioxydants (**Gomez-Caravaca et al., 2006**).

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique.

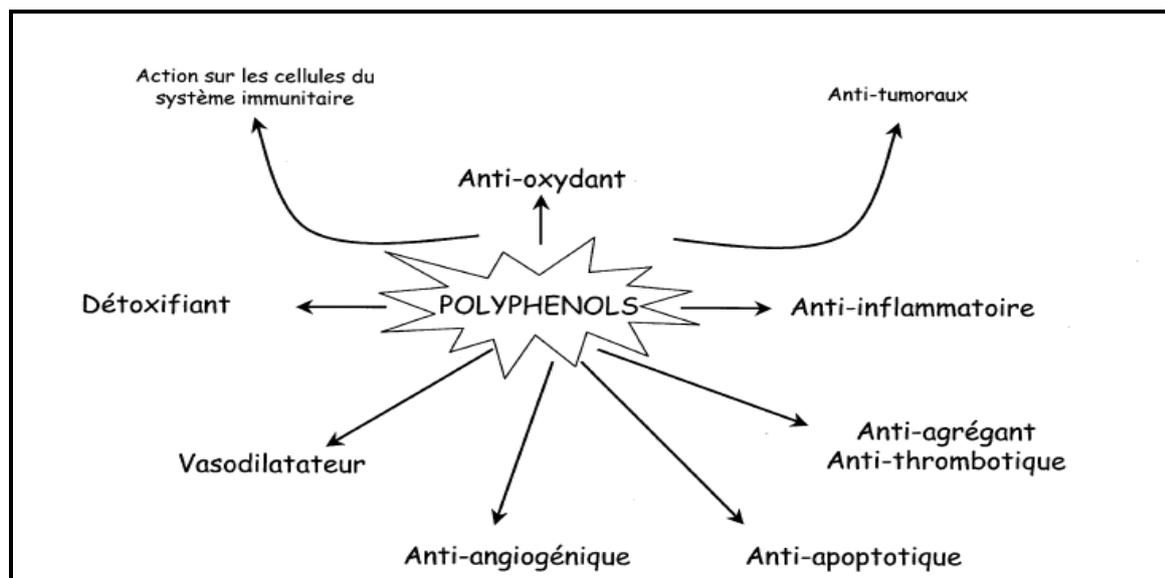


Figure 09 : Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

II. 1.2.3. Les Tanins :

Les tanins sont des molécules à poids moléculaire élevé entre 500 et 3000 qui constituent le troisième groupe important des composés phénoliques. Ainsi, les tanins se réfèrent à l'acide tannique, il a une structure qui est composée d'un glucose centrale et 10 groupes galloyl, ce sont des polyphénols soluble dans l'eau et sont présents dans les écorces des fruits de quelques plantes (Gulçin *et al.*, 2010).

Sur le plan structural, les tanins sont divisés en tannins hydrolysables et tanins condensés ou proanthocyanidines (al-zoreky, 2009).

II.1.2.3.1 Les tanins hydrolysables :

Ce sont des esters de glucose et d'acide gallique. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique, ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide- l'acide ellagique (Cowan, 1999).

II.1.2.3.2. Tanins condensés :

Qui se différencie fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone.

II 1.2.4 Propriétés antioxydants des tannins

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

Comme beaucoup de polyphénols, l'acide tannique possède des propriétés antimutagéniques et antimicrobiennes.

III. Conséquences du stress oxydant :

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires induit des processus de peroxydations : Ce phénomène aboutissant à la formation de LDL oxydées qui sont captées par des macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires, l'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (**Favier, 2003**), donc elle aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

- La toxicité des EOR s'exerce également sur les protéines : Les EOR sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction, Ils peuvent aussi agir sur les macromolécules en provoquant des inactivations enzymatiques, des fragmentations de ces molécules (collagène, protéoglycannes, acide hyaluronique) et la formation de dimères ou d'agrégats protéiniques dans les membranes cytoplasmiques (**Shimizu H., 2004**).
- Au niveau de l'ADN : les radicaux libres peuvent induire des effets oxydatifs et mutagène ou un arrêt des réplifications. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins .

Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdèmes pulmonaire, vieillissement accéléré. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles tel le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Montagnier *et al.*, 1998**).

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de physiologie, physiopathologie et biochimie de la nutrition (PPABIONUT), faculté des sciences de la nature et de la vie ; sciences de la terre et de l'univers, Université de Tlemcen

Nos travaux ont porté sur l'étude des propriétés anti-hémolytique et antioxydants de l'écorce de la clémentine (*Citrus clémentina*).

I. Préparation des échantillons :

I.1. Prétraitement du matériel végétal

Les fruits sont lavés à l'eau du robinet et nettoyés pour éliminer toutes les impuretés à l'aide d'un économe l'écorce est récupérée.

I.1.1 Séchage

Les écorces finement découpées sont mises pour le séchage dans un endroit bien aéré à une température ambiante pendant 5 à 7 jours

I.1.2 Broyage et tamisage

Après le séchage, les écorces d'oranges sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique suivi par le tamisage afin d'avoir une poudre fine. La poudre obtenue, est conservée pour l'extraction.

II. 1 Extraction des polyphénols

Avant d'entamer l'extraction proprement dite, nous avons procédé à une délipidation du matériel végétal par macération dans l'hexane. Cette étape préliminaire a pour but d'éliminer les lipides et les pigments (voir figure 10).



Figure 10:Délipidation du matériel végétal dans l'hexane.

L'utilisation du tourteau, au lieu de la plante non dégraissée, facilite la préparation de solution homogène lors des analyses et empêche la formation des émulsions dues à la présence des lipides

[Yu et Dahlgren, 2005].

L'extraction de polyphénols consiste à macérer à froid le tourteau (la poudre dégraissée) de l'échantillon à analyser dans une solution d'acétone aqueuse/eau pendant 24 heures.

Le mélange a été soumis à une filtration, Le filtrat récupéré, a été concentré par évaporation rotative à 40°C jusqu'à élimination complète du solvant.

La même procédure d'extraction des polyphénols sans tannins a été répétée pour l'extraction des polyphénols totaux sauf l'étape d'élimination des tannins est exclue.

II.2 Elimination des tanins

Les polyphénols totaux englobent l'ensemble des composés phénoliques y compris les tanins. Pour éliminer les tannins de notre résidus sec obtenu : c'est-à-dire avoir les polyphénols totaux sans tannins on procède comme suit **[FAO / IAEA, 2000].**

Le résidu obtenue est solubilisé dans 5ml d'eau distillé 1ml de la solution est prélevé. Dans un Tubed'essai un de de 100 mg de PVPP sont introduits puis 1 ml d'eau distillé et 1ml d'extrait sont ajoutés. Après une incubation à 4°C pendant 15 min, le mélange est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Le surnageant est récupérée puis Sécher dans l'étuve à 45°C.

I.3Extraction sélective des tanins :

L'extraction des tannins a été effectuée selon la méthode adaptée par **(Zhang et al.,2008).**

Mode opératoire

Dix gramme de poudre végétale dégraissée sont ajoutés à 200 ml du mélange acétone – eau (140/60, v/v). La macération dure 3 jours à température ambiante. Après filtration et élimination de l'acétone, la phase aqueuse est reprise dans du dichlorométhane (2 x 50 ml) afin d'éliminer les pigments et les traces des lipides, en utilisant une ampoule à décantier. La phase aqueuse lavée est extraite avec 4 X 50 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange des phases acétate éthylique récupéré est évaporé à sec à 40°C par un rotavapeur type HAHNVAPOR-Model : H-S-2005V-N, le résidu est repris par 3ml de méthanol.

IV. Préparation des dilutions :

II. 1. Préparation des dilutions de polyphénols totaux, des polyphénols sans tanins et des tanins:

Des dilutions sont préparées à partir de la solution mère de polyphénols totaux à 40% (4 mg dans 10 ml de PBS), afin d'obtenir les concentrations finales suivantes (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 et 0.062) mg/ml. La même procédure a été répétée avec la solution mère de polyphénols simples et les tanins pour obtenir les mêmes concentrations finales.

III.2. Préparation des combinaisons de polyphénols simples/tannins :

A partir de la concentration 4 mg/ml de polyphénols simples (sans tanins) et de tanins, trois combinaisons sont réalisées : 75% polyphénols C/25% tanins ; 50% polyphénols C/50% tanins et 25% polyphénols/75% tanins.

75% polyphénols/25% tannins : un volume de 750 µl de polyphénols avec 250 µl de tannins

50% polyphénols/50% tannins : un volume de 500 µl de polyphénols avec 500 µl de tannins

25% polyphénols/75% tannins : un volume de 250 µl de polyphénols avec 750 µl de tannins

IV. 2 Test d'hémolyse :

IV. 2.1 Principe :

-Ce test consiste à soumettre un échantillon de sang à une agression oxydante (production contrôlée des radicaux libres (**RL**)). La lyse des cellules sanguines est induite par un générateur des **RL** le **TBHP**, les érythrocytes ainsi libèrent tout leur équipement enzymatique et moléculaire pour résister à cette agression jusqu'à ce que la membrane soit modifiée et que la cellule laisse échapper son contenu (**Lesgard, 2000**).

IV. 2.2 Mode Opérateur :

Le sang prélevé est collecté dans des tubes héparines puis centrifugés à **2000 t/min** pendant 10 minutes. Le plasma est éliminé et le culot est réservé. Trois lavages successifs sont effectués avec du tampon phosphate. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à **2000 t /min** pendant **10 minutes**. Le surnageant est éliminé et le culot contenant les érythrocytes est dilué dans un tampon de phosphate pour obtenir un hémocrite de 2 %.

A la solution de globules rouges de 2 % est ajoutée **50 µl** de l'extrait d'écorce et l'incuber pendant 30 min à 37 °C sous agitation, puis **5 µl** de TBHP (pro-oxydant) sont ajoutés. Une deuxième incubation à 37°C pendant 2h sous agitation est réalisée.

IV. 2-3-Taux d'hémolyse

Dans un épendorf, **100 µl** de chaque échantillon sont introduits puis **900 µl** de PBS sont ajoutés. Le mélange est ensuite agité puis centrifugé à 2000 t/ min pendant 10 min.

La lecture du surnageant s'effectue à **545 nm**.

IV. 2-4-Hémolyse Totale :

Dans les épendorfs sont introduits **100 µl** de chaque échantillon et **900 µl** d'eau distillée glacée à 4 °C, le mélange est agité puis incubé pendant **15 min** à 4° C. La membrane des globules rouges est rompue par un choc mécanique à l'aide d'une pipette pasteur. Suivi par une Centrifugation 3000t/10min. La lecture du surnageant s'effectue à **545 nm**. . Des aliquotes de **360 µl** de l'hémolyse totale sont réservés vue du dosage des paramètres de stress oxydatif.

V. Mesure des marqueurs de stress oxydatif:

V. 1 Dosage MDA :

V. 1.1 Principe :

Le malondialdéhyde (**MDA**) érythrocytaire est mesuré selon la méthode de Draper & Hadley, 1990. Il représente le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage. Après traitement par l'acide à chaud,

les aldéhydes réagissent avec l'acide thiobarbiturique (**TBA**) pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de **TBA** et une molécule de **MDA**.

L'absorption intense de ce chromogène fait à une longueur d'onde de 532 nm. La concentration du **MDA** est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe **MDA-TBA** ; $\epsilon = 1,56.105 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 532nm

V. 2 Dosage du GSH :

V. 2.1 Principe :

Le taux du glutathion réduit (GSH) est mesuré sur le lysat érythrocytaire, le dosage est réalisé par le réactif d'Ellman (DTNB) (**Ellman,1959**). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5-dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB).

Ce dernier à pH (8-9) alcalin présente une absorbance à 412 nm avec un coefficient d'extinction égal à $13,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

VIII : Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes plus ou moins l'erreur standard (ES). L'évaluation des résultats est réalisée par l'analyse de variance par la comparaison des moyennes entre extrait combiné ou non au TBHP à différentes concentrations par le test « t » de Student. Tous les calculs sont réalisés à l'aide des fonctions statistiques (moyenne, écart type, test student) à l'aide de Microsoft Excel.

Après analyse de la variance : * $p < 0,05$ est significative ; ** $p < 0,01$ est très significative ; *** $p < 0,001$ est hautement significative.

Résultats et interprétations

I. Poly-phénols totaux :

I.1. Taux d'hémolyse :

Lorsque les érythrocytes sont mis en contact avec les polyphénols totaux combinés ou non au TBHP, le taux d'hémolyse reste inchangé pour les concentrations les plus élevées en polyphénols totaux (1,2 et 4) mg/ml. Concernant les petites concentrations en polyphénols totaux (0.062, 0.125 et 0.5) mg/ml le taux d'hémolyse augmente en présence du TBHP (**figure 11**).

I.2. Les teneurs en MDA :

Les teneurs en MDA sont diminuées à des concentrations 0,125 et 0,062 mg/ml de polyphénols totaux lorsqu'ils sont combinés au TBHP comparés aux polyphénols totaux non combinés au TBHP. Cependant aucune différence n'est observée en les teneurs du MDA pour les concentrations (0.25, 0.5, 2 et 4) mg/ml de polyphénols totaux qu'elles soient combinés ou non au TBHP (**figure 12**).

I.3. Les teneurs en GSH :

Les teneurs en GSH sont augmentées à des concentrations de (0.062 et 0,25) mg/ml en polyphénols totaux non combinés au TBHP comparés aux polyphénols combinés au TBHP. Pour toutes les autres concentrations en polyphénols totaux non combinés au TBHP aucune différence n'est observée comparée aux polyphénols combinés au TBHP (**figure 13**).

I. Les poly-phénols sans tanins

II.1. Taux d'hémolyse :

En absence de tanins, le taux d'hémolyse est diminué lorsque les polyphénols sont combinés au TBHP et ceci pour toutes les concentrations comparées aux polyphénols non combinés au TBHP (**figure14**).

II.2. Les teneurs en MDA :

Les résultats des teneurs en MDA ne montrent aucune différence pour les concentrations (1,2 et 4) mg/ml lorsque les polyphénols sans tanins sont combinés ou non au TBHP. Concernant les concentrations (0.062, 0.125 et 0.5) mg/ml des polyphénols sans tannins, les teneurs en MDA sont diminuées lorsque polyphénols sans tannins ne sont pas combinés au TBHP comparées au polyphénols sans tannins combinés au TBHP (**figure 15**).

II.3. Les teneurs en GSH :

Les teneurs en GSH sont augmentées façon hautement significative pour toutes les concentrations (0.062, 0.125, 0.5, 1, 2 et 4) mg/ml d'extraits de polyphénols sans tannins lorsque les polyphénols sans tannins ne sont pas combinés au TBHP comparés polyphénols sans tannins combinés au TBHP (**figure 16**).

II. Combinaison (polyphénols / tanins)

III.1. Taux d'hémolyse :

Les résultats montrent que le taux d'hémolyse est à son plus bas niveau quand le pourcentage de combinaison polyphenols/tannins est de (50%/50%) et ce lorsque l'extrait est non combiné au TBHP. Cependant quand l'extrait est combiné au TBHP le taux d'hémolyse le plus bas est rencontré pour le pourcentage de combinaison polyphenols/tannins de (75%/25%) (**figure 17**)

III.2. Teneurs en MDA :

La combinaison 75%polyphénols/25%tannins montre une diminution très significative des teneurs en MDA lorsque l'extrait est non combiné au TBHP comparé à l'extrait combiné au TBHP. Inversement, la combinaison 25%polyphénol /75% tannins engendre une diminution très significative teneurs en MDA lorsque l'extrait est combinés au TBHP comparé à l'extrait non combiné au TBHP (**figure18**).

III.3. Les teneurs en GSH:

Les teneurs en GSH sont augmentées pour les pourcentages de combinaison polyphénols/tannins de (75%/25%) et (25%/75%) lorsque l'extrait est non combiné au TBHP comparé à l'extrait combiné au TBHP (**figure 19**).

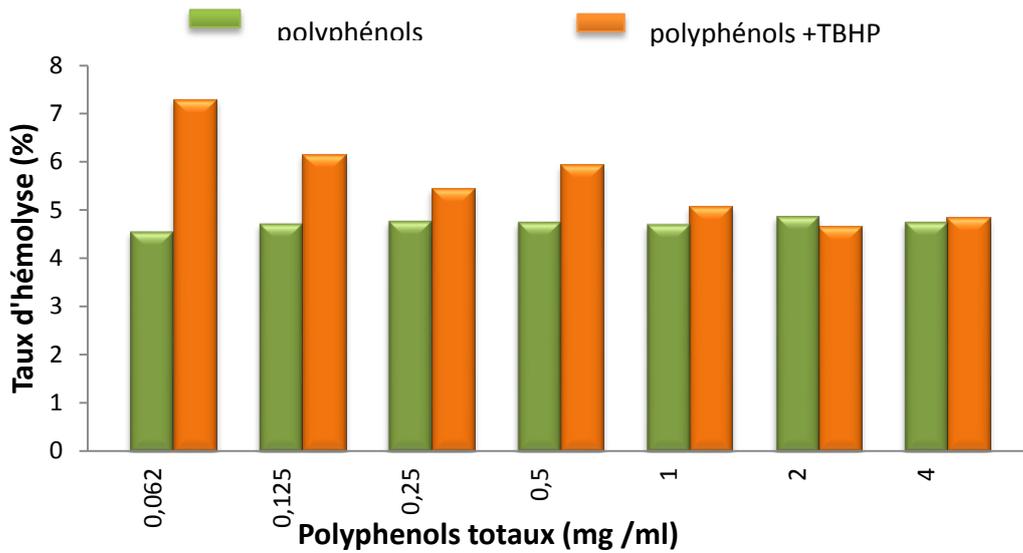


Figure 11: Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.

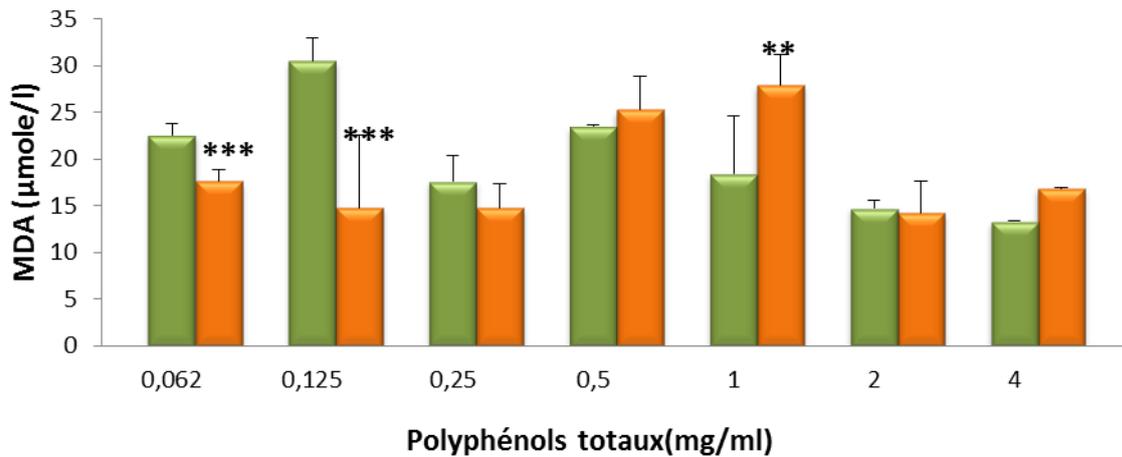


Figure12 : Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non au TBHP sur les teneurs en MDA.

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

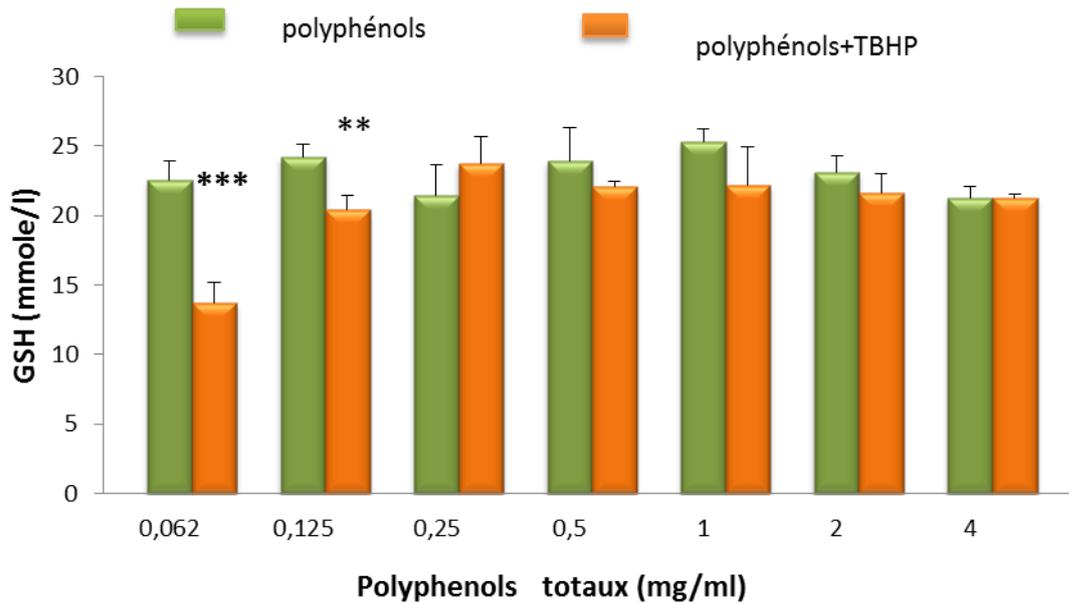


Figure13 : Effet de différentes concentrations de polyphénols totaux combinés ou non sur TBHP sur les teneurs en GSH.

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

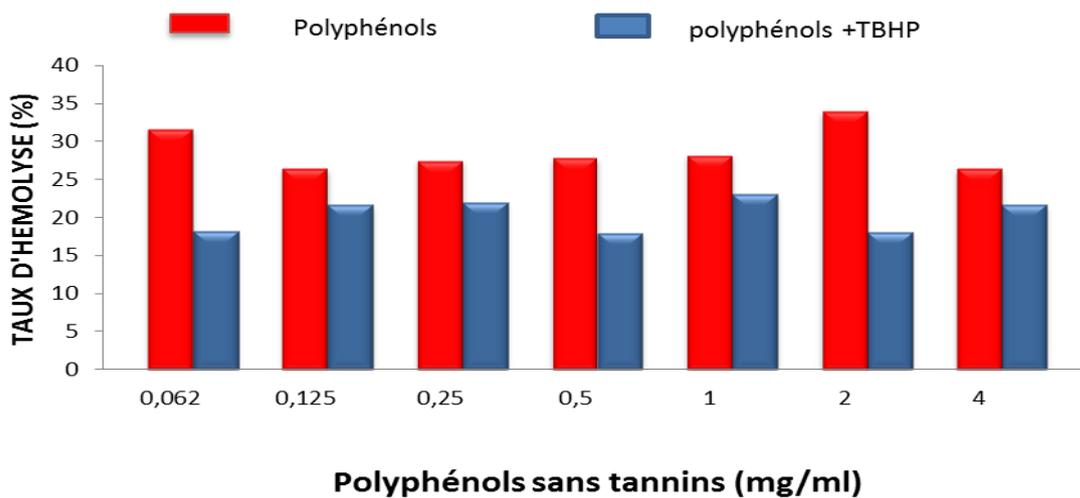


Figure14: Effet de différentes concentrations de polyphénols sans tanins combinés ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.

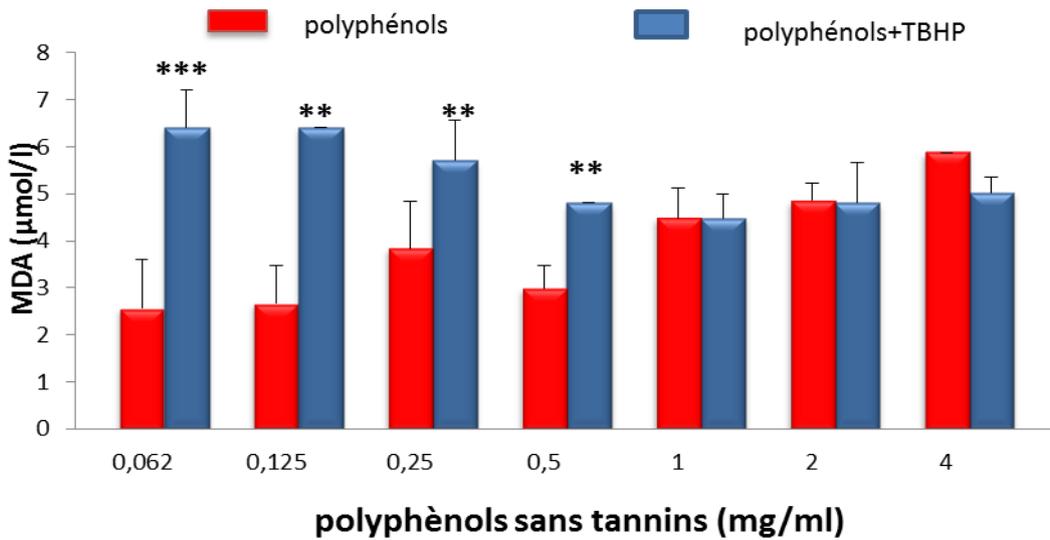


Figure 15: Effet de différentes concentrations de polyphénols sans tanins combinés ou non sur TBHP sur les teneurs en MDA.

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

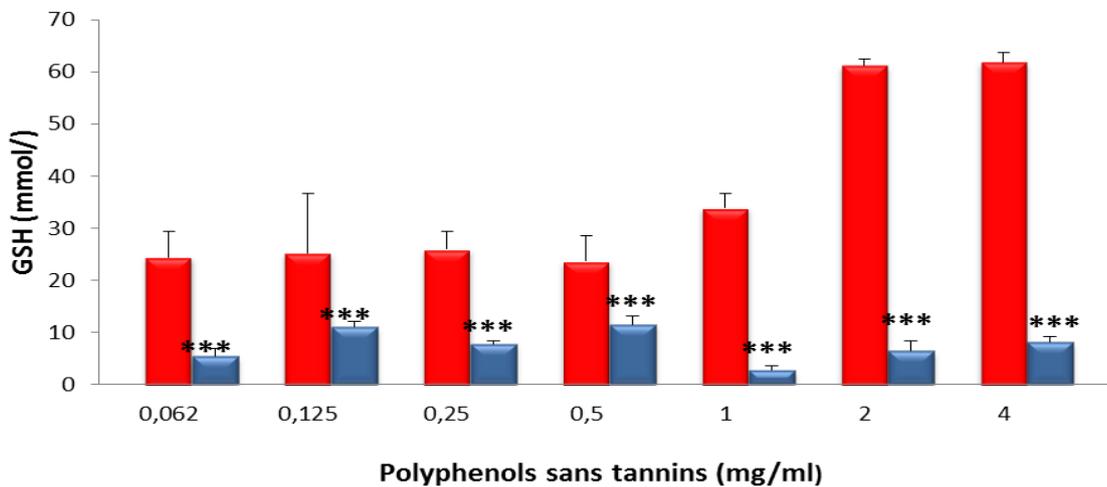


Figure 16 : Effet de différentes concentrations de polyphénols sans tanins combinés ou non sur TBHP sur les teneurs en GSH.

Chaque valeur représente la moyenne \pm erreur standard, la comparaison des moyennes entre Polyphénols sans tanins combinés ou non au TBHP est effectuée par le test « t » de student.

Après analyse de la variance : *** $p < 0,001$ est hautement significative.

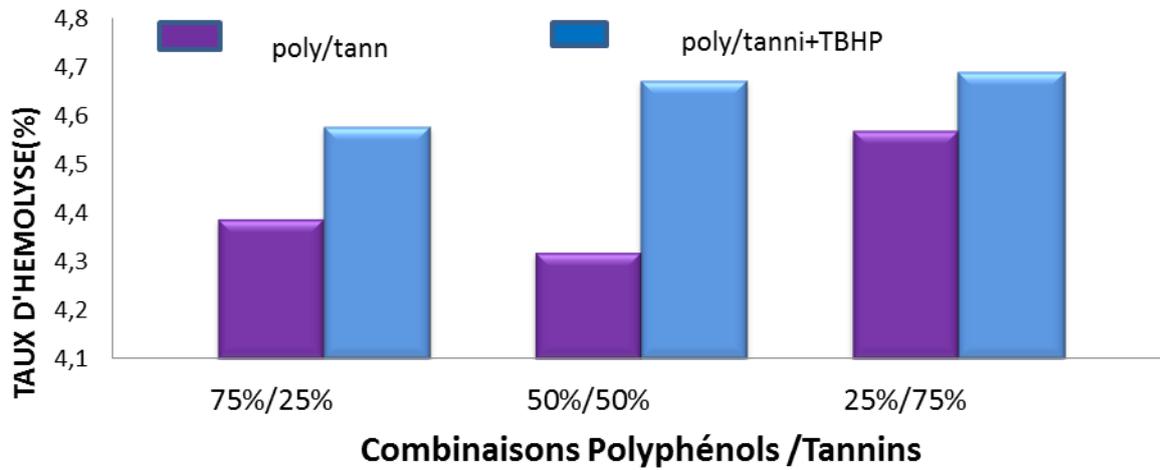


Figure 17 : Effet de différentes combinaison (polyphénols / tanins) combinés ou non au TBHP sur le taux d'hémolyse.

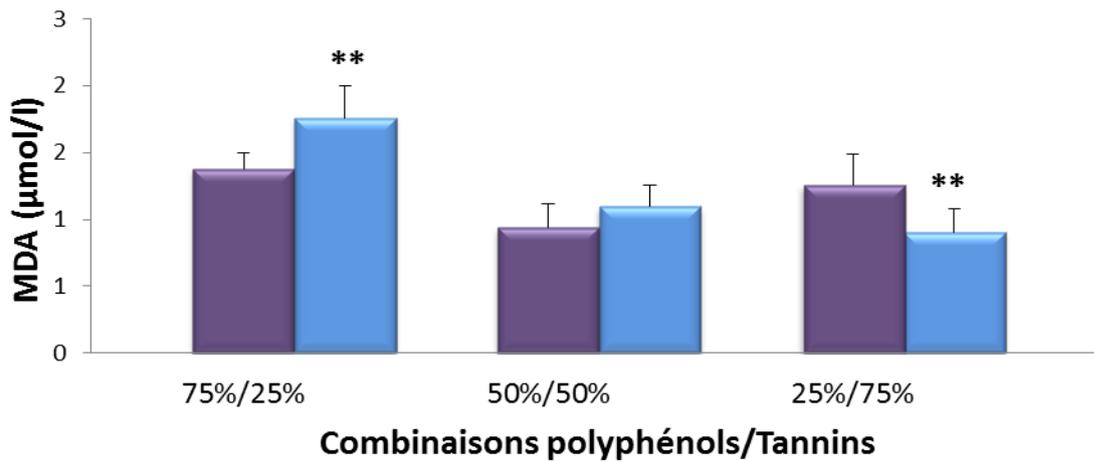


Figure 18 : Effet de différentes combinaison (polyphénols / tanins) combinés ou non au TBHP sur les teneurs en MDA .

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

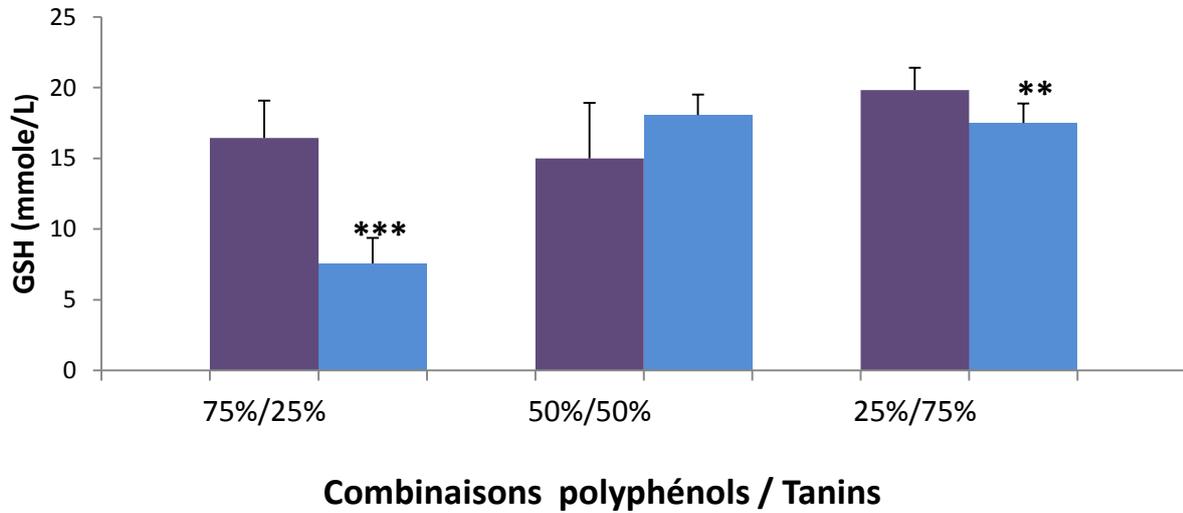


Figure 19 : Effet de différentes combinaison (polyphénols / tanins) combinés ou non au TBHP sur les teneurs en GSH.

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

Discussion

Les composés phénoliques ont des effets bénéfiques sur la santé humaine car ils possèdent de nombreuses activités biologiques comme l'activité antioxydant, anti-inflammatoire, antibactérienne.....etc.,. Leurs activités antioxydantes protègent et inhibent les effets néfastes des radicaux libres sur l'organisme humain (**Hama et al., 2017**). Ils sont particulièrement utilisés dans deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (**Leong et Shui, 2002**).

L'objectif de notre travail vise à déterminer la concentration optimale en poly-phénols, en tanins ainsi que leurs combinaisons qui permet de protéger les globules rouges de l'hémolyse et du stress oxydant.

Le test d'hémolyse est un test *in vitro* qui permet d'évaluer l'effet des extraits de l'écorce vis-à-vis de l'attaque radicalaire sur les globules rouges. Ces dernières constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydant. En raison de leurs facilités d'isolement, leurs simplicités, la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène, ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs (**Arbos et al, 2008**). En présence de molécules à activité anti-oxydantes, l'hémolyse sera logiquement retardée. Dans ce travail les radicaux libres sont générés par le TBHP.

Nos résultats montrent que Lorsque les érythrocytes sont mis en contact avec les polyphénols totaux combinés ou non au TBHP, le taux d'hémolyse reste inchangé pour les concentrations les plus élevées en polyphénols (1,2 et 4) mg/ml. Ceci prouve que les radicaux libres générés par le TBHP sont neutralisés par les poly-phénols. En effet, les poly-phénols, de par leurs actions antioxydantes peuvent protéger la membrane des érythrocytes de la rupture. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **verstraeten et al., 2003** et **Ramchoun et al., 2015** qui ont montré que les flavanols et les procyanidines(classes des flavonoïdes) interagissent avec les groupements polaires des phospholipides membranaires par des liaisons hydrogènes et s'accumulent ainsi à la surface membranaire ce qui permet de réduire l'accès des molécules radicalaires à la bicouche lipidique, par ce mécanisme les flavonoïdes pourraient maintenir l'intégrité membranaire. En plus de leurs actions anti-hémolytiques les citro-flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en cédant l'hydrogène de leurs groupements hydroxyles (**Sandhar et al, 2011**). Aussi l'effet anti-hémolytique des composés phénoliques est dû à la prévention de la formation de la méthémoglobine, suite au piégeage de peroxyde d'hydrogène et la diminution de la formation de radical hydroxyle (**Nadour.,2015**).

Concernant les petites concentrations en polyphénols totaux (0.062, 0.125 et 0.5) mg/ml le taux d'hémolyse augmente en présence du TBHP. Il est clair que de faibles concentrations en polyphénols ne protègent pas de l'hémolyse en présence d'un générateur de radicaux libres.

En absence de tanins nos résultats montrent que le taux d'hémolyse est diminué lorsque les polyphénols simples sont combinés au TBHP et ceci pour toutes les concentrations comparées aux polyphénols non combinés au TBHP.

Concernant les combinaisons nos résultats montrent que le taux d'hémolyse est à son plus bas niveau quand le pourcentage de combinaison polyphenols /tannins est de (50%/50%) et ce lorsque l'extrait est non combiné au TBHP. Cependant quand l'extrait est combiné au TBHP le taux d'hémolyse le plus bas est rencontré pour le pourcentage de combinaison polyphenols/tannins de (75%/25%).

Lorsqu'il existe un déséquilibre entre le niveau des radicaux libres dans la cellule et celui des défenses antioxydantes, des dégâts oxydatifs sont infligés à cette unité biologique. Les acides gras polyinsaturés des membranes y sont particulièrement vulnérables. Leurs oxydations génèrent des sous-produits appelés aldéhydes, comme le malonaldéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonéal (HNE). L'augmentation du taux de peroxydation lipidique due à une production exacerbée de radicaux d'oxygène peut causer des dommages à la membrane cellulaire, ce qui entraînant leur dysfonctionnement (**Chirase et al. 2004**)

Le MDA, est l'un des produits finaux de la peroxydation des lipides membranaires le plus attribué aux dommages oxydatifs ; il est souvent employé comme indicateur du stress oxydatif (**Ohkawa et al. 1979 ; Guichardant et al. 1994 ; Zhang & Kirkham 1994**). Le dosage de la MDA est un moyen efficace pour évaluer les dommages du stress oxydatif sur la membrane (**Katsuhara et al. 2005**).

❖ Le TBHP : radical synthétique a la capacité de générer des radicaux libres qui attaquent les lipides polyinsaturés des membranes ce qui provoque la peroxydation lipidique et l'augmentation du taux du MDA (**Dwight et Hendry, 1996**).

Les résultats de cette étude montrent que les concentrations en MDA érythrocytaires sont significativement diminuées à de faibles concentrations (0,125 et 0,062 mg/ml) de polyphénols totaux dans les tubes contenant les érythrocytes en présence de TBHP. Par contre pour les mêmes concentrations (0,125, 0,062 mg/ml) de polyphénols exemptent de tanins présentent des teneurs en MDA augmentées de façon très significative.

A l'inverse, les teneurs en MDA sont élevées concernant les polyphénols sans tanins en présence de l'agent pro-oxydant TBHP. Des études expliquent que les poly-phénols ont une action pro-oxydant en raison de leur capacité à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{+2}) qui réagit ensuite avec le H_2O_2 pour donner le radical hydroxyle qui oxyde des lipides (**Delattre et al., 2005**). De plus la décomposition du TBHP produit un radical libre qui attaque les lipides polyinsaturés des membranes ce

qui provoque la peroxydation lipidique selon la réaction de Fenton (**Kehrer, 1993; Ball, 2008**).

Il est aussi possible que l'absence des tanins dans un extrait de composés phénolique protègent moins de la peroxydation lipidique. Autrement dit, les tanins est la fraction qui augmente la protection contre la peroxydation lipidique lorsqu'ils sont présents dans un extrait phénolique.

Concernant les combinaisons polyphénols/tanins : Les teneurs en MDA sont diminuées pour les pourcentages de combinaisons polyphénols/tannins 25%polyphénols / 75 % tannins. Ce résultat témoigne que les fortes proportions de tanins diminuent les teneurs en MDA .

Le glutathion : est une protéine que nous produisons naturellement et qui est composée de trois acides aminés (cystéine, acide glutamique et glycine) (**Flora et al., 2008**).

Le glutathion est un antioxydant cellulaire important car il possède un groupe soufre-hydrogène (SH) qui explique sa capacité à donner facilement un électron, il s'oxyde et deux molécules de GSH se lient l'une à l'autre par un pont fait d'atomes de soufre pour former ce qu'on appelle logiquement le glutathion oxydé (GSSG). Le GSSG peut être retransformé en glutathion réduit. Afin de maintenir un équilibre de l'état d'oxydoréduction de glutathion (GSH/GSSG)(**Leverse, 2009**).Le GSH peut interagir directement avec toute une gamme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme le redoutable radical hydroxyle. En plus de neutraliser directement des ROS,

Concernant les teneurs érythrocytaires du GSH, nos résultats révèlent des teneurs élevées en GSH lorsque les polyphénols totaux sont en faibles concentrations : (0,125 et 0,062) mg/ml et non combinés aux TBHP (agent pro oxydants). Il est clair que les faibles concentrations en polyphénols ne peuvent garder des teneurs en GSH élevées lors d'un stress oxydatif.

Lorsque les polyphénols sans tanins sont mises en contact avec Les érythrocytes, les teneurs de GSH sont élevées et ce pour toutes les concentrations en absence du TBHP.

Enfin concernant les combinaisons polyphénols/tanins. Les teneurs en GSH sont augmentées pour les pourcentages de combinaison polyphénols/tannins de (75%/25%) et (25%/75%) lorsque l'extrait est non combiné au TBHP comparé à l'extrait combiné au TBHP.

La diminution du GSH peut être attribuée à sa forte utilisation. En effet le GSH est capable de neutraliser les radicaux libres générés par le TBHP empêchant ainsi l'oxydation des acides gras (Jones et al ., 2002 ;Martin, 2003).

Conclusion

L'écorce de la clémentine (*Citrus clémentina*) constitue un gisement riche en ingrédients fonctionnels connus pour leurs activités anti-oxydantes. Les poly-phénols sont de puissants antioxydants présents dans l'écorce. Cependant l'activité biologique des tanins, fraction des poly-phénols est peu connue.

Ce travail a pour objectif d'étudier l'effet protecteur *in vitro* des poly-phénols et les tanins vis-à-vis des dommages oxydatifs sur les érythrocytes.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'impact de différentes concentrations des poly-phénols et les tanins ainsi que leurs combinaisons sur les érythrocytes. Ceci, afin de relever les concentrations et la combinaison qui protègent le mieux des dommages oxydatifs.

Concernant le test d'hémolyse, nos résultats montrent que les grandes concentrations en poly-phénols protègent le mieux de l'hémolyse.

Pour les combinaisons polyphénols /tanins le pourcentage de combinaison qui abaisse la plus le taux d'hémolyse est 75% polyphénols/25%tanins.

Pour la peroxydation lipidique, elle est diminuée lorsque les polyphénols sont en faibles concentrations (0,062 ; 0,125) mg/ml en présence d'un stress oxydant.

La combinaison 25%polyphénol /75% tanins diminue les teneurs en MDA manière significative lors d'un stress oxydant.

Concernant le glutathion réduit, les concentrations élevées en poly-phénols totaux (4 ; 2 ; 0,5 et 0,25) mg/ml arrivent à maintenir des teneurs stables en GSH en absence ou en présence du TBHP.

Enfin concernant les combinaisons polyphénols/tanins. Les teneurs en GSH sont augmentées pour les pourcentages de combinaison de 25% polyphénols/75% tanins.

Il serait intéressant de pousser cette étude en :

- Essayant de d'extraire les différentes fractions de poly-phénols de la clémentine afin d'identifier la fraction qui possède l'activité anti-oxydante la plus élevée.
- Explorer l'activité anti-oxydante des poly-phénols de la clémentine *in vivo*.

Références bibliographiques

A

Agostini D., (1996). *Quelle démarche de recherche sur la qualité pour une production locale? La clémentine de Corse.* *Fruits*, 51(6): 407-415.

Atawodi, S.E (2005). *antioxidant potential of African plant.* *African journal of biotic.*4(2):128-133.

Ardestani, A., Yazdanparast,R. (2007) Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem.* **104**: 21-29.

Al-zoreky, N.S. (2009). Antimicrobial activity of *pomegranate (punica grantum L.)* fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, **134**: 244-248

Arbos K.A., Claro L.M., Borges L., Santos C.A.M., Weffort-Santos A.M.(2008). *Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts.* *Nutrition Research.***28**:457-463.

B

Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2007) Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules.* **12**: 607-621.

Barouki, R., (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine / Sciences.* France : 266-72.

Beecher, G.R., 2003. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *American Society for Nutritional Sciences* 133 (10), 3248-3254

Borg, J. et Reeber, A., (2004). Intéraction des métabolismes et stress oxydant. *In : Biochimie métabolique.* P : 198-234.

Bocco, A., Cuvelier, M.E. Richard, H., Berset, C. (1998). Antioxydant Activity and Phenol Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *J. Agric. Food Chem*, **46(6)**: 2123-23

Boudjellal K., (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnus angustifolia* L. Mémoire de Magister Université de Batna : 9-29-3

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary, sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr.Rev.***56**:317-333.

C

Canneaux, S., Wallet, A., Ribaucour, M., and Louis, F., (2011). A theoretical study of the NCN (3 Σ^-) biradical thermochemical properties: Implications for combustion chemistry, *Computational and Theoretical Chemistry*, (967): 67-74

Chirase N.K., Greene L.W., Purdy C.W., Loan R.W., Briggs R.E., Mc Dowell L.R. (2004). Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am. J. Vet. Res.*, **65**, 860-886

Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 564-582.

Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*, **1**: 569-590.

Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K. et al., (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod*, **61**: 71-76.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

D

Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Paris : Ed Yves Dacosta. P. 317.60

Durant, D., Damon, M., Goubert, M. (2013). le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. *Cahier de nutrition et de diététique*(48)218-224.

Delattre J, Beaudoux J-L, Bonnefort-Rousselot D, (2005). Radicaux libres et stress oxydant : Aspect biologiques et pathologiques. *Tec et Doc Lavoisier, Londres -Pris -New York*.

Dwight J F, Hendry B M. (1995). Effects of membrane incorporation of short-chain phospholipids on sodium pump function in human erythrocytes. *Clin Chim Acta*

.Dangle et al. (1992) wvery distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33: 5227-30.

E

Ellman G.L., (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82(1): 70-77

Edeas, M. "Citroflavonoïdes." *Phytothérapie* 5.4 (2007): 210-211.

F

- Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M. (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**: 549-554.
- Favier, A. (2003)** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115.
- Flora S.J.S., Mittal M., & Mehta A., (2008).** Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, *128*(4): 501.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdely, C. (2008)** Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*. **331**: 372-379.
- Fernandez-Gutierrez, A. (2006)** Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**: 1220-1234.

G

- Gulcin, I., Huyut, Z.B., Elmastas, M., Hassan, Y. ET Aboul-Eein, d. (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of chemistry*. **3**: 43-53.
- Gardner P. T., White T. A., McPhail D. B., and Duthie G. G., (2000).** The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, *68*(4): 471-474.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Goulas V., Manganaris, G.A., (2012).** Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*. *131* : 39-47.
- Ghedira, K., (2005).** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois et thérapeutique. *Phytothérapie* *17*(4), 162-169.

H

- Haton, C. (2005).** Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, pp: 43

Hadi M., (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat en Sciences : Université Louis Pasteur Domaine : Pharmacochimie*. 23-24.

Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentielles dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. **1** :3-6.

J

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Simic, M.G., Hara, Y. (1998). Antioxidant properties of flavonoids. *AHDIEQ Journal*, **7**: 137-161

Jolivel A (2013). Glutathion : antioxydant, détoxiquant, immunostimulant. *NatureAlgue*. P8.

Jones DP et al.(2002). Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant and dried peels from satsuma mandarin *Citrus unshiu* (Marcov.) on hydroperoxyde generation from oxidized linoleic acid, *Phytother. RES.* **16**:781–784.

Jagetia GC, Venkatesha VA, Reddy TK .,(2003) Naringin, a citrus flavonone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis* **18**(4): 337–343.

K

***Koehler-Ramonatxo C., (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20**(4) : 165-177

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

L

Liu Y., Heying E., and Tanumihardjo S. A., (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **11**(6): 530-545.

Louis Version numérisée du livre *La Clémentine. Les hybrides du "citrus nobilis"* par le Docteur Louis Trabut (1853-1929), publié en 1926.

Leverse X., (2009). Stress oxydant et antioxydants? *Médecine et nutrition*, (44): 219-244.

Lesgards J.F. (2000). Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme ; aspect chimiques et biochimiques. Thèse de doctorat. Pages 19-20.

Loeillet(2010)-la production mondiale des agrumes ''les marchés mondiaux''

M

Martin S., Andriantsitohaina R. (2002) Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. **51**: 304-315.

Maulice., (2010). De l'étiquette à l'assiette : comprendre ce que l'on mange. *Au coeur de la Scienc.*

Martin, S., Andriantsitohaina, R., (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium, université Louis-Pasteur, 74, route du Rhin, 67401 Illkirch, France

Martin F.(2003). Vannin-1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant

Madi A., (2008). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de Magister Université de Constantine. : 12-15-18-19- 42-47-49

Millind S.L., (2008). Citrus Fruit: biology, technology and evaluation. Elsevier USA, (1): 103-121.

Milind P., and Dev C., (2012). Orange: range of benefits. *Int Res J Pharm*, 3(7): 59-63.

Montagnier L, Olivier R, Pasquier C, (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerativediseases, *Marcel Dekker, New York.,*

N

Nadour,M. (2015).Extraction, caractérisation des polyphénols issus des sousproduitsoléicoles .Valorisation des polysaccharides à visée alimentaire .Thèse de doctorat, université de mouloud Mammeri de TiziOuzou ,160-162p

Nkhili E., (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant Thèse de doctorat Université de MARRAKECH. :187-193.

P

Pincemail. J., Defraigne. J.O., (2004). Les antioxydants : un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Université de liège, *service de chirurgie cardiovasculaire, probioxSA.SartTilman 4000 Liège, Belgique 1: 1*

R

Ramful D., Bahorunb T., Bourdonc E., Tarnusc E., Aruoma O. I., (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits. Potentialprophylacticingredients for functionalfoods application. *Toxicology*, 278 (1): 75-87

V

Versteeg C., (1979). Pectinesterases from the orange fruit-their purification, general characteristics and juice cloud destabilizing properties. Centre for Agricultural Publishing and Documentation

Verstraeten, SV., Keem, C-L., Schmitz, HH., Fraga, CG., and Oteiza, PI. (2003). Flavan-3ol and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free radical, bio, med*, 34(37):84-92.

S

Sagee O., Berry E.M., Aubert Bernard. (1996). *Fruitrop (Ed. Française) (27) : 11.*

Shimizu, H. (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population : *the Hisayama study, Stroke*, **35** (9) : 2072-2077

Swingle W. T., (1967). The botany of Citrus and its wild relatives. *The citrus industry*: 190-430.

T

Trabut L., (1926). Les hybrides de Citrus nobilis: La Clémentine. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 6(60), 484-489.

O

Ortiz, J.M. (2002). Citrus. Botany: taxonomy, morphology and physiology of fruits, leaves and flowers. *Taylor & Francis*, 2: 16-35.

Résumé :

La clémentine (citrus clémentina) constitue une source de régime alimentaire riche en composés bioactifs, La peau de la clémentine constitue des sources considérables d'antioxydants. Le but de ce travail est de mettre en évidence l'impact de différentes concentrations des poly-phénols et les tannins ainsi que leurs combinaisons sur les érythrocytes. Ceci, afin de relever les concentrations et la combinaison qui protègent le mieux des dommages oxydatifs, par l'évaluation pouvoir anti-hémolytique et le dosage de deux paramètres de stress oxydants (MDA et GSH). Nos résultats révèlent que les grandes concentrations en poly-phénols protègent le mieux de l'hémolyse. Pour les combinaisons polyphénols /tanins le pourcentage de combinaison qui abaisse la plus le taux d'hémolyse est 75% polyphénols/25%tanins. En absence de tanins nos résultats montrent que le taux d'hémolyse est diminué lorsque les polyphénols simples sont combinés au TBHP et ceci pour toutes les concentrations comparées aux polyphénols non combinés au TBHP.

Concernant, la peroxydation lipidique, elle est diminuée lorsque les polyphénols sont en faibles concentrations (0,062 ; 0,125) mg/ml eten présence du TBHP.

La combinaison 25%polyphénol /75% tanins diminue les teneurs en MDA manière significative lors 'un stress oxydant. Autrement dit, les tanins est la fraction qui augmente la protection contre la peroxydation lipidique lorsqu'ils sont présents dans un extrait phénolique. Concernant le glutathion réduit, Les concentrations élevées en poly-phénols totaux (4 ; 2 ; 0,5 est 0,25) mg/ml arrivent à maintenir des teneurs stables en GSH en absence ou en présence du TBHP. Lorsque les polyphénols sans tanins sont mises en contact avec Les érythrocytes, les teneurs de GSH sont élevées et ce pour toutes les concentrations en absence du TBHP. Enfin concernant les combinaisons polyphénols/tanins. Les teneurs en GSH sont augmentées pour les pourcentages de combinaison de 25% polyphénols/75% tanins.

Mots clés : Poly-phénols, tanins, hémolyse, écorce, clémentine.

Summary:

Clementine (citrus clementina) is a source of diet rich in bioactive compounds, the clementine bark's is a considerable source antioxidants'. The purpose of this work is to highlight the impact of different polyphenols'and tannins' concentrations and their combinations on erythrocytes. This is to identify the concentrations and combination that best protect against oxidative damage, by assessing anti-hemolytic potential and assaying two oxidative stress parameters (MDA and GSH). Our results reveal that high concentrations of polyphenols best protect against hemolysis. For the polyphenol / tannin combinations, the percentage of combination which lowers the hemolysis rate is 75% polyphenols / 25% tannins. In the absence of tannins our results show that the hemolysis rate is decreased when the simple polyphenols are combined with TBHP for all concentrations compared to polyphenols not combined with TBHP. Regarding lipid peroxidation, it is decreased when the polyphenols are in low concentrations (0.062, 0.125) mg / ml in the presence of TBHP. The 25% polyphenol / 75% tannin combination significantly reduces MDA levels during oxidative stress. In other words, tannins is the fraction that increases protection against lipid peroxidation when present in a phenolic extract. With regard to reduced glutathione, the high concentrations of total polyphenols (4; 2; 0.5 is 0.25) mg / ml achieve stable levels of GSH in the absence or presence of TBHP. When the polyphenols without tannins are brought into contact with the erythrocytes, the GSH levels are high for all concentrations in the absence of TBHP. Concerning the polyphenol / tannin combinations, the GSH contents are increased for the combination percentages of 25% polyphenols / 75% tannins.

Key words: Polyphenols, tannins, hemolysis, bark, clementine.

ماخض:

الكليمنتين (الحمضيات كليمنتينا) مصدر غذائي غني بالمركبات النشطة بيولوجيا، قشرة كليمنتين هي مصدر كبير من مضادات الأكسدة. الغرض من هذا العمل هو تسليط الضوء على تأثير تراكيز مختلفة من البوليفينول، التانينات و تركيبهما معا على كريات الدم الحمراء. من اجل تحديد التركيزات التي تحمي بشكل أفضل ضد الأكسدة من خلال تقييم إمكانات مكافحة الانحلال ومعايرة معلمتين للتأكسد (GSH و MDA). تكشف نتائجنا أن التركيزات العالية من البوليفينول تحمي بشكل أفضل من انحلال الدم. بالنسبة لتركيب البوليفينول / التانينات، فإن النسبة المئوية التي تقلل من معدل انحلال الدم هي 75% بوليفينول / 25% من التانينات. وفي غياب التانينات، تظهر نتائجنا أن معدل انحلال الدم ينخفض عندما تكون البوليفينول البسيط المقترن TBHP لجميع التركيزات مقارنة مع البوليفينول الغير المقترن TBHP. فيما يتعلق بأكسدة الدهون فهي تنخفض عندما تكون البوليفينول بتركيزات منخفضة (0.0620.125) ملغم / مل في وجود MDA TBHP. مزيج البوليفينول بنسبة 25% / 75% التانين يقلل بشكل كبير من مستويات الإجهاد التأكسد. بمعنى آخر، التانينات هو العنصر الذي يزيد الحماية ضد بيروكسيد الدهون عند وجوده في مستخلص الفينول. فيما يتعلق بتخفيض الجلوتاثيون فإن التركيزات العالية من البوليفينول الكلي (4؛ 2؛ 0.5 و 0.25) ملغم / مل تحقق مستويات مستقرة للجلوتاثيون في غياب أو وجود TBHP. عندما يتم ملامسة البوليفينول الخالية من التانينات مع كريات الدم الحمراء، تكون مستويات GSH مرتفعة بالنسبة لجميع التركيزات في غياب TBHP. أخيرًا بخصوص تركيبة البوليفينول/ التانينات، يتم زيادة محتويات GSH للنسب المئوية المركبة من 25% من البوليفينول/75% من التانين.

الكلمات المفتاحية: البوليفينول، التانينات، انحلال الدم، اللحاء، كليمونتين.