

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Sciences Biologiques
Option : Biochimie et Biologie Moléculaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Caractérisation phytochimique et activité anti-hémolytique des extraits de *Citrus*.

Présenté par :

M^r Larab Salim & M^r Makhlouf Abderrahim

Devant le jury composé de :

Mr OUCHEMOUKHE S.	MCA	Président
Mme KHETTAL B.	MCA	Encadreur
Mme CHAHER N.	MCB	Examineur

Année universitaire : 2016 / 2017

Dédicaces

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

Je profite cette occasion qui marquera à jamais mon cursus universitaire pour dédier ce mémoire à tous ceux qui m'ont apporté aide et m'ont soutenu en particulier

Ceux qui j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et que je suis très fière de les avoir comme parents et que tout les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte ma mère: qui pense à moi toujours, et mon père qui ma donné force pour continuer Mes études.

Mes très chers frères et sœurs qui m'ont aidé beaucoup dans mes études. et pour leurs soutien et leurs sacrifices énormes.

*A mes chers grands parents, mes chères grands pères
:Amokrane et lakhdar*

Mes grandes mères: hafida et ouarda

A mes très chères Tantes Et oncles paternels et maternels

A mes très chers amies et collègues, SANS exception.

Surtout:chouaib,yakoub,rahim,moumouh ELH,tayeb,amir walid,et hamza.

Toute la famille Larab et akhrouf

Aussi, Je tiens à exprimer ma sincère gratitude ainsi que mes vifs remerciements à mon encadreur khettal- B

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

L . Salim

Dédicaces

Ce modeste travail, achevé avec l'aide de Dieu le tout puissant, est dédié à tous ceux que j'aime.

*A*ux deux êtres les plus chers au monde, Pour leurs confiance, leurs amours leurs sacrifices, qui n'ont jamais cessé de témoigner leurs affections et m'apporter leurs soutiens et encouragements depuis toujours, mes très chers parents, je prie pour que dieu vous garde pour moi. Merci pour tout.

*A*mes très chers frères.

*A*mes chers amis.

A ma grand-mère et grand père.

A toutes mes tantes et oncles.

A toutes mes cousines et cousins.

A Tous les enseignants qui m'ont suivis au long de mon parcours éducatif.

A toute la promotion de biochimie et biologie moléculaire 2017.

A. Rahim

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères tout d'abord au "Bon Dieu" pour la patience et la santé qui nous ont été utiles au long de notre parcours.

Il nous est agréable également de remercier les membres de jury :

M^{me} Khettal, d'avoir accepté de nous encadrer et qui nous a suivi avec bienveillance et beaucoup d'intérêt à fin de réaliser ce travail dans des conditions favorables.

M^r Ouchemoukhe. S. pour sa présence en tant que président de jury.

M^{me} chahir. N. pour avoir accepté d'examiner notre travail.

A l'ensemble du personnel de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Nos remerciements vont également à tous ceux qui nous ont aidé et soutenu de près ou de loin.

Que Dieu vous accorde, son aide dans tout vos projets et activités.

A.Rahim & Salim

INTRODUCTION.....	1
I-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I-1 Généralités sur le sang.....	3
I-1-1 Composants biochimiques du sang.....	3
I-1-2 Les cellules du sang	4
I-1-2-1 Erythrocytes (hématies ou les globules rouges)	4
I-1-2-2 Les globules blancs	4
I-1-2-3 Les thrombocytes (ou plaquettes)	5
I-2 Généralités sur les hématies.....	5
I-2-1 Caractéristique des hématies	5
I-2-2 Rôle des globules rouges	5
I-2-3 Biosynthèse des globules rouges	6
I-3 Processus de l'hémolyse	6
I-3-1 Destinée et destruction des érythrocytes (GR)	7
I-3-2 Anémies hémolytiques.....	8
I-3-3 Types et mécanismes d'hémolyse pathologique.....	8
I-3-4 Sièges des Hyper-hémolyses	9
I-3-5 Les anti hémolytiques.....	10
II- MATERIELS ET METHODES.....	12
II-1 Préparation de la poudre végétale	12
II-2 Extraction par macération.....	12
II-3 Dosage des polyphénols.....	12
II-3-1 Dosage des polyphenols totaux.....	12
II-3-2 Dosage des flavonoïdes	13
II-4 Mise au point des tests d'hémolyse induite <i>in vitro</i>	14
II-4-1 Préparation de la suspension des érythrocytes.....	14
II-4-2 Induction de l'hémolyse <i>in vitro</i>	15

II-4-2-1 Principe.....	15
II-4-2-2 Test de l'Hémolyse hypotonique.....	15
II-4-2-3 Test d'hémolyse par le triton X100.....	16
II-4-2-4 Test de la thermohémolyse	16
II-4-2-5 Test d'hémolyse par le H ₂ O ₂	16
II-4-3 Evaluation de l'Effet anti-hémolytique des extraits de citrus.....	16
II-4-3-1 Effet sur l'hémolyse induite par le triton X-100.....	16
II-4-3-2 Effet sur l'hémolyse induite par pression hypotonique	17
II-4-3-3 Effet sur l'hémolyse induit par le H ₂ O ₂	17
III- RESULTATS.....	18
III-1 Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes.....	18
III-2 Effet du NaCl sur l'hémolyse hypotonique.....	18
III-3-Effet de l'éthanol sur l'hémolyse hypotonique.....	19
III-4 Effet de la concentration du triton x-100 sur le taux d'hémolyse	20
III-5 variation du taux d'Hémolyse induit par la température.....	21
III-6 Variation du taux d'Hémolyse induit par H ₂ O ₂	22
III-7 Effet des extraits de citrus sur l'hémolyse hypotonique.....	23
III-8 Effet des extraits de citrus sur l'hémolyse induit par le triton x-100.....	24
III-9 Effet des extraits sur l'hémolyse induit par le H ₂ O ₂	25
IV DISCUSSION	27
CONCLUSION ET PERCPICTIVE.....	30
REFERENCE BIBLIOGRAPHIE.....	31

Liste d'abréviation

Liste d'abréviation

AG :Acide gallique

ARN: acide ribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

BFU-E: Burst forming unit-erythroid

CFU-E: Colony forming unit-erythroid

Eq :équivalent

G6P: glucose 6 phosphate.

GR: globule rouge

Hb: hémoglobine

IC₅₀:concentration inhibitrice de 50% d'hémolyse.

Me : masse de l'extrait sec

Min: minute

ml: millilitre

Mp : masse de la poudre végétale utilisée pour l'extraction

Q : quercétine

Rd : rendement

REG: réticulum endoplasmique granuleux

Liste des figures

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Protocole de dosage des flavonoïdes.	14
2	Effet de la tonicité sur les érythrocytes à différentes concentrations de NaCl.	19
3	Effet de la tonicité sur les érythrocytes à différentes concentrations de NaCl(5%,7.5%,9%) en présence de l'éthanol.	20
4	Effet du triton (x-100) a différentes concentration sur les érythrocytes.	21
5	Effet de la variation de la température sur les érythrocytes.	22
6	L'effet de H ₂ O ₂ sur les érythrocytes avec et sans l'éthanol.	23
7	Taux d'inhibition d'hémolyse hypotonique en présence des différents extraits de citrus à différentes concentrations.	24
8a	Effet des extrait de citrus sur l'hémolyse induite par le triton X-100.	25
8b	l'évaluation de l'effet anti hémolytique de l'extrait 3 sur l'hémolyse induite par détergent	25
9	Effets des différents extraits éthanoliques de feuilles de citrus sur l'hémolyse induite par le H ₂ O ₂	26

Liste des tableaux

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique.	11
II	Teneur en polyphenols et en flavonoïdes des feuilles de différentes variétés de Citrus.	18

Introduction

Introduction

Introduction

La plupart des espèces végétales possèdent des vertus thérapeutiques, en raison de leur richesse en substances actives issues principalement de leur métabolisme secondaire. Elles possèdent, en effet, des avantages dont les médicaments d'origine synthétique sont souvent dépourvus. Il y'a environ 500000 plantes sur la terre dont 10000 d'entre elles, possèdent des propriétés médicinales (**Iserin, 2001**). L'Homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique. L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade (**Fouché et al., 2000**). D'une manière générale, les parties concernées des plantes sont : les sommités fleuries, les fruits charnus et secs, les écorces, les souterraines (racines, rhizomes, bulbes, tubercules... etc.) et les feuilles (**Ghestem et al, 2001**).

Les plantes médicinales ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour différentes maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique. Et en raison d'une conscience croissante des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, beaucoup cherchent les remèdes normaux sans effets secondaires et en plus à cout moins élevé que la médecine conventionnelle. D'ou l'acceptation, Récemment, de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé (**Nostro et al, 2000**).

Le stress oxydatif est impliqué dans de très nombreux mécanismes pathologiques, notamment ceux dus au vieillissement, tels que l'athérosclérose, le cancer, les maladies auto-immunes ou encore les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (**Salvi, 1998; Salvi et al., 2002**). L'utilisation des antioxydants de synthèse dans le domaine pharmaceutique qui devait apporter une solution à cette situation a été largement exploitée. Cependant l'utilisation des antioxydants synthétiques sont suspectés à long terme présente des effets secondaires indésirables pour l'organisme. Ces antioxydants de synthèse sont suspectés, entre autres, d'être mutagènes et cancérigènes (**Chavéron, 1999**). Les plantes étant une source riche en antioxydants naturels sont apparues comme une alternative pour pallier à l'apport d'antioxydants de synthèse.

Dans cet axe de recherche globale sur les plantes douées de propriétés thérapeutique s'insère l'objectif de notre thème de mémoire de master dont le but est l'évaluation du pouvoir anti-hémolytique des feuilles de différentes variétés d'agrumes cultivées dans la

Introduction

région de Bejaia (commune d'Amizour). Pour répondre à cette problématique, les extraits organiques de feuilles de cinq variétés d'agrumes ont été préparés puis analysés quantitativement pour leurs contenus en polyphénols. Les extraits ont été ensuite testés pour leur potentiel anti-hémolytique *in vitro*, en évaluant leur capacité à stabiliser l'intégrité des érythrocytes contre l'hémolyse induite expérimentalement.

Le manuscrit ci-rédigé comporte en plus de l'introduction et la conclusion, trois chapitres:

- i- Chapitre I « revue bibliographique » synthétisant brièvement les informations sur les propriétés des constituants du sang notamment les globules rouges, les types et mécanismes des anémies hémolytiques et un aperçu sur les anti-hémolytiques
- ii- Chapitre II « matériel et méthodes » décrivant la méthodologie expérimentale réalisée
- iii- Chapitre III et IV décrivant les résultats obtenus et leur discussion générale

Synthèse
Bibliographique

I.1. Généralité sur le sang

Le sang est le liquide vital qui coule dans les artères et les veines du corps. Il a pour rôle de transporter l'oxygène des poumons à destination des différents organes et de défendre l'organisme contre les infections. Il possède en outre un système pour éviter les fuites hors des vaisseaux : le système de la coagulation. Le sang est un transporteur, il circule dans les artères chargées de nourrir les organes (sang artériel) et repart de ceux-ci par les veines, chargé de déchets (sang veineux). Il véhicule des milliers de cellules et de substances nécessaires au fonctionnement de l'organisme. C'est l'intermédiaire entre notre corps, humide, et le milieu extérieur desséchant. **(Bacha, 2000 ; Gautrand, 2003)**.

En générale, le sang qui représente 7% du poids corporel des animaux est composé de globules rouges, globules blancs et des plaquettes mises en suspension dans le plasma. Les valeurs normales du sang sont influencées par un grand nombre de facteurs comme l'âge, le sexe, l'activité physique, le cycle nyctéméral ou l'alimentation. Au repos 10 à 15% du volume du sang se trouve dans les artères, 5 à 6% dans les vaisseaux capillaires, 60 à 70% dans les veines, 10 à 12% dans la petite circulation et 8 à 10% dans le cœur. **(Duncan et Parasse, 1986)**.

I-1-1 Composants biochimiques du sang

Le plasma est constitué d'eau, de sels minéraux, de protéines et de molécules organiques. Après coagulation, le plasma dépourvu de fibrinogène constitue le sérum.

De point de vue biochimique, on distingue deux types de protéines plasmatiques qui peuvent être séparées selon leurs mobilités électrophorétiques: les albumines et les globulines qui représentent des taux de 55 et 45% respectivement.

Les albumines sont synthétisées par le foie ; elles peuvent être une source d'énergie en cas de déficit nutritionnel chronique et assurent le transport dans le milieu intérieur de différentes molécules surtout les molécules à caractère hydrophobe.

Les globulines dans le sang existent en 3 types de mobilité électrophorétique différentes ; les α globulines dont la protéine qui transporte la thyroxine ou la vitamine A ; les β globulines dont les protéines de transport du fer, et les γ globulines qui représentent principalement les anticorps. Par conséquent le taux des gammaglobulines augmente lors des infections ou des vaccinations.

On y trouve aussi un ensemble hétérogène de molécules organiques et des minéraux ; Les glucides (dont principalement le glucose 1 g/l chez les monogastriques) ; les lipides (triglycéride, cholestérol, acides gras libres) ; les pigments (bilirubine, biliverdine) ; les

vitamines et hormones liposolubles et les macro-éléments (Na, K et Cl) et les oligo-éléments (Fe, Se, Mo, Cu, Mg, Mn). **Norbert I et al (1995)**.

I-1-2 Les cellules du sang

Les cellules du sang sont de deux types, les érythrocytes et les globules blancs. Au contraire d'autres cellules, les cellules de sang sont en perpétuel renouvellement par le processus hématopoïèse. (**Geay, 1995**)

I-1-2-1 Erythrocytes (hématies ou les globules rouges)

Le globule rouge est formé dans la moelle osseuse. C'est une cellule anucléée dont le constituant essentiel est l'hémoglobine, un pigment respiratoire qui assure le transport de l'oxygène et d'une partie du gaz carbonique. **Gouault-Heilmann (1987)**. A la naissance, le globule rouge possède un noyau, après quelques jours (5 au 7), le noyau est expulsé. Le globule rouge sans noyau passe après dans la circulation générale. Les globules rouges vivent environ 120 jours, aux termes desquelles, ils sont piégés par le foie, la rate et la moelle osseuse pour être détruits par les macrophages, leurs composants sont alors transformés en éléments simples, qui peuvent être immédiatement utilisés par la moelle osseuse. Une fois le globule rouge détruit, le fer de l'hémoglobine est recyclé, et le reste de l'hème est utilisé pour la synthèse des pigments biliaires dans le foie. Chaque seconde, 3 millions de globules rouges meurent. (**Canfield, 1998 ; Bacha, 2000**).

I-1-2-2 Les globules blancs

Les globules blancs également appelés leucocytes, sont des cellules du système immunitaire, et jouent essentiellement un rôle dans la défense de l'organisme contre les agents agresseurs qu'ils soient d'origine exogène ou endogène. Ce sont de véritables cellules mémoire dont le rôle principal est d'assurer la sécurité au niveau des organes. **Norbert I et al (1995)**. Il existe 3 classes de globules blancs :

- **Les granulocytes ou polynucléaires** : qui nous défendent contre les microbes, sont séparés en 3 types : neutrophiles, éosinophiles et basophiles.
- **Les monocytes** : qui donnent naissance aux macrophages « sentinelles » de l'organisme.
- **Les lymphocytes** : garant de notre immunité. (**susan et al ., 2002**).

I-1-2-3 Les thrombocytes (ou plaquettes)

Ce sont les cellules du sang qui permettent de boucher immédiatement les brèches dans les vaisseaux en cas d'hémorragie. Le sang lui-même se modifie et prend l'aspect d'une gelée. Les plaquettes déclenchent des réactions chimiques qui permettent la formation d'un réseau de fibres : la fibrine. (**Bendjebba , 2004**). Chaque jour, l'organisme fabrique près de 500 milliards de plaquettes. Ces dernières sont fabriquées dans la moelle osseuse rouge et une fois libérées dans le sang ont une durée de vie très courte de l'ordre d'une semaine à 10 jours. Elles sont soit utilisées pour la lutte contre les inflammations et pour la coagulation du sang, soit elles sont détruites par la rate. Chez l'adulte, le nombre moyen de plaquettes sanguines est compris entre 150 et $450.10^9/l$. **Norbert I et al (1995)**.

I-2- Généralités sur les hématies

I-2-1 Caractéristique des hématies

L'hématie normale est une cellule anucléée arrondie en forme de disque biconcave de taille qui varie de 4 à $7\mu l$ selon les espèces animales. Chez les mammifères, les globules rouges sont de formes discoïdes biconcaves en milieu isotonique. Dans un milieu hypotonique, quand la concentration de NaCl dans le plasma diminue par rapport à celle des globules rouges (GR), l'hémolyse se déclenche et l'hémoglobine est libérée. Par contre, dans un milieu hypertonique où la pression osmotique extérieure est supérieure à celle des globules rouges, les cellules gonflent et prennent un aspect crénelé.

Les globules rouges sont élastiques et déformables, ce qui leur permet de traverser les capillaires les plus étroits. Chez les animaux, leurs nombres des globules rouges varie en fonction l'âge, sexe et l'altitude. (**Gwlter, 1992**). Quand l'âge de l'animale augmente, le nombre des érythrocytes diminuent. (**Hayrvey et al, 1984 ; Clinkenbeard et Meinkoth, 2000**). Chez les nouveaux nés, dont l'organisme s'est adapté pendant la vie fœtale aux échanges d'oxygène à travers le placenta, le nombre de globules rouges très élevé. **Clinkenbeard et Meinkoth , 2000**). Les GR sont plus nombreux chez les femelles que chez les males. Les femelles gestantes montrent des constantes érythrocytaires plus élevées que les femelles vides. (**Medaille, 1992**). D'autre part, les animaux vivants en haute altitude ont plus d'hématies que ceux des animaux qui vivent dans les plaines. (**Ledieu , 2003**).

I-2-2 Rôle des globules rouges

Les GR chargés d'oxygène dans le sang artériel acheminent des nutriments aux organes pour que ceux-ci fonctionnent. Lorsqu'un GR aboutit au niveau du capillaire artériel

Synthèse Bibliographique

(un vaisseau fin comme un cheveu) d'un organe, il va lui délivrer de nombreuses molécules d'oxygène, les quelles vont être immédiatement utilisées par une cellule de l'organe en question. En échange de tout cet oxygène, l'organe lui fournit un nombre équivalent de molécules de gaz carbonique qui vont prendre la place de l'oxygène sur le GR ou plus exactement sur les atomes de fer, qui contiennent les molécules d'hémoglobine. A ce niveau, on peut dire que la cellule a respiré (elle absorbe de l'oxygène et rejette du CO₂). Les GR vont repartir dans la circulation veineuse, et se retrouver au niveau des capillaires veineux des poumons qui vont lui fournir de l'oxygène en échange de CO₂. (Susan, 2002).

I-2-3 Biosynthèse des globules rouges

La biosynthèse des GR commence à partir de la 3^{ème} semaine du stade embryonnaire, au niveau du sac vitellin puis elle diminue vers la 5^{ème} semaine et disparaît complètement lors de la 9^{ème} semaine. Au niveau 3^{ème} mois fœtal, le relai est pris par le foie, puis par la moelle osseuse hématopoïétique à partir du 5^{ème} mois de gestation. La moelle osseuse restera le seul site de synthèse des érythrocytes «érythrocytes» chez l'adulte. (Susan et al., 2002).

lors de la différenciation, Les cellules souches de la moelle osseuse au cours de la première mitose se différencient, et vont former les progénitures BFU-E et CFU-E. Les cellules souches (proérythroblastes ou pronormoblastes) donnent alors les érythroblastes (normoblaste) et basophile. La 2^{ème} mitose donne l'érythroblaste (normoblaste) polychromatophile de type 1, puis de type 2. (Également appelé orthochromatique, car la couleur de son cytoplasme est quasi-identique à celle de l'hématie). Au fur et à mesure des divisions cellulaires, la taille des érythrocytes diminue et se charge de l'hémoglobine, après elles perdent le noyau et les organites de cellules (REG, mitochondrie, Golgi). Plus les cellules sont avancées dans la lignée plus leur taille diminue, plus le cytoplasme basophile, riche en ARN dévient acidophile, riche en hémoglobine et plus le noyau se condense jusqu'à son expulsion qui transforme l'érythroblaste acidophile en réticulocyte, après il y a migration des GR matures dans le sang Bezeaud A et al, (2001).

I-3 Processus de l'hémolyse

Le processus d'hémolyse est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leur contenu. Des facteurs proprement corpusculaires, comme l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine, règlent le degré de l'hémolyse. Des facteurs extra-corpusculaires sont également importants dans le processus d'hémolyse citant, le plasma, l'état anatomique de l'appareil circulatoire et l'état fonctionnel du système mononucléé phagocytaire. Aguilar (2007).

Synthèse Bibliographique

L'hémolyse physiologique doit être différenciée de l'hémolyse pathologique ou l'hyperhémolyse liée à la modification des trois facteurs vitaux pour le GR. En l'occurrence, la membrane érythrocytaire ; le métabolisme énergétique (intégrité des enzymes impliqués) et le contenu hémoglobinique. **(Dahmani et al, 2000).**

I-3-1 Destinée et destruction des Erythrocytes (GR)

Chaque seconde notre corps produit entre deux et trois Millions de globules rouges, mais l'absence de noyau et d'organites pose aux érythrocytes un certain nombre de limites importantes, ils ne peuvent ni synthétiser de protéine, ni croître, ni se diviser c'est pourquoi leur durée de vie utile ne dépasse pas 100 à 120 jours, leur membrane plasmique devient rigide et se fragilise par ailleurs incapable de se déformer quant l'hémoglobine qu'ils contiennent perd progressivement ses propriétés chimiques, Les érythrocytes sont pris au piège dans les petits vaisseaux ceux de la rate, parfois appelée le «cimetière des globules rouges », où ils sont phagocytés et digérés par la macro phagocytes. **(Elaine , Marieb ;Katja Hoehn,2013).**

Au cours de la destruction des érythrocytes l'hème de l'hémoglobine est séparé de la globine, cette dernière est dégradée en acide animées, par contre l'hème est libéré dans la circulation, son noyau de Fer est récupéré puis associée à une protéine comme la ferritine ou l'hémosidérine et emmagasiné en vue d'une réutilisation ultérieure. Le reste du groupement hémique « proto porphyrine » est métabolisé en biliverdine puis en bilirubine un pigment jaune libéré dans la circulation sanguine et transporté par l'albumine vers le foie où elle subit une Glycéro-conjugaison qui la transforme en bilirubine conjuguée. Cette dernière passe dans la bile et sera éliminée majoritairement dans les selles sous forme de dérivés notamment de stercobilinogène. Une petite partie est réabsorbée par l'intestin et éliminée par le rein sous forme d'urobiline. **(Anne et Gererd ;2000).**

Un mécanisme semblable assure l'élimination de l'hémoglobine déverse dans le sang dans le cas de drépanocytose, ou le processus de l'anémie hémorragique est plus rapide à fin d'éviter une intoxication causée par l'accumulation de Fer dans le sang, l'hémoglobine libérée est captée par une protéine plasmique l'haptoglobine et le complexe est phagocyté par les macros phagocytes. **(Elaine N, Marieb ;Katja Hoehn).**

Au bout de 120 à 140 jours, le globule rouge meurt par sénescence ; 1/120 de la masse globulaire est détruite, c'est l'hémolyse physiologique où les hématies sont détruites par les cellules du système des phagocytes mononuclées de la moelle osseuse, du foie et de la rate. **Girot R et al (1992)**

I-3-2 Anémies hémolytiques

L'anémie est l'abaissement du nombre d'hématies et du taux d'hémoglobine au dessous des valeurs normales pour l'espèce, l'âge et le sexe. **(Blood et Henderson, 1976)**. D'Après Schlamm (1974), les anémies peuvent être classées selon soit classification morphologique ou la classification étiologique et pathogène.

La classification morphologique des anémies s'effectue selon la taille des hématies et leur teneur en hémoglobine. Selon la taille, il y a les anémies normocytaires, les anémies macrocytaires, et anémies microcytaire. En fonction de la teneur en hémoglobine, trois types d'anémies sont mis-en évidence ; les anémies normochromes, hypochromes et hyperchromes). **(Suter, 1992)**.

La classification étiologique et pathogénique se fait en fonction du caractère régénératif ou non-régénératif du syndrome anémique. **(Tvedten et Weiss, 2000)**. D'après cette classification, on observe :

- **Les anémies régénératives:** Une anémie régénérative lors d'hémorragie ou d'hyper hémolyse pour remplacer les hématies perdues, la moelle osseuse produit de façon accélérée de nouvelles jeunes hématies ou réticulocytes (réticulocytose), en court-circuitant certaines étapes de la maturation **(Zeitoun et al, 1988)**. Les anémies régénératives sont généralement des anémies macrocytaires poly-chromatiques. **(Cotter, 2003)**.
- **Les Anémie hémolytique :** Les anémies hémolytiques se caractérisent par un raccourcissement de l'éventail de vie des érythrocytes. ils résultent d'une destruction anormale excessive des hématies avec libération dans le sang ou dans le tissu de l'hémoglobine .l'hémolyse se produit a l'intérieur ou a l'extérieur des vaisseaux, dans le système réticulo-endothélial. **(Gautrand,2003)**.

I-3-3 Types et mécanismes d'hémolyse pathologique

Si la destruction des érythrocytes est un phénomène normal qui a lieu dans la rate lorsque les globules rouges sont en fin de vie, l'hémolyse anormale du sang peut avoir différentes causes. Il peut s'agir d'une pathologie qui aboutit à la destruction des globules rouges dans les vaisseaux sanguins, cas de certaines anémies, des accidents transfusionnels, du paludisme, etc..... Des parasites sanguins, des infections bactériennes et virales, des agents chimiques, des plantes toxiques peuvent entrainer une hémolyse. De plus, l'anémie hémolytique peut être due à des phénomènes auto-immuns. En outre, les anémies

Synthèse Bibliographique

hémolytiques sont généralement plus régénératives que celles qui relèvent d'hémorragie (**Reber, 1991**).

L'hémolyse pathologique peut être due à deux principaux mécanismes ;

- Une anomalie des globules rouges conduisant à une hémolyse corpusculaires c'est-à-dire la destruction des hématies provenant de sa fragilité et qui correspond à :
 - Une anomalie constitutionnelle de l'hémoglobine comme les anomalies de structure (hémoglobinopathies), anomalies quantitative de la synthèse des chaînes de globine (thalassémies), drépanocytose (en faucille) caractérisée par la présence d' Hb.
 - Une anomalie constitutionnelle de la membrane du GR. C'est le cas des micro-sphérocytose causés par une augmentation de la perméabilité au Na⁺ et à l'eau.
 - Un déficit enzymatique du GR comme le déficit en G6P, déficit en pyruvate kinase ou un défaut de régénération de l'ATP.
- Une agression extrinsèque des hématies correspondant à une hémolyse extracorporelles (**Aguilar, 2007**) qui est caractérisé par:
 - Une agression directe de l'hématie par une toxine bactérienne, animale, chimique ou par un parasite.
 - Une rigidité anormale acquise de la membrane du globule rouge: anémies hémolytiques auto-immunes.
 - Rupture des hématies normales sur un obstacle : prothèses valvulaires, (microangiopathie thrombotique). (**marc, 2013**).

I-3-4 Sièges des hyper-hémolyses

I-3-4-1 Hémolyse intra-vasculaire

Une faible partie de l'hémolyse physiologique se déroule au sein même de la circulation sanguine (**Aguilar et Martínez, 2007**), elle résulte de l'activation du complément à la surface des hématies ce qui aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire d'où une hémolyse intravasculaire aiguë (**Barker, 2000**). Et la libération des divers constituant de l'hématie notamment l'hémoglobine dans la circulation sanguine (**Festus et al ,2006**) Où elle forme un complexe avec l'haptoglobine synthétisée par le foie, ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradée (**Aguilar et Martínez, 2007**).

I-3-4-2 Hémolyse extravasculaire

Chez le sujet normal, la majorité des globules rouges sont détruits par les macrophages de la moelle osseuse (minimum 50%). Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie (**Aguilar et Martinez, 2007**). L'hémolyse extravasculaire est induite par la fixation de l'anticorps sur l'hématie sans activation (ou activation limitée) du complément, les immunoglobulines G, fixée sur les antigènes des groupes sanguins, présents sur la membrane des hématies, interagissent avec les récepteurs de leur fragment présent sur les cellules du système des phagocytes, entraînant ainsi la phagocytose des hématies et leur lyse (**Festus et al, 2006**). La phagocytose porte sur des globules rouges dont le vieillissement est traduit par une diminution du contenu enzymatique, ralentissement métabolique, perte des lipides membranaire, phénomène oxydatifs ; des modifications morphologique ou la cellule à tendance à la sphéricité par réduction de la surface membranaire et /ou hyperhydratation ; des modifications de la plasticité et diminution de la déformabilité des globules rouges entraînant une stagnation dans les capillaires. (**Aguilar et Martinez, 2007**).

I-3-5 Les anti-hémolytiques

En raison des causes diverses héréditaires ou acquises (par exemple auto-immunes, toxiques ou traumatiques), l'anémie hémolytique est un sujet relativement complexe qui demande obligatoirement une investigation spécialisée pour déterminer les traitements appropriés. Le traitement des anémies hémolytiques passe inexorablement par le traitement des causes de cette anémie. Il y a donc presque autant de traitements qu'il y a de causes. Un certain nombre de médicaments anti-hémolytiques, substances qui présentent la capacité à retarder ou à inhiber la lyse des globules rouges, sont disponibles. L'acide folique, un complément de fer, des corticoïdes et des suppléments de vitamine B peuvent être utilisés pour traiter les anémies hémolytiques. Les dernières années, le domaine de la recherche de nouvelles substances anti-hémolytiques d'origine végétale est en plein essor. Des investigations dans ce sens sont entrepris par de nombreux laboratoires de recherches de part le monde. Le tableau ci-dessous (tableau N°1) représente quelques exemples de plantes testés à cet effet.

Synthèse Bibliographique

Tableau N°1 : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique.

Matrice végétale (source)	Tests utilisés	Effets	Références
feuilles de piper betel (Inde)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	activité antihémol 40.6% pour une concentration de 5mg/ml	Devjani chakraborty et barkha shah 2011
Feuilles et tiges de <i>Ammoides verticillata</i> (Algerie)	Hémolyse provoquée par l'eau distillée	effet anti hémolytique (IC50=0,0422 mg/mL, 35%)	Mémoire haoulia amina,2015
Partie aérienne de <i>Mentha longifolia</i> (Iran)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Effet anti hémolytique IC50 =951.4 ± 36 µg/ml.	Ebrahimzadeh M.A ET al ,2010
thymus Partie aérienne de satureioides (Maroc)	Hémolyse induite par un puissant oxydant l'AAPH	anti effet hémolytique et anti oxydant 144.44% 10mg/ml	Mhamed ramchoun et al 2015
grain bran (Iran)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Anti hémolytique et anti-oxydant activité IC50 est.1.32 ± 0.07 mg/ml de l'extrait.	Nabavi et al 2010
partie aeriennede scanescen morettia (Algerie)	Hémolyse induite par le triton x -100	effet anti hémolytique 14.80% à500mg/ml	mohammedi zohra et atik fawzia 2014
Les feuilles Hibixus exulentus (Iran)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	antioxydant et antihémolytique activité IC50 :274.3 ± 11 µg ml-1	Ebrahim zadeh et al 2009
Partie aérienne Mentha piperita (Iran)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Anti hémolytique et antioxydant activité IC50= 836.4± 29.2).	Ebrahim zadeh et al 2010
crucianella Sintenisii (Iran)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Activité anti hémolytique et antioxydant (IC50= 1.108 ± 0.048	Ebrahim zadehet al 2009
da Fruits de dactilifera du phénix (Maroc)	Hémolyse induite par un puissant oxydant l'AAPH	Antioxydant et anti hémolytique et anti bactériale activité	Eimad dine tariq bouhali et al 2016
feuilles et fleurs de <i>Gymnema sylvestre</i> (Nigeria)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Activité anti hémolytique IC50 = 29.83 .	omalejames et idris mordecai alewo 2014
Partie aériennepo rtulaca oleracea (L) (Algerie)	Hémolyse provoquée par l'eau distillée	Effet hémolytique et activité antioxydant Taux d'hémolyse qui ne dépasse pas 6%	Ameziane amina 2016
Feuilles de psidium <i>guajava</i> (thailand)	Hémolyse induite par l'ion ferreux	activite anti ehémolytique 91.5 ± 0.99% maximum	Chonthida thephinlap et al 2013
L'écorce Des racines <i>Berberis vulgaris</i> (L) (Algerie)	Hémolyse provoquée par l'eau distillée	Activité anti hémolytique et toxique	Mémoire elalaoui rachida 2015

Synthèse Bibliographique

Matériel et méthodes

II-Matériel et méthodes

II-1 Préparation de la poudre végétale

Les feuilles de cinq variétés d'agrumes du genre citrus ont été récoltées dans la localité d'Amizour (Bejaia), lavées à l'eau courante, ensuite séchées à l'étuve à 40° pendant une semaine. Les feuilles ont été ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue a été tamisée puis conservée dans des récipients en verre, hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à utilisation afin de préserver l'intégrité des molécules.

II-2 Extraction par macération

Dans le but d'extraire les substances bioactives, la poudre végétale a été soumise à une extraction solide/ liquide à l'éthanol par macération à température ambiante suivant le protocole décrit par Benhammou et al, 2008. Vingt grammes de poudre a été macérée dans 100ml d'éthanol absolu à température ambiante pendant 5 jours. Ensuite le macérât a été filtré sur papier wattman, puis évaporé. L'éthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite à 40°C par un rotavapeur.

Expression du rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction correspondant au rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu après évaporation du solvant et la masse de la poudre végétale utilisée est calculé par l'expression suivante :

$$\text{Rd(\%)} = (\text{Me}/\text{Mp}) \times 100$$

Avec :

Rd(%):Rendement en%, **Me**: Masse de l'extrait sec (en g), **Mp**: Masse de la poudre végétale utilisée pour l'extraction (en g).

II-3 Dosage des polyphénols

II-3-1 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux, métabolites secondaires bioactifs, dans les extraits éthanoliques des feuilles des différentes variétés de citrus a été réalisé par méthodes colorimétriques en utilisant le réactif colorimétrique Folin-ciocalteu selon la méthode **Ryan (2013)**. Le réactif Folin-ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). L'oxydation en milieu

Matériel et méthodes

alcalin du réactif Folin-cioalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduit à la formation d'un mélange d'oxyde bleu. L'intensité de la coloration produite, qui a une absorbance maximale à 760nm, est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents (**Ribéreau-Gayon, 1972**).

1,5 me du réactif Folin-ciocalteu (0.1N) sont ajoutés à 200µl de l'extrait des feuilles de citrus solubilisé dans l'éthanol à raison de 1mg/ml, le mélange est ensuite incubé pendant 5min, puis 1.5ml de la solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 6% sont additionnées au mélange réactionnel. Après agitation et incubation pendant 2h à température ambiante, l'absorbance est lue à 765nm, contre un blanc préparé dans les mêmes conditions mais ne contenant pas d'extrait végétale.

Expression des résultats

Les concentrations des polyphénols totaux est calculé à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalon réalisée dans les mêmes s avec l'acide gallique puis exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mgEAG/gMS)

II-3-2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes à été effectué par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) citée par **Djeridane et al., (2006)**. Le principe du dosage est basé sur la capacité des flavonoïdes à chélater via leurs groupements hydroxyyles (OH) libre l'ion Al⁺³ et former un complexe jaunâtre- (**Quettier et al., 2000**). 1ml de la solution d'extrait végétale à 1mg/ml est mélangé avec 1 ml d'une solution de chlorure d'aluminium AlCl₃ à 2%. Après 10min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 448nm (Figure 1)

Expression des résultats

La concentration des flavonoïdes dans les différents extraits de citrus ce fait à l'aide des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine par gramme de matière Sèche (mgEQ/gMS).

NB : un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 2ml de solution d'extrait avec 1ml d'eau distillée.

Mode opératoire

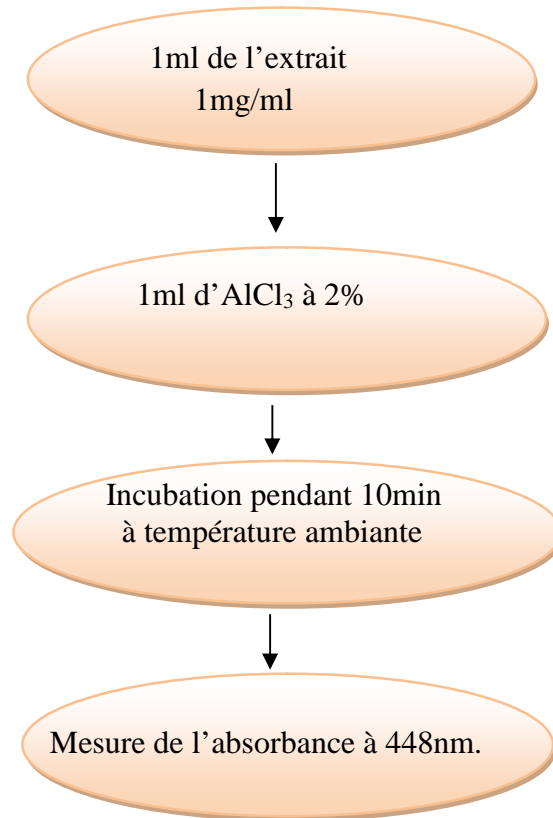


Figure1 : Protocole de dosage des flavonoïdes **Djeridane et al** , (2006).

II-4 Mise au point des tests d'hémolyse induite *in vitro*

II-4-1 Préparation de la suspension des érythrocytes

Le sang utilisé pour préparer les suspensions sanguines a été obtenu du centre de transfusion sanguine d'Akbou (CWTS). La suspension érythrocytaire a été préparée comme décrit par (**Hebbani et al**, 2014).

Du sang fraîchement prélevé à l'aide d'une seringue graduée a été mis dans des tubes héparinés puis centrifugé à 3000rpm pendant 5 minutes pour séparer les globules rouges des autres éléments constitutifs du sang. Après élimination du surnageant, le culot a été récupéré et lavé 3 fois avec une solution d'eau physiologique à 0,9% à température ambiante. Chaque lavage consiste en une centrifugation à 3000 rpm (5min) et une suspension du culot dans l'eau physiologique à 0,9%. Après la dernière centrifugation le culot est resuspendu à nouveau dans

une solution constituée de tampon phosphate salé (PBS) à 0,2M, pH=7,4. A raison d'un volume du culot et 9Volumes du de PBS), permettant ainsi d'obtenir une hématocrite à 10%.

II-4-2 Induction de l'hémolyse *in vitro*

II-4-2-1 Principe

L'effet anti hémolytique d'extraits de plantes est évalué *in vitro* par l'utilisation de modèle érythrocytaire. Ce dernier est facile à isoler du sang et sa membrane à similitudes avec d'autres membranes cellulaire (Shobana etVidhya, 2016).

L'exposition des globules rouges (RBC) à certains paramètres physicochimiques telles que le milieu hypotonique, l'utilisation d'un perturbateur membranaire comme les détergents ou les espèces réactifs oxygénées, les températures élevée provoque une rupture de sa membrane cytoplasmique provoquant ainsi la libération de l'hémoglobine qui sera alors doser par spectrophotometrie d'absorbance visible.

Pour tester l'effet anti hémolytique de nos extraits organiques des feuilles de citrus, des tests sur modèle érythrocytaire à hémolyse induite par une salinité réduite du milieu de suspension des GR (milieu hypotonique), par le triton X-100, l'H₂O₂ ou la température élevée ont été mis au points.

II-4-2-2 Test de l'Hémolyse hypotonique

L'effet hémolytique de la solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule (Habibur Rahman *et al.*, 2015; Labuet *et al.*, 2015).

➤ Effet de la Concentration du NaCl

Un volume de 1,8 ml de NaCl à différentes concentrations (1,8%, 1,2%, 0,9%, 0,75%, 0,5%, 0,2%) à été mélangé et homogénéisé avec 200µl du culot d'une suspension de GR à 10% d'hématocrite, le mélange a été ensuite incubé à température ambiante pendant 10min, puis centrifugé à 3000rpm pendant 5min, la densité optique du surnageant a été mesurée à 541 nm.

➤ Effet de la concentration de l'éthanol

Un volume de 1,8 ml de NaCl à différentes concentrations (0,9%, 0,75%, 0,5%) à été mélangé avec de l'éthanol à des concentrations de 2,5%, 5% et 10%, puis ils ont été homogénéisés avec 200µl de l'hématocrite à 10%. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10min, puis centrifugé à 3000 rpm pendant 5min.

II-4-2-3 Test d'hémolyse par le triton X100

Le protocole utilisé est celui décrit par **Muthu et durais (2015)**. Un volume de 800µl du triton X100 à différentes concentrations (1%, 0,1%, 0,05%, 0,04%, 0,025%, 0,001%) à été mélangé et homogénéisé avec 2,2 ml du tampon phosphate (0,2M, PH=7,4 contenant 0,9% de NaCl) et 500µl de la suspension érythrocytaire (10%). Le mélange à été incubé à 37°C pendant 1 heure, 2h ou 3h, puis centrifugé à 3000rpm pendant 5min. La densité optique du surnageant a été mesurée par spectrophotométrie à 541nm, Le contrôle à été préparé dans les mêmes conditions expérimentales précédentes en absence du triton X100.

II-4-2-4 Test de la thermohémolyse

Dans des tubes à hémolyse, 500µl de la suspension érythrocytaire à 10% ont été mélangés avec 4,5ml de NaCl à 9% puis incubés pendant 10 et 20 mn à différentes températures (25°C, 30°C, 45°C, 50°C, 60°C), ensuite ils ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 5min, les absorbances sont mesurées à 541nm.

II-4-2-5 Test d'hémolyse par le H₂O₂

L'hémolyse par le H₂O₂ à été évaluée par le protocole décrit par **james et Alewo (2014)**. 2ml de suspension érythrocytaire (4%) ont été mélangés à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2M, PH=7,4 contenant du NaCl 9% et contenant ou non de l'éthanol puis 500µl de H₂O₂ (10V) ont été ajouté. Le mélange à été incubé pendant 4 heures à 37°C, puis centrifugé à 3000rpm pendant 10min, l'absorbance du surnageant récupéré a été mesurée par spectrophotométrie à 541nm.

II-4-3 Evaluation de l'Effet anti-hémolytique des extraits de citrus

II-4-3-1 Effet sur l'hémolyse induite par le triton X-100

Dans des tubes à hémolyse, un volume de 800 µl de triton X-100 à 0.05% a été ajouté à 500µl de la suspension érythrocytaire (10 %) pré incubée pendant 1min avec de l'extrait de citrus à différentes concentrations. Après incubations à température ambiante pendant 10 min et centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 541nm. Les contrôles négatif et positif ont été préparés dans les mêmes conditions expérimentales en absence de la suspension érythrocytaire pour le premier et absence de l'extrait végétale pour le deuxième.

Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, après 10 min d'incubation.

II-4-3-2 Effet sur l'hémolyse induite par pression hypotonique

Un volume de 1,8 ml de NaCl à 5% a été ajouté à 200µl de la suspension érythrocytaire dans des tubes contenant l'extrait solubilisé préalablement dans l'éthanol à différentes concentrations 250, 500, et 100µg/ml. La concentration final de l'éthanol est de 2,5%

II-4-3-3 Effet sur l'hémolyse induit par le H₂O₂

Dans des tubes à hémolyse contenant 500µl de l'extrait à différentes concentrations, 2ml de la suspension érythrocytaire (4%), 2 ml de la solution tampon PBS (pH 7,4, NaCl 9%) et 500µl de H₂O₂(10V) ont été ajoutés.

Discusión

Résultats

III- RESULTATS

III-1 Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes

La teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les extraits éthanoliques des cinq variétés de *citrus* à été déterminée par méthodes colorimétriques (**Ribéreau-Gayon, 1972, Quettier et al, 2000**). Les résultats obtenus et exprimés en mgEqAG/gMS pour les polyphenols totaux et en mgEqQ/gMS pour les flavonoïdes (Tableau II) montrent que les feuilles des variétés étudiées contiennent des teneurs appréciables en métabolites secondaire de type polyphénoliques.

N° d'extrait	Variété de citrus	Phénols totaux (mgEqAG/gMS)	Flavonoïdes (mgEqQ/gMS)
Extrait 1	Variété thompson	08,84 ± 0,09	04,52 ± 0,19
Extrait 2	Variété Tardive	10,75 ± 0,07	03,22 ± 0,06
Extrait 3	Variété sanguinelle	2,24 ± 0,12	1,88 ± 0,48
Extrait 4	Variété Double fine	08,97 ± 0,44	03,53 ± 0,07
Extrait 5	Variété limon	13,05 ± 0,09	03,01 ± 0,01

Tableau II: Teneur en polyphenols et en flavonoïdes des feuilles de différentes variétés de Citrus.

La teneur en polyphénols totaux et les flavonoïdes varient légèrement d'une variété à une autre. Les feuilles du limon présentent une teneur légèrement plus élevée en polyphénols totaux (13.05 ± 0.09 mg EqQ/gM) par rapport a d'autres plante a activité antihémolytique, tandis que les feuilles de la variété Thomson qui montre le taux le plus élevé en flavonoïdes (04.52 ± 0.19 mg EqQ/gMS). La variété sanguinelle est le mois riche en flavonoïdes (01.88 ± 0.48 mg EqQ/gMS).

III-2 Effet du NaCl sur l'hémolyse hypotonique

D'après les résultats obtenus (figure 2), on observe qu'à concentrations finale de NaCl dans le milieu de suspension des GR entre 7,5% à 12% (milieu pratiquement isotonique), il n'y a pratiquement d'hémolyse. Par contre, pour des concentrations finales de NaCl inférieurs à 7,5% (milieu hypotonique), l'hémolyse tend à être complète pour des faibles concentrations de NaCl (DO à 2% et 5% de 18.28 et 10,89 respectivement). En effet, l'hémolyse totale du taux de suspensions érythrocytaires libère un taux d'hémoglobine

Résultats

correspondant à une DO d'environ de 20 Unité d'absorbance. On observe aussi une libération d'hémoglobine à concentration de NaCl élevée (15%). (milieu hypertonique)

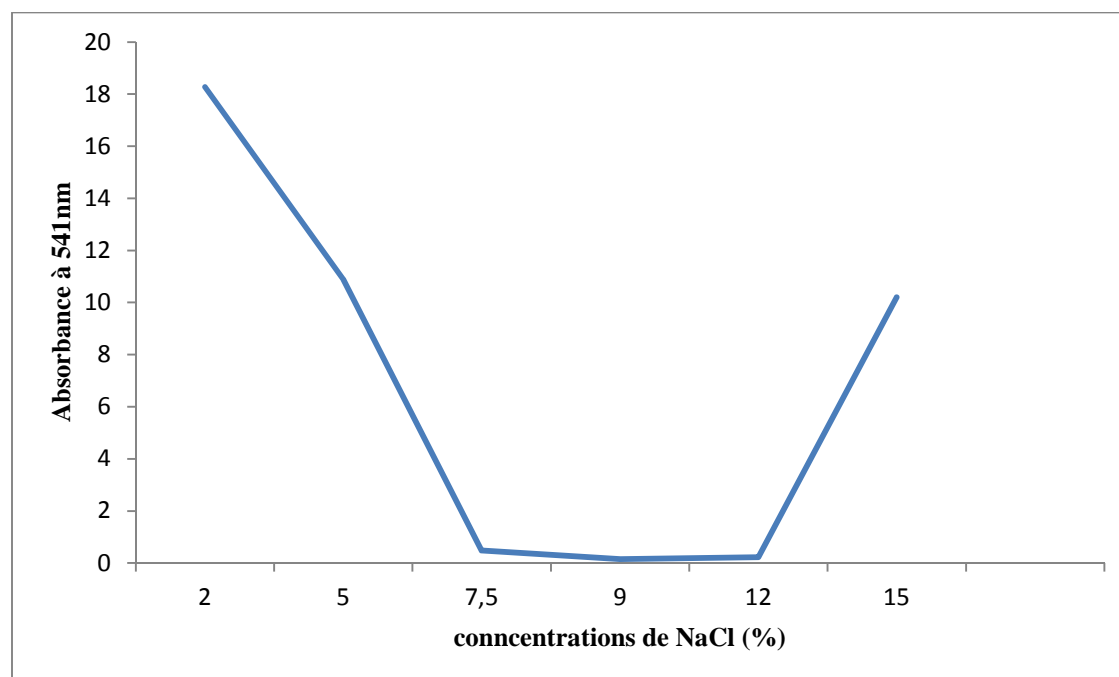


Figure 2: Effet de la tonicité sur les érythrocytes à différentes concentrations de NaCl

III-3-Effet de l'éthanol sur l'hémolyse hypotonique

La figure 3, illustre l'évolution de l'activité hémolytique à différentes concentration de NaCl de 5% et 7.5% ,9% en présence de l'éthanol à des concentrations qui varient de 2,5 à 10%. Le taux d'hémolyse des GR dépend de la concentration du NaCl et de la concentration de l'éthanol présent dans le milieu réactionnel. Quelque soit la concentration de NaCl, on observe que la libération de l'hémoglobine est d'autant plus élevée que la concentration de l'éthanol est élevée. Ce qui signifie que l'éthanol augmente l'effet hémolytique induit hypotoniquement.

L'activité hémolytique la plus prononcée est observée pour une concentration de NaCl de 5% et un taux d'éthanol de 10%. D'autre part, on observe que l'éthanol présente, même en milieu isotonique, un effet inducteur d'hémolyse.

Résultats

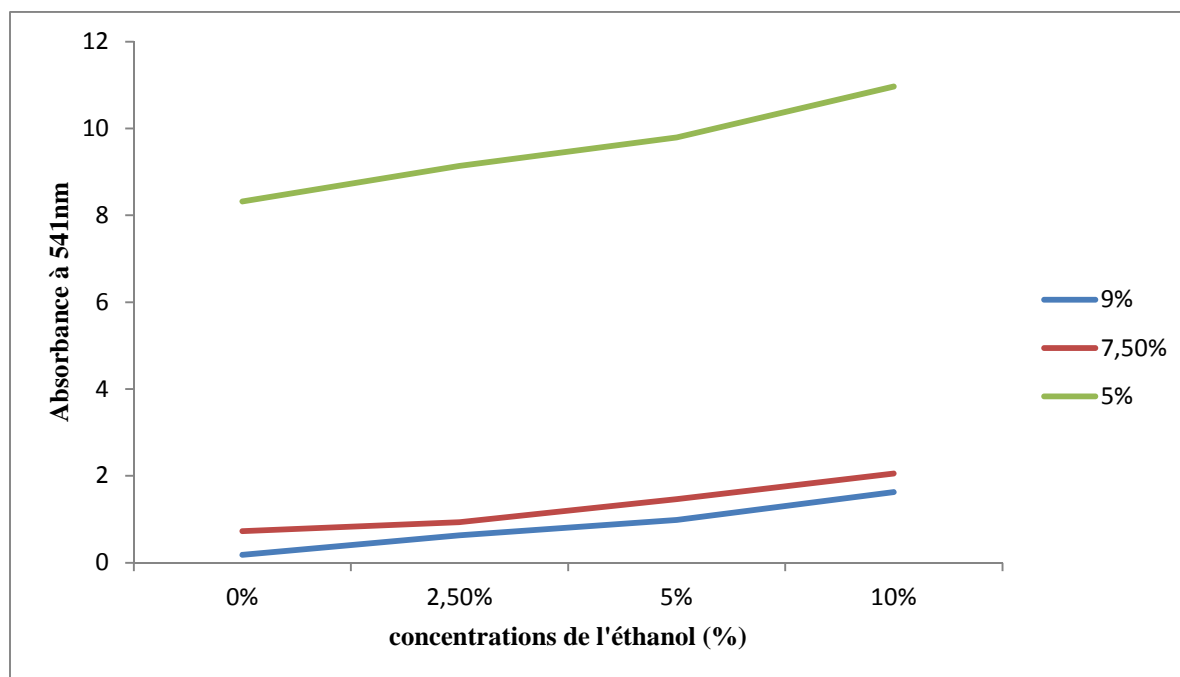


Figure 3: Effet de la tonicité sur les érythrocytes à différentes concentrations de NaCl(5%,7.5%,9%) en présence de l'éthanol.

III-4 Effet de la concentration du triton x-100 sur le taux l'hémolyse

D'après le graphe de la figure 4 représentant l'effet de la concentration du triton X-100 sur le taux d'hémoglobine libérée, on observe qu'à des concentrations 0.01%, et 0.03% du triton x-100, il n'ya pas d'hémolyse par rapport au témoin négatif, mais au delà de 0.03% on a une hémolyse qui augmente proportionnellement avec les concentrations du triton x-100. En plus on a constaté qu'a la concentration 0.05% du triton x-100 provoque une presque 50% d'hémolyse (hémolyse complète donne environ 3 unité de DO).

Résultats

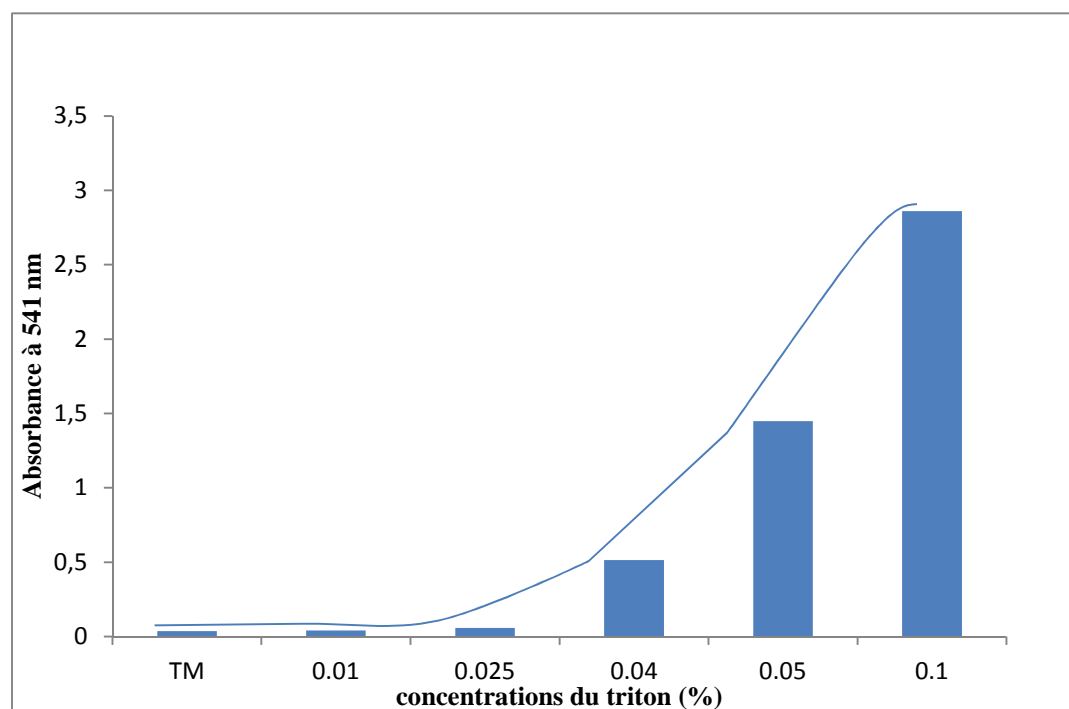


Figure 4 : Effet du triton (x-100) a différentes concentration sur les érythrocytes.

III-5 Variation des taux d'Hémolyse induite par la température

Le taux d'hémolyse induite par la température a été mesuré pour différentes températures : ambiante ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), 30°C , 45°C et 60°C . Les résultats sont présentés dans la figure 5.

A température ambiante on a observé une DO de l'ordre de 0.176 après 10 min, et de 0.205 après 20 min alors qu'à 30°C on a observé une DO de l'ordre de 0.150 après 10 min et 0.200 après 20 min. Les DO sont de l'ordre de 0.144 à température ambiante après 10 min d'incubation et une DO de 0.691 a température 45°C , alors qu'après 20 min, on a 0.202 a température ambiante et 0.725 a 45°C . La même chose pratiquement pour la température 60°C , une DO de 0.2 a température ambiante après 10 min et 0.285 après 20 min, par contre a température 60°C après 10 min on a 3.348 et une DO de 3.670 après 20 min d'incubation. L'effet de la température sur l'hémolyse est probablement dû à la dénaturation des protéines membranaires de GR par la chaleur (45°C et 60°C), mais la DO ne change pas beaucoup par rapport au temps, même cas pour la température ambiante une petite augmentation après 20 min d'incubation peu négligeable.

Résultats

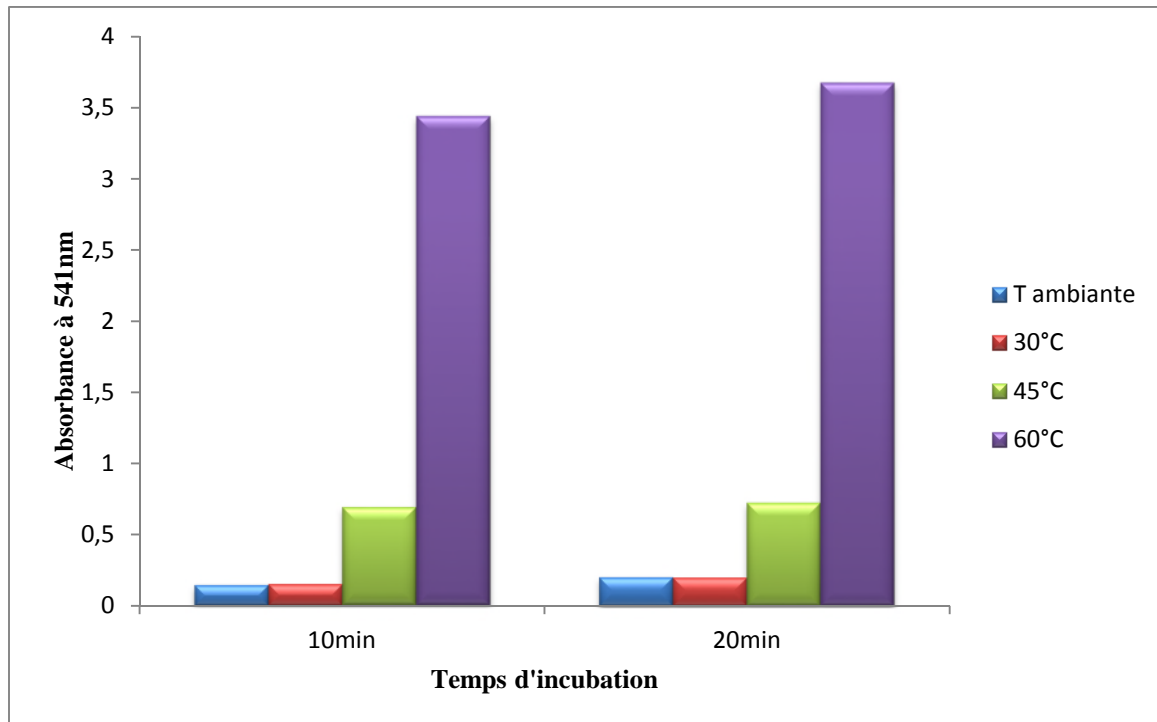


Figure 5 : Effet de la variation de la température sur les érythrocytes

III-6 Variation du taux d'Hémolyse induit par H₂O₂

D'après le résultat obtenu (figure 6), on observe un taux très faible d'hémolyse en absence de H₂O₂ et de l'éthanol, Mais en absence de H₂O₂ et présence de éthanol un taux faible de l'hémolyse par, contre dans le cas ou il n'ya pas de éthanol et le H₂O₂ est présent on observe un taux élevé de l'hémolyse mais dans le cas ou l'éthanol et le H₂O₂ présents on a un taux d'hémolyse très élevé.

Donc on peu déduire que l'éthanol et le H₂O₂ ont un effet hémolytique soit chacun seul soit en combinaison, sachant que l'effet de l' H₂O₂ est plus fort que ce lui de l'éthanol.

Résultats

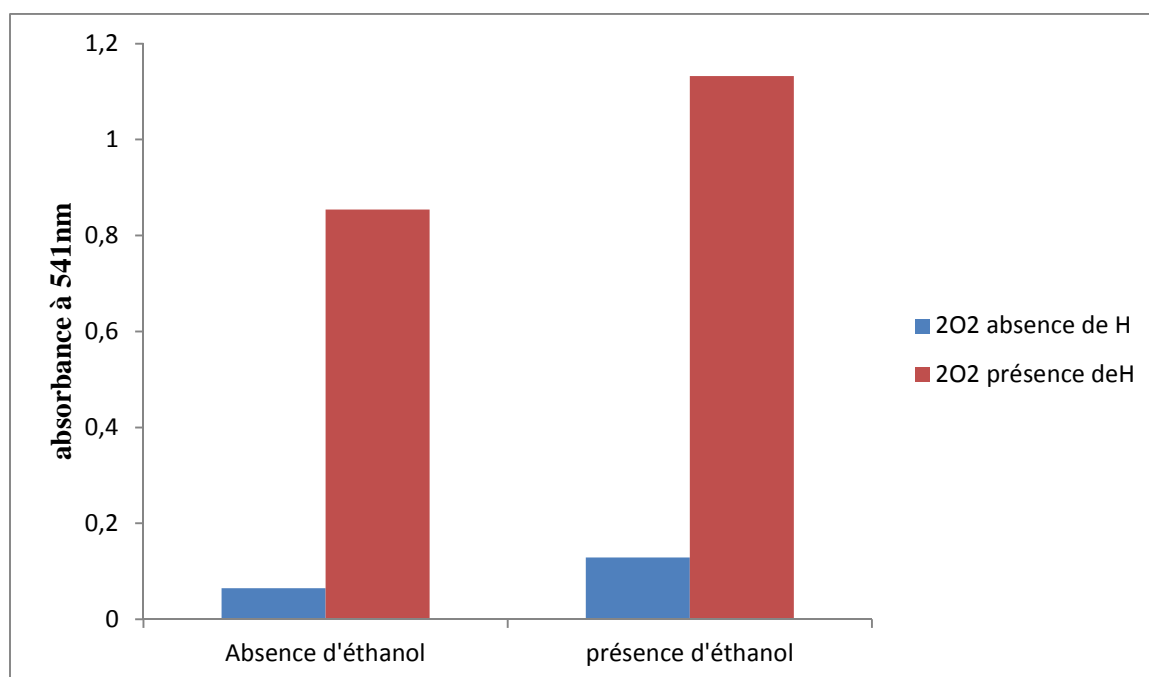


Figure 6: L'effet de H₂O₂ sur les érythrocytes avec et sans l'éthanol

III-7 Effet des extraits de citrus sur l'hémolyse hypotonique

Les taux d'inhibition d'hémolyse (%) induite par l' hypotonicité à température ambiante durant 10 min en fonction des différentes concentrations des différents extraits bruts des feuilles de citrus sont représentés dans la figure 7. D'après les résultats obtenus On constate que les différents extraits de *Citrus* ont montré une activité anti hémolytique significative contre l'hémolyse induite par le NaCl notamment à des concentrations de 500 µg/µl.

L'extrait (5) variété limon a montré l'activité anti hémolytique maximale avec un pourcentage de 69.73 % suivi par l'extrait (4) de la variété double fine avec un pourcentage de 64.20%, cependant l'extrait (3) de la variété sanguinelle présente un effet inhibiteur faible.

Résultats

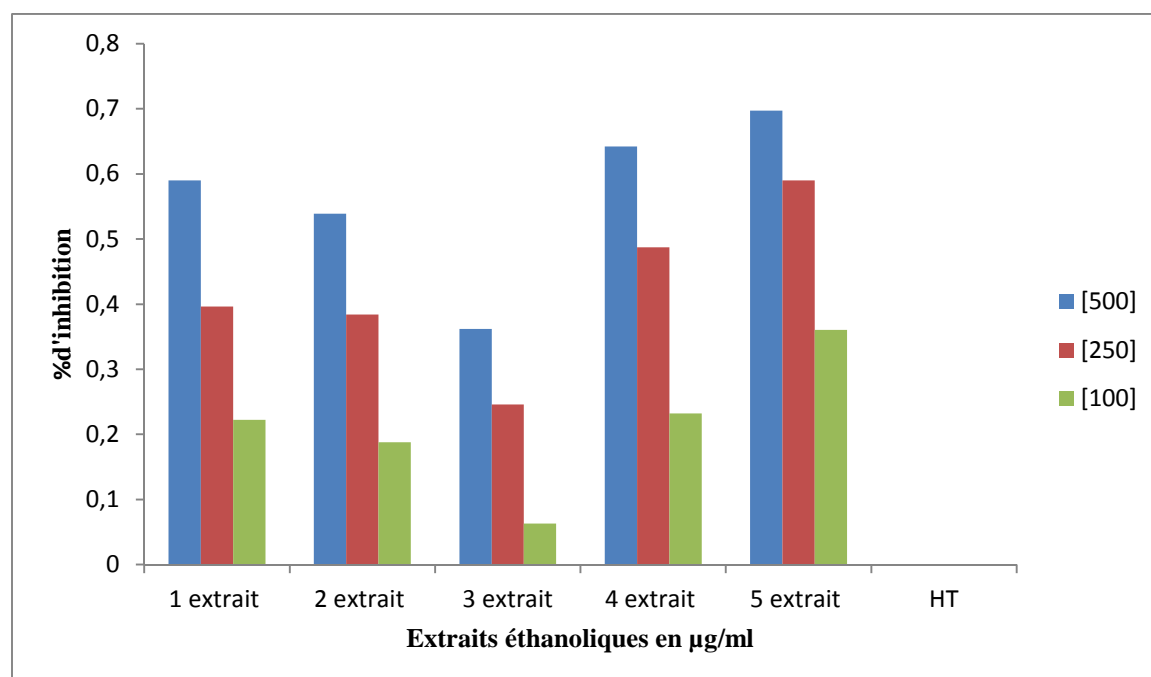


Figure 7 : Taux d'inhibition d'hémolyse hypotonique en présence des différents extraits de citruses à différentes concentrations

On remarque également un rapport proportionnel entre la concentration de l'extrait et le taux d'inhibition, par exemple l'extrait (1) variété thomson à une concentration de 500 µg/µl, présente un taux d'inhibition qui dépasse les 59% alors qu'à une concentration de 100 µg/µl il présente un taux de 22.22%.

III-8 Effet des extraits de citruses sur l'hémolyse induit par le triton x-100

Dans la présente étude, on a évalué le pouvoir anti hémolytique de différents extraits de citruses à la même concentration (100 mg/ml) pour l'hémolyse induite par le détergent triton (X-100).

Les résultats obtenus (figure 8a) montre que les d'inhibition d'hémolyse pour les différents extraits sont significativement faibles à non significatif. Ils sont de l'ordre de $\approx 7,3 \pm 0,4$ pour les extraits des variétés thompson, tardive, double fine et limon alors que pour l'extrait de la variété sanguinelle le pouvoir anti hémolytique s'élève de 13.12%. Pour ce dernier extrait, l'augmentation de la concentration à 500mg/ml, provoque une augmentation du taux d'inhibition de l'hémolyse qui passe à 42.27% (figure 8b)

Résultats

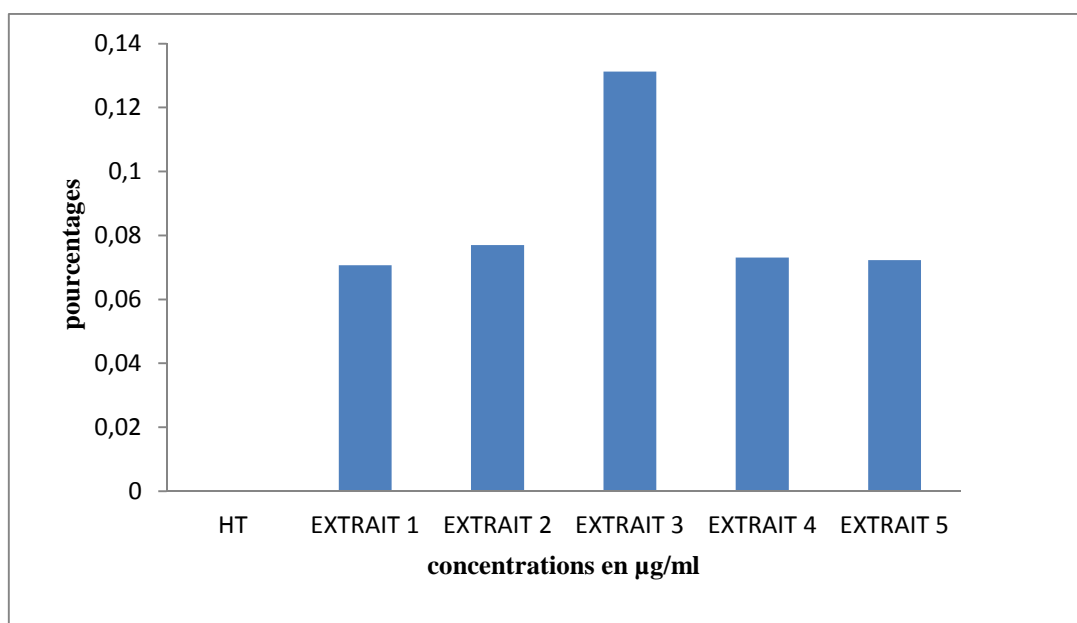


Figure 8 : Effet des extrait de citrus sur l'hémolyse induite par le triton X-100

L'activité anti hémolytique de l'extrait 3 qui a présenté le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été évaluée à différentes concentrations de ce dernier. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous :

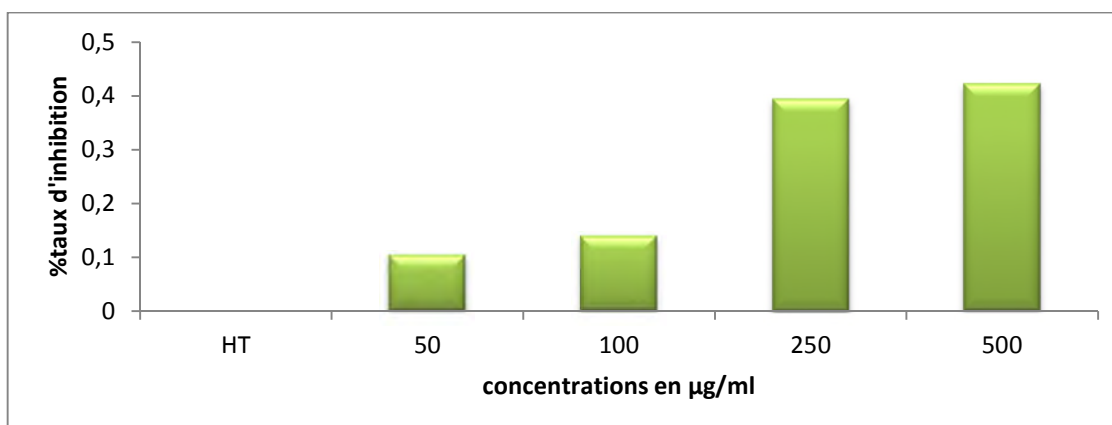


Figure 9 : l'évaluation de l'effet anti hémolytique de l'extrait 3 sur l'hémolyse induite par détergent

D'après les résultats révélés, on constate que le degré d'inhibition d'hémolyse est proportionnel à la concentration des l'extraits du moins pour l'extrait de sanguinelle.

III-9 Effet des extraits sur l'hémolyse induit par le H₂O₂

Le but de ce test est d'évaluer l'effet anti hémolytique des extraits éthanoliques de feuilles de différentes variétés de citrus contre une hémolyse induite par le H₂O₂.

Les variations des taux d'hémolyse induite par le H₂O₂ des différents extraits et du témoin sont présentées dans la figure 9.

Résultats

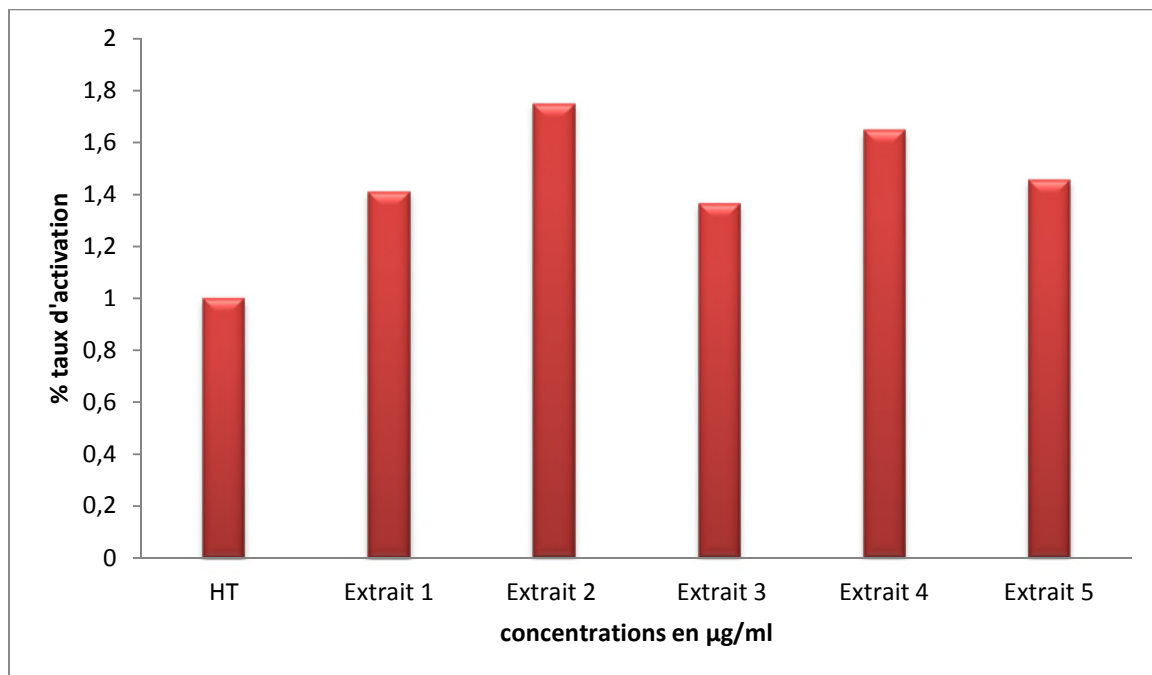


Figure 10: Effets des différents extraits éthanoliques de feuilles de citrus sur l'hémolyse induite par le H₂O₂

D'après ces résultats, on constate que les extraits testés ont montré une activité hémolytique hautement significative avec des pourcentages supérieurs à 100% notamment l'extrait 2 qui a montré l'activité hémolytique la plus élevée avec un pourcentage de 174.83% nettement supérieur à celui du témoin (hémolyse totale).

Discussion

IV Discussion

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative des Extraits de plantes. les conditions optimales ont été respectées concernant plusieurs paramètres tels que le diamètre de la poudre et le type du solvant : le broyage et le tamisage ont été réalisés de façon à pouvoir récupérer le maximum de poudre fine et l'éthanol a été utilisé dans le but d'extraire le maximum de composés phénoliques.

La macération de la poudre dans l'éthanol a été réalisée pour augmenter le contact entre le solvant et les particules de la poudre et cela à température ambiante, en effet selon (**Spigno et al ,2007**), à des températures élevées, les composés peuvent être volatilisés et dénaturés. L'étude quantitative des extraits de citrus, par dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes. Le choix du dosage de ces substances réside dans le fait que la majorité des activités biologiques des plantes leur sont attribuées et que ces métabolites sont doués d'activité antioxydante.

Les résultats de dosage des phénols totaux montrent que la variété limon est la plus riche avec 13.45% mgEqAG/gMS alors que la variété Thomson présente le plus faible taux. La détermination quantitative des flavonoïdes a montré que la variété Thomson représente l'extrait le plus riche en flavonoïde.

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits sont relativement identiques à celles trouvées dans d'autres études sur des plantes du même genre. l'étude menée par **Dahmoune et al., (2013)** sur *citrus limon* a montré que l'extrait éthanolique présente une concentration de 12.11 mgEAG/gMS de même pour **Li et ses collaborateurs (2006)** en réalisant l'étude analytique sur plusieurs variété de Citrus, ils ont trouvé des teneurs de 11.89 mg Eq AG/ g d'écorce sec de Clémentine et 17.36 mg Eq AG/ g d'écorce sec de *limon*. Les teneurs en polyphenols varient en fonction de la variété, de l'espèce et de la partie de la plante utilisée.

L'action anti hémolytique in vitro de notre extraits a été évaluée par l'utilisation de modèle érythrocytaire, ce dernier est facile à isoler du sang et sa membrane à similitudes avec d'autres membranes cellulaire (**Shobana etVidhya, 2016**). Les globules rouges sont aussi choisis comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire pour l'étude de la cytotoxicité in vitro à cause de leur facilité d'isolement et leurs simplicité. Ils sont un outil précieux pour l'étude des transports ioniques transmembranaires via la membrane érythrocytaire (**Wajeman et al, 1992**).

Si les globules rouges (RBC) sont exposés à des substances nuisibles telles que le milieu hypotonique alors la rupture de sa membrane se produira, provoquant la libération de

Discussion Générale

l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant. L'effet hémolytique d'une solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule (**Habibur Rahman et al, 2015; Labuet al ,2015**). Les propriétés hémolytiques d'un agent hypotonique sont attribuées à son interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire ce qui induit à une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions: entrée de Na⁺ et H₂O, sortie de K⁺, la membrane éclate, permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine (**Majester-Savornin, 1991**).

Cette étude a affirmé que les extraits des feuilles de *Citrus* possèdent une activité anti hémolytique. Ce résultat coïncide avec d'autres travaux, en effet **Caleño et al. (2016)** ont montré que les HEs de *Citrus aurantium* présentaient une activité anti hémolytique avec une IC₅₀ (86.69±4.98 µg/ml), selon ce même auteur, cette activité est associée à la forte présence d'un terpène : Limonène qui est de 94.4%. Cet effet anti-hémolytique peut être attribué à l'extrait qui équilibre la pression osmotique entre les deux milieux, ou se fixe sur l'aquaporine et empêche l'eau d'entrer à l'hématie.

Le tritonX100 est un détergent non ionique qui possède une partie polaire hydrophile et une queue hydrophobe, Ces molécules entrent en interaction avec les parties hydrophobes des lipides et des protéines de la membrane érythrocytaire, certains extraits de citrus empêchent cette interaction ce qui fait que l'hémolyse n'aura pas lieu donc ont un rôle de stabilisation membranaire, d'autres, ne jouent aucun rôle inhibiteur sur cette interaction puisque Le détergeant possède une structure chimique qui le rend plus accessible à la membrane des érythrocytes que les extraits éthanoliques, ce qui implique une dégradation des globules rouges. Donc chaque extrait a ces propres composants qui lui permet d'inhiber l'hémolyse s'il possède des molécules bioactives ou ne pas inhiber s'il n'en possède pas.

Les érythrocytes sont considérés comme la cible majeure des radicaux libres en raison de la présence d'une concentration élevée d'acides gras polyinsaturés (AGPI), tels que l'acide linoléique et l'acide arachidonique. Le taux d'hémolyse a été montré beaucoup plus élevé lorsque les globules rouges sont traités par le peroxyde d'hydrogène. Cela pourrait être attribué à la nature oxydante du peroxyde d'hydrogène et sa capacité à détruire la membrane cellulaire et en conséquence la libération de l'hémoglobine des cellules. Le peroxyde d'hydrogène peut également causer une toxicité par le radical hydroxyle : selon **Kose et Dogan (1995)**, le H₂O₂ peut causer la dégradation de l'hème de l'hémoglobine libérant ainsi les ions Fe²⁺ ce qui génère par la réaction de fenton le radical hydroxyle OH, plus puissant contribuant ainsi à la peroxydation lipidique. L'activité hémolytique des extraits de plantes

Discussion Générale

peut être due à l'activité scavenger du radical par les composés bioactifs de l'extrait qui libèrent des électrons à H_2O_2 neutralisant ainsi une molécule d'eau.

Dans notre étude, les différents extraits de feuilles de citrus ont montré une augmentation du taux d'hémolyse par rapport à celle où il n'y a pas d'extrait. Donc ces extraits ne présentent pas un effet anti-hémolytique et ne protègent pas les hématites contre le H_2O_2 , ces résultats ne concordent pas avec les différentes études réalisées sur l'effet anti-hémolytique des extraits de plantes, en effet l'étude menée par **Omale James et al, 2014** a révélé une activité anti hémolytique importante des extraits de *Gymnema sylvestre* notamment l'extrait de feuille qui a montré une $IC_{50} = 29,83$ mg/ml et la quercétine utilisée comme standard a montré une IC_{50} de 386,72 mg/ml.

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette étude était l'estimation de l'activité anti-hémolytique des extraits éthanoliques des feuilles de différentes espèces de *Citrus*.

La présente étude a montré que Les différents extraits de feuilles de *citrus* ont une activité anti-hémolytique si l'hémolyse est induite par le milieu hypotonique. Par contre, si l'hémolyse est induite par le peroxyde d'hydrogène, les extraits présenteraient au contraire une amplification de l'hémolyse. si l'inducteur de l'hémolyse est le triton x-100, les extraits testés n'ont révélé aucune une activité hémolytique ou anti-hémolytique.

Dans le cas anti-hémolytique des variétés utilisés, les résultats obtenus suggèrent que les composants des extraits de *ces variétés* représentés par une fraction majoritaire des polyphénols pourraient être le principal constituant anti-hémolytique. En effet, le dosage composés polyphénoliques a montrée que les feuilles de Citrus contiennent des teneurs importantes en ces métabolites bioactifs.

❖ présence de polyphénols dans les feuilles des 5 variétés de citrus :

- ❑ Variété de polyphénol de type polyphénols totaux majoritaire :(tardive, double fine et limon).
- ❑ Variété polyphénol de type flavonoïdes majoritaire:(thompson et sanguinelle).

❖ Les différents extraits des feuilles des variétés de citrus ont montré:

- ❑ Une activité anti hémolytique importante en Milieu hypotonique .
- ❑ Une activité hémolytique en présence de H₂O₂.
- ❑ Seul la variété 3 qui présente une activité antihémolytique en présence du triton (x-100)

En perspectives, des analyses phytochimique et biologiques plus détaillée seront nécessaire pour isoler et caractériser les composés actifs responsables des effets de stabilisation de la membrane pour mieux comprendre les mécanismes d'action exacts de ces activités.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

Aguilar_Martinez. (2007).H2-Erythrocytes_MB7 : Hémathologie H2_Faculté de médecine Montelier_Nîmes.

Allard R.L, Carlo AD, and Faltin EC. Canine Hematological Changes During Gestation and Lactation Company. *Anim Parct*, 19 :3-6, 1989.

Ameziane Amina (2016): Recherche d'effet hémolytique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de la partie aérienne de *Portulaca oleracea (L)*.

Anne Marfain-Koka,Gérard Tertion. Erythroïse et Hémolyse. Service d'hématologie Biologique,Hopital Antoine Béclère,*Clamart*,2000.

Bacha WJJ et Bacha LM. Color Atlas of Veterinary Histology, 2nd Edition, Part 6: Blood Lippincott Williams and Wilkins, U. S. A, 2000.

Barker R.B.Anemia Associated with Immune Réponses .In:Schalm's Veterinary Hematology,5 th Edition ,Feldman.B.F; Zinkl.J.G and Jain.N.C,2000.

Belhadj hanane (2015): Activités antioxydantes et l'effet hémolytique des huiles essentielles de *Thymus ciliatus ssp-euciliatus* et d'*Ammoïdes Verticillata*.

Bendjebla. Glable Hémato-cancéro: le sang. Thèse Magister. 33-40, 2004.

Benhammou, N., Bekkara, A.F. et Panovska, KT. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of the *Pistacialentiscus* and *Pistacia-atlantica* extracts . *African Journal of Pharmacy and pharmacology*, 2, 22-28.

Bezeaud A;Clauvel J.P;Guillin M.C ; Lefrère F ; Lévy J.P;Varet B.(2001).Hématologie et transfusion .Edition: Masson.Paris.

Blood DC et Henderson JA.médecine vétérinaire,2eme édition .Partiel:Médecine général ,In: Les Maladies du sang et des organes Hématopoiétique,1976.

Caleno, C.JL.,Ospina, C.CC., Arango, M.W., Arteaga, M.JJ., et Perea, M.E. (2016). Application of essential oils from two species of the *Rutaceae* family as cellular oxidation controller agent and trypanocidal capacity. *Asian J Pharm Clin Res*, 9 (2): 213-219.

Canfield APJ. Comparative Cell Morphology in the peripheral Blood Film From Exotic and Native Animals. *Aust. Vet.* J76 :793-800, 1998.

Références Bibliographiques

Chavéron H., 1999. - Molécules toxiques. Dans « Introduction à la toxicologie nutritionnelle », TEC & DOC, Lavoisier, Paris, 98 pp.

Cotter SM.A Diagnostic Approach to Anemic Patients. *Vétérinaire Médecine*, May:420-430, 2003.

Dahmoune, F., Boulekbach, L., Moussia, K., Aoun, O., Lamoureux, M .L. et Hearing, V.G (2003). Valorisation of *Citrus Limon* residus for the recovery of antioxidant: Evaluation and optimization of microwave (OCA) and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crop and Products*, 50, 77-87.

Devjani Chakraborty, Barkha Shah (2011): antimicrobial, antioxydative and antihemolytic activity of piper betel leaf extracts. *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 3, Suppl 3, 2011, 192199.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. et Vidal, N. (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts compound. *Food Chemistry*, 97: 654-660.

Ebrahimzadeh M.A , Nabavi S.M , Nabavi S.F (2010): antioxidant and antihémolytic activities of menthe longifolia . *Pharmacologyonline* 2: 464-471.

Ebrahimzadeh M.A , Nabavi S.F , Nabavi S.M , Eslami B. (2010): antioxidant and antihémolytique activities of menthe piperita. *Pharmacologyonline* 1: 744-752.

Ebrahimzadeh Mohammad Ali , Nabavi Seyed Fazel , Nabavi Seyed Mohammad (2009): antihémolytique and antioxydant activity of hibiscus esculentus leaves. *Pharmacologyonline* 2: 1097-1105.

Ebrahimzadeh M.A, Rahmani Z, Eslami B , Nabavi S.F, and Nabavi S.M (2009): antioxydant and antihémolytique activities of crucianella sintenisi.

Eimad dine Tariq Bouhlali , Mohamed Bammou , Khalid Sellam , Mohamed Benlyas, Chakib Alem , Younes Filali-Zegzouti (2016): Evaluation of antioxidant, antihemolytic and antibacterial potential of six Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L) .

Elaine N Marieb; Katja Hoehn ; Anatomie et physiologie humaines; Edition : 8 Pearson. p: 739.

Références Bibliographiques

Elalaoui rachida (2015) : contribution a la recherche d'effet hémolytique a partir d'extraits de berberis vulgaris.

Festus ., Bertin Aguih Vianou ., (2006) : Contribution à l'étude de l'Allo immunisation post-transfusionnelle chez les patients transfusés à Cotonou Bénin Université d'Abomey- Calavi (Bénin) .

Fouché G, Marquet A, and Hamburckers A. Les Plantes Médicinales du Monde des plantes Sart-Tilman, 2000.

Gautrand C. les modalités de Prélèvement Sanguins. Prat Méd 38 : 15-18,2003

Geay T. Hématopoïèse Animale et Humaine, Utilisation Thérapetique des Facteurs de Croissance Hématopoïétiques. Thèse Doctorat Veterinaries, Lyon, France, 1995.

Ghestem A, Seguin E, Paris M, and Orecchioni AM. Le pharmacie, *Botanique Pharmacoqnosie, phytothérapie, homéopathie*, 2001.

Chonthida Thephinlap, Kanjana Pangjit, Maitree Suttajit and Somdet Srichairatanakool (2013): Anti-oxidant properties and anti-hemolytic activity of *Psidium guajava*, *Pandanous odorus* and *Rhinacanthus nasutus*.

Girot R; Lantz B; Wajcman H. (1992). Les maladies du globule rouge. Edition medecine-science Flammarion.

Gouault-Heilmann M ; Sultan C; Imbert.m. (1987). aide-mémoire d'hématologie. Edition: Médecine-sciences Flammarion.

Grisard T. Contribution à l'Etude de Quelques Paramètres Hématologiques chez le Cheval de Sport. Thèse Doctorate Veterinaries, Lyon, France, 1990.

Gwaler RH. Examens de Laboratoire. Dans : Pratique de la Clinique Canine. Editée par : Niemand. H. G et Suter. P. F. Edition Vigot, France, 1992, p 45-56.

Habibur Rahman, M., Eswaraiah, C. et Dutta, A.M. (2015). In - vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa*. Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam), *American-Eurasian J. Agric. & Environ*, 15 (1): 115-121.

Références Bibliographiques

Harvey JW, Asquith R.L, McNuty PK, Kivipelto J, and Bauer JE. Hematology of the Foals Up to One Year old *Equine, Vet. J*, 16: 347-353, 1984.

Hebbani, A.V, Reddy, D.V., Nallanchakravarthula. V.(2014). In vitro anti-hemolytic activity of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wt. & Arn. Bark Powder Aqueous Extract *Indian Journal of Advances in Chemical Science* 3, 102-108.

Iserin P. Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation et soins, éd Larousse, 2001, p.335.

James, O. et Alewo, I.M. (2014). In vitro anti-hemolytic activity of *Gymnema Sylvester* extracts against hydrogen Peroxide (H₂O₂) induced hémolysis in Human erythrocytes, 2 (7): 1-9.

Kose, K et Dogan,P. (1995). Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membrane. Protective effect of Ginkgo Biolabo Extract (EGB761). *The Journal of International Medical Rescearch* , 23: 1-8.

Ledieu D. Hémogramme Blanc. Encyclopédie Vétérinaire. Editions Scientifique et Médicales Elsevier, France, Biologie Clinique, (2003).

Li, B.B., Smith, B. et Hossan, M. D. M. (2006). Extraction of polyphenolic from citrus peels. Antioxidant proprieties method, separation and purification technology, 48, 142-460.

Majester-Savornin, B et al. (1991). Saponines of the plant. *Hedera helix* and their leishmanicidic activity. *Planta Med.*p 260-262.

Marc David-Muller 2013 Tissu Sanguin : Le Globule Rouge Et Sa Pathologie. Les principaux types d'anémies.

Mediaille C. Prélèvement Sanguin. Encyclopédie Vétérinaire. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier, France, Biologie Clinique, 0700. 1992.

Menkoth JH and Clinkenbeard L KD. Normal Hematology of the Dog. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5th Edition. Williams and Wilkins, U. S. A ,2000, p. 1057-1063.

Mhamed Ramchoun, Khalid Sellam, Hicham Harnafi, Chakib Alem, Mohamed Benlyas, Farid Khallouki, Souliman Amrani (2015): Investigation of antioxidant and antihemolytic properties of thymus region , south-east of Morocco. *Asian Pac J Trop Biomed*; 5(2): 93-100.

Références Bibliographiques

Mohammedi Zohra , Atik Fawzia (2014): Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. ISSN : 0975-9492 Vol 5 No 08 Aug.

Moore DM. (2000). Hematology of Rabbits. In: Schalm's Veterinary Hematology, 5th Edition. Williams and Wilkins, U. S. A ,2000, p.1100-1106.

Muthu, S., Durairaj, B. (2015). Inhibitory effect of hydro ethanolic extracts of *Annona muricata* on human platelet aggregation and hémolysis *in vitro*. *Human Journal*, 2 (4): 207-213.

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

Norbert I .Renée F. (1995). Collection biologie Médicale :Hématologie .Edition :Médicales Internationnales . France ,111p.

Nosto A, Gernamo Mp, d'Angelo V, Marino A, and Canamelle M. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letteres en microbiologie appliquée*. 30 (5): 379,2000.

Olivier Preynat-Seauve;Andre Deom;and Dagmar Kessler;Echantillon Hémolyse;Lipémique;Intréique.centre suisse de contrôle de qualité .CSCQ.2 chemin du petite -Bel Air.1225-2010.

Quettier-Deleu, C. Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C et Luyckx, M. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hull and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35-42.

Rebar AH .Conduite Diagnostique en Médecine Canine des Carnivores Domestiques. Editée par FORD R B Edition du Point Vétérinaire ,France,75,75-100,1991.

Ribereau-Gayon, P. (1972). *Propriétés chimiques des phénols*. In " les composés phénoliques des végétaux ". Edition Dunod Paris, p : 29-57.

Ruckebusch Y;(1981). Physiologie pharmacologie, thérapeutique animal, *Ed Maloine*. Paris: 611.

Ryan, I. (2013). Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green and white teas.

Références Bibliographiques

Schalm OW ; Jain NC ;and Caroll EJ.(1975).Veterinary hematology ,3rd édition .Edition Lea and Fibiger,U.S.A.123-130.

Seyed Fazel nabavi, Seyed Mohammad nabavi, William N.setzer , Shakoora Alsadat nabavi, Sharifeh Alsadat nabavi, Mohammad Ali ebrahimzadeh(2012): Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits.

Shobana, S., et Vidhya, R. (2016).Evaluation of *in vitro* hemolytic activity of different parts of abutilon indicum (Linn.).*World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(5): 1182–1196.

Spigno, G., Tramelli, L. et De Faveri, D.M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81 : 200-208.

Susan E, Aeho. Le Manuel veterinarier March. In: **Duncan J.H et Prasse K. W** Veterinary laboratory Medicine, Iowa State-Unversity. 2éme Edition. 13 rue chpon. 75003, 2002.

Suter PF(1992). Anémies et diathèse Hémorragiques: Pratique De La Clinique Canine .Editée par:Niemand HG,and suter F. Edition Voigt ,France ,413-437.

Tvedten H ,and Weiss DJ(2000). Classification and laboratory Evolution of Anémia. In:Schalm's Veterinary Hematology,5th édition .Lippincott ,Williams and Wilkins, p.143-150.

Wajeman h., Lantz B., Girot R. (1992). - les maladies du globule rouge.- 2e edition ; Paris : Inserm.

Yves Ruckebusch (1981). Physiologie physiologie thérapeutique animals. 2éme Edition, p- 92.

Zerargui Fatima(2015): Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives.

Zittoun R ,Samama M ,and MARIE JP(1988).Manuel d'hématologie Edition Doin France .

Résumé :

L'activité anti-hémolytique *in vitro* des extraits éthanolique des feuilles des différentes variétés de *Citrus* a été mesurée pour différents types d'inducteur d'hémolyse. En fonction du type d'inducteur, les extraits de feuilles de citrus ont démontré soit un effet anti-hémolytique dans le cas où l'hémolyse est induite hypotoniquement et un effet hémolytique amplificateur si l'hémolyse est induite par le triton-X-100. Par contre, si l'hémolyse est induite par H₂O₂, les extraits de citrus ne démontrent aucun effet.

Mots clés : *Citrus*, polyphénols, hémolyse, activité anti-hémolytique.

Abstract:

The aim of this study is to evaluate *in vitro* the anti-haemolytic activity of the ethanolic extracts from the leaves of different species of *Citrus* by the evaluation of different haemolytic factors. The leaves of citrus induced an anti-haemolytic effect in the case of haemolysis produced by hypotonic medium. However, they produced an amplificatory effect when the haemolysis was produced by triton-x-100. In fact they haven't any effect when we use the H₂O₂ to produce the haemolysis.

Key words: *Citrus*, polyphenols, hemolysis, anti-hemolytic activity.