

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la recherche scientifique
Université Abderrahmane mira – Bejaia
Faculté des sciences de la nature et de la vie



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème

**Etude de l'activité antioxydante et
anti-hémolytique des extraits de
feuilles de *citrus limon***

Présenté par: M^{elle} DJOUDI Melaz et M^{elle} GHEBRIOUA Souhila

Soutenu Le : 22/06/2017

Devant le jury composé de :

M^{me} Sadaoui Bougouffa KMCB

examinatrice

M^r Ghidouche A MCB Président

M^{me} Laib Y MAD

Promotrice

Année universitaire: 2016/2017

Remerciements

Louange à ALLAH de nous avoir guidé dans le bon chemin pour réaliser ce travail



La première personne qui nous tenons à remercier est notre promotrice M^{me} Laib, pour l'orientation, la disponibilité la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.



Nos sincères remerciements sont également exprimés aux membres de jury qui nous ont fait l'honneur par leur présence pour examiner et valoriser notre travail.



Nos remerciements à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire

À mes sœurs ainsi qu'à mes frères pour leur tendresse, leur complicité, leur soutien, je prie dieu tout puissant de vous prêter une longue vie pleine de bonheur et de santé.



Une pensée à mes parents, je prie dieu tout puissant de les garder dans son vast paradis



À ma binôme Souhila que j'ai partagé ce modeste travail.



À tous ceux que j'aime



MELAZ

Dédicaces

Je dédie ce travail

*À*mes très chers parents, ma mère et mon père pour leur amour, leur sacrifices.



*À*mon mari qui m'a soutenue durant toute la période de réalisation de ce travail.



*À*mes frères **Seghir** et **rabia**



*À*mabinôme et amie **Melaz**



*À*toute personne que je connais



SOUHILA



AA : activité antioxydante.

aa : acide aminé.

AAPH : 2,2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride.

ACD: Anémie des maladies chronique

ACTH :Adeno corticopic Hormone

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdien

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien

A.tanic : Acide tanique.

CO₂:Dioxyde de Carbone.

CAT : Catalase

CP : Composé phénolique

Da : Dalton.

DPPH : 2,2diphényl-1 picrylhydrazyl.

EDTA : Ethyle-Diane Tétra-Acétique.

ERO : Erythropoïétine.

EC : Equivalent catéchine

EQ : Equivalent quercitrine.

Fe²⁺ : Fer ferreux.

GRH : Globule rouge humain.

GPx : Glutathion peroxydase.

Hb : hémoglobine.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

HSP : Protéines de choc thermique.

IC50 : concentration inhibitrice de 50%.

IL-6 : Interleukine-6.

O₂:oxygen.

O⁻²: Anion super oxide.

OH:Radical hydroxyl

PBS: Phosphate-Buffered saline

PL : Peroxydation lipidique.

RO : Radicale alcoxyle.

ROO : Radicale peroxyde.

ROS : Espèce réactifs de l'oxygène.

RBC :Red Blood Cell

SOD : super oxyde dismutase.

TAC : Capacité antioxydante totale.

Figure	Titre	Page
01	Structure de base des flavonoïdes	06
02	Squelette de base des coumarines	07
03	Exemples de structures des alcaloïdes	07
04	Structure de la membrane érythrocytaire	10
05	Relargage de fer par les médiateurs de l'inflammation	11
06	Taux d'extraction des polyphénols des feuilles de citrus limon	18
07	Les teneurs en polyphénols des extraits de feuilles de citrus limon	19
08	Les teneurs en flavonoïdes des extraits de feuilles de citrus limon	21
09	Mécanisme de réduction de radical DPPH	22
10	Représentation graphique de l'évaluation de la réduction de radical DPPH par les extraits des feuilles de <i>citrus limon</i>	22
11	Valeurs des IC ₅₀ obtenus pour les standards et les extraits de citrus limon	23
12	courbe des effets chélateurs de fer en fonction des concentrations des extraits de citrus limon	24
13	Histogramme des taux d'hémolyse (%) des GRH induit par différents extraits de feuilles de <i>citrus limon</i>	26
14	Photos des GRH traités par les extraits de citrus limon vus sous microscope optique GX1000	28
15	Histogramme des taux d'inhibition d'hémolyse par les extraits de feuilles de citrus limon	29

Tableau	Titre	Page
01	Les caractéristiques botaniques de fruit , fleurs et feuilles de citrus limon	03
02	Les principales espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant	04
03	classification des terpenoides	07
04	les pourcentages de l'activité scavenging de radical DPPH	23

**Som
mair
e**

SOMMAIRE

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

Chapitre I : Partie bibliographique

I- La plante.....	02
I-1-Généralités.....	02
I-1-2-Le citrus limon (citronnier).....	02
I-1-3-Classification botanique.....	02
I-2-Oxydants /antioxydants.....	03
I-2-1-Les espèces réactives de l'oxygène(ERO).....	03
I-2-2-Le stress oxydant.....	04
I-2-3-Les antioxydants.....	04
I-3-Les métabolites secondaires.....	05
I-3-1-Les composés phénoliques.....	05
I-3-2-Les alcaloïdes.....	07
I-3-3-Lesterpanoïdes.....	08
I-4-La réaction inflammatoire.....	08
I-4-1-Définition.....	08
I-4-2-Les types d'inflammation.....	08
I-4-3- Les anti-inflammatoires.....	08
I-5-Le globule rouge.....	09
I-5-1- D' finition.....	10
I-5-2- La membrane érythrocytaire.....	09
I-5-3- l'hémolyse.....	10
I-6- Pathologies inflammatoires.....	11
I-6-1-L'anemie inflammatoire.....	11

ChapitreII : Matériels et méthodes

II-1-Matériel végétal.....	12
II-1-1-Recolte, séchage et broyage.....	12
II-1-2-Extraction.....	12
II-2-Dosage des composés phénoliques.....	13
II-2-1-Dosage des phénols totaux.....	13
II-2-2-Dosage des flavonoïdes.....	13
II-3 –Evaluation de l'activité antioxydante des extraits.....	14
II-3-1-Evaluation d l'effet anti radicalaire contre le radical DPPH.....	14
II-3-2-Evaluation de l'effet chélateur de fer ferreux.....	15
II-4-Etude de l'effet protecteur des extraits sur le globule rouge.....	15
II-4-1-Isolement des globules rouge humain(GRH).....	15
II-4-1-1-Test de cytotoxicité	16
II-4-1-2-Test anti hémolytique.....	16

ChapitreIII : Résultats et discussions

III-1-Taux d'extraction.....	18
III-2-Teneur composés phénoliques.....	19
III-2-1-Teneur en polyphénols totaux.....	19
III-2-2-Teneur en flavonoïdes.....	20

III-3-Evaluation de l'activité antioxydante.....	21
III-3-1- Test de DPPH	21
III-3-2-Test de chélation de fer	25
III-4-Etude de l'effet protecteur des extraits sur le GRH.....	26
III-4-1-Test de Cytotoxicité	26
III-4-2-Test anti hémolytique.....	29
Conclusion et perspectives.....	31
Références bibliographiques.....	32
Annexes	

*Intr
odu
ctio
n*

Introduction

Depuis longtemps, les plantes ont été une source d'inspiration pour les nouveaux composés médicamenteux. Presque toutes les civilisations et les cultures de l'antiquité ont dépendu entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, l'accessibilité, la disponibilité et la faible toxicité qui est liée à la dose (**koudaly et al., 2014**).

Le stress oxydant est un déséquilibre de la balance entre le système de défense des antioxydants et la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**power et al., 2010**), cela entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leur conséquence sur le plan moléculaire, telle que les altérations au niveau des protéines, l'apparition des cassures sur l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique (**Shilpa et al., 2017**).

Le *citrus limon* est une plante aromatique originaire de sud-est asiatique, appartient à la famille des rutacées, ses feuilles et ses fruits ont été utilisées depuis longtemps pour traiter nombreuses maladies en raison de sa richesse en métabolites secondaires et son pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire, antiseptique... etc. (**Sidana et al., 2013, Xinmiao et al., 2015**).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante et anti-hémolytique des extraits de feuilles de *citrus limon*.

Notre travail est divisé en deux parties, la première est une étude théorique consacrée à l'étude de la plante « *citrus limon* » le stress oxydatif, les métabolites secondaires et la membrane érythrocytaire qui est altérée au cours de l'inflammation.

La partie pratique en deuxième lieu est constituée de deux chapitres, le premier consacré pour décrire le matériel et les méthodes utilisées lors de travail expérimental. Le deuxième chapitre expose les résultats obtenus et leur discussions.

*Bib
lio
gra
phi
e*

I -1- La plante

I-1-1-Généralités

Les agrumes sont des arbres fruitiers repartis en quatre genres : *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus*. Le genre *Citrus* comprend 16 espèces qui leurs tour sont subdivisées en plusieurs variétés ou cultivars (Iwamassa., 1988), chaque espèce de genre *Citrus* se caractérise par :

- Petits arbres épineux.
- Feuilles à une foliole.
- Fleurs blanches à l'aisselle des feuilles avec un calice odorant à 4 ou 5 sépales
- Ovaire de 8 -18 Loges avec 4-8 ovules (Guignard., 2001).

I-1-2-Le Citrus limon (le citronnier)

Le citronnier est un arbre originaire du sud-est asiatique, cultivé sur le littoral de la méditerranée et dans toutes les régions du globe à climat semi-tropicale (Dubois., 2006). Cette plante est l'une des agrumes les plus vigoureuses, de croissance rapide, elle produit de nombreuses branches, sa taille moyenne est de 3 à 5 m et fructifie abondamment, et la fructification de l'hiver est la plus importante (Blancke., 2001)

I-1-3 -Classification botanique

Selon Padrini et Lucheroni (1996) la classification de *Citrus limon* est la suivante :

- Règne : Végétal
- Ordre : Térébentales.
- Famille : Rutacées.
- Genre : Citrus
- Espèce : Citrus limon.

Tableau I : Caractéristiques botaniques des fruits, fleurs et feuilles de *citrus limon*.

Organe	Photographie
Fruits	
Fleurs	
Feuilles	

I-2-Oxydants /antioxydants

I-2-1-Les Espèces Réactives de l'Oxygène(ERO)

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire sur leur couche externe, les rendant ainsi instables. Lorsque cet électron libre est situé sur un atome d'oxygène, on parle alors « d'espèces réactives de l'oxygène » (ERO). Les principales espèces radicalaires centrées sur l'oxygène sont rapportées dans le tableau1.(Losada *et al.*, 2017).

Tableau II : Les principales espèces radicalaires impliquées dans le stress oxydant.

	Nom
$O_2^{\cdot-}$	Radicale super oxyde
OH^{\cdot}	Radicale hydroxyle
RO	Radicale alcoxyle
$ROO-$	Radicale peroxyde

I-2-2-Le stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme étant un déséquilibre de la balance entre la production des(ERO) 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.

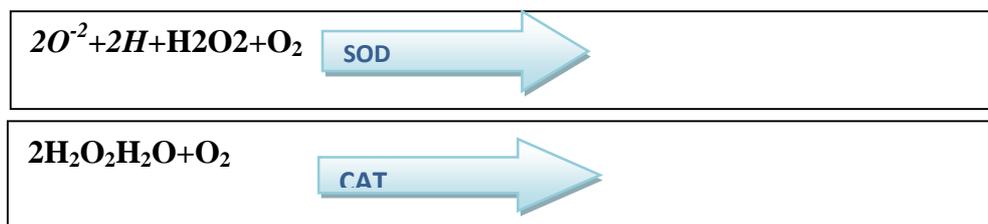
Différentes situations de déséquilibre de cette balance peuvent être observées suite à une situation d'agression intenses et prolongées de l'organisme, dans ce cas, la production d'ERO est supérieure à la capacité anti oxydante, le déséquilibre prolongé conduit à une situation de stress oxydant(Durant et al.,2013).Le stress oxydant est à l'origine de nombreuses pathologies tel que le diabète ,l'œdème pulmonaire, l'Alzheimer(Atawodi., 2005).

I-2-3 -Les antioxydants

Le terme d'antioxydant désigne toutes substances qui présentent à faibles concentration ont la capacité de retarder ou inhiber significativement l'oxydation d'un substrat(Sathiya et al., 2015)ils sont produits dans l'organisme(endogène) ou apportés par les aliments(exogènes) selon le mécanisme d'action on distingue les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques(Park et al., 2001).

✓ Antioxydants enzymatiques

La super oxydedismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase sont les antioxydants enzymatiques clés de ce système de défense par lesquels les radicaux libres qui sont produits pendant les réactions métaboliques sont éliminés(Sathiyaet al.,2015)



✓ Antioxydants non- enzymatiques

Le système de défense non enzymatique comprend l'acide ascorbique (vitamine c) α -tocophérol (vitamine E) ,et le β -carotène(Kharazi., 2008

I-3-Les métabolites secondaires

On distingue par « métabolites secondaires » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement au processus de base de la cellule vivante contrairement aux métabolites primaires qui sont directement impliqués dans les grandes voies du métabolisme basal de la cellule. Les métabolites secondaires interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes (Yamelle., 2007).

Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tel que les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes..... (Newman., 2012).

I-3-1-Les Composés phénoliques

Les Composés phénoliques(CP) correspondent à une grande variété de substances possédant un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle libre, la grande majorité de composés phénoliques dérivent de l'acide cinnamique formé par la voie du shikimate(Ferrazzano et al.,2011).

✓ Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des feuilles et des fruits .ils sont responsables de certaines coloration de nombreux végétaux(Vania et al., 2014).Tous les flavonoïdespossèdent la même structure de base (figure01) le noyau flavane constitué de 15 atomes de carbones(C6C3C6) assemblés en 3 cycles A , B et C(A et B sont des noyaux aromatiques et C est un hétérocycle oxygéné central ,comprend 3familles : les flavonols, les anthocyanes et les flavanons(Kim et al., 2004).

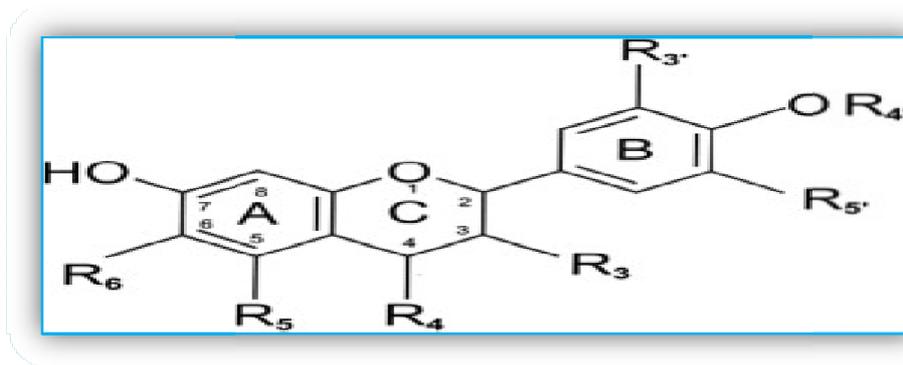


Figure n° 01 : Structure de base des flavonoïdes (Vania et al.,2014).

✓ Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da, ils ont la capacité de combiner aux protéines ce qui explique leur pouvoir tannant. Selon leur structure, on distingue deux groupes : tanins condensés et les tanins hydrolysables, ces derniers sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (Frutos et al.,2004).

✓ Coumarines

Se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés diverses, elles sont capables de prévenir la peroxydation lipidique et de capter les radicaux hydroxyles, super oxydes et peroxydes. . Le squelette de base des coumarines (figure 02) est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (Ford et al., 2001).

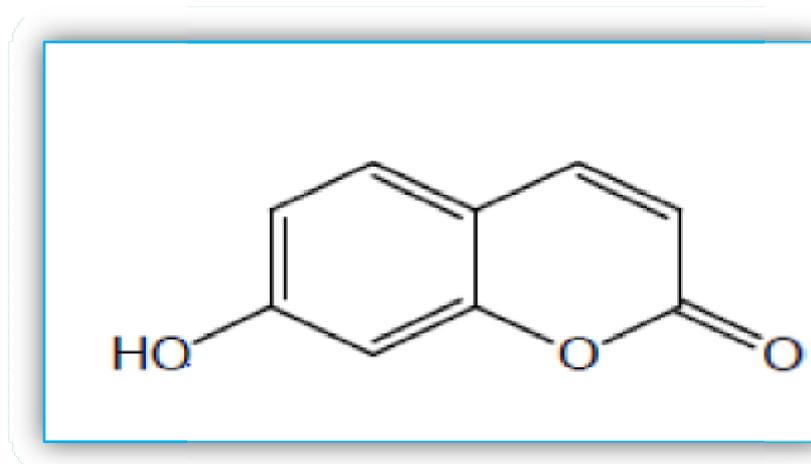


Figure n° 02 : Squelette de base des coumarines (Venugopala.,2013)

II-3-2 -les alcaloïdes

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale à caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe, on distingue Les alcaloïdes vrais qui sont dérivés des acides aminés ,Les proto alcaloïdes dérivés d'acide aminé dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique et Les pseudos alcaloïdes dont l'azote est inclus dans le système hétérocyclique, ce type présente le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas dérivés des acides aminés(aa)(Badiaga., 2011).

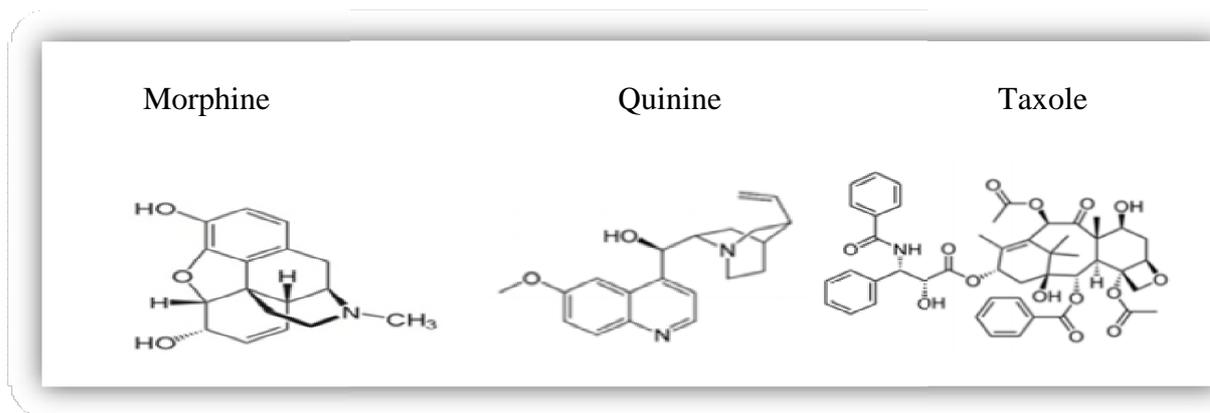


Figure n° 03 : exemples de structures des alcaloïdes(Badiaga., 2011).

II-3-3-Terpenoides

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène Les terpènes sont des Hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_X)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs 1 à 8(Sunet *al.*,2016).

Tableau III : classification des terpenoides.

Monoterpene	C_{10}
Sesquitérpene	C_{15}
Ditérpènes	C_{20}
séstéerpenes	C_{25}
tri terpènes	C_{30}
tetraterpenes	C_{40}
poly terpènes	$(C_{10})_n$ avec $8 < n$

I-4- La réaction inflammation

I-4-1-Définition

La réaction inflammatoire est un phénomène biologique de défense contre toute agression menaçant l'organisme (exposition au froid extrême, traumatisme, infection, etc.) Par une série de réactions non spécifiques. C'est un processus de destruction qui implique le recrutement de produits dérivés du sang, tel que les protéines plasmatiques et les leucocytes, la migration de ces produits est facilitée par des altérations dans le système vasculaire local qui entraîne une vasodilatation, une perméabilité vasculaire accrue et une augmentation de débit sanguin dans le but de détruire ou d'isoler rapidement la source sous-jacente de la perturbation, enlever les tissus endommagés, puis restaurer l'homéostasie tissulaire. (Sharma et Singh., 2013)(Noah et al., 2012).

I-4-2-Les types d'inflammation

✓ L'inflammation aigue

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Chaudhry et al., 1985).

✓ Inflammation chronique:

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années) L'inflammation chronique est initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhérence sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire (Chaudhry et al., 1985).

I-4-3-Les anti-inflammatoire

✓ Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétique et antalgiques (Blain et al., 2000).

✓ **anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)**

Les (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse (Blain *et al.*, 2000).

✓ **Anti-inflammatoires d'origine végétale**

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes(Barnes *et al.*, 1998).

I-5-les globules rouges

I-5-1-Définition

Les globules rouges(RBC), Hématies ou Erythrocytes .sont les cellules les plus abondantes de la circulation sanguine. Leur production quotidienne est de $200 \cdot 10^9$ par jour, et leur durée de vie est de 120 jours, au cours desquels ils effectuent un déplacement de près de 500 km dans la microcirculation. Ils ont pour fonction de transporter l'oxygène (O_2) des poumons vers les tissus, et d'évacuer le dioxyde de carbone(CO_2) en sens inverse. (Guilaum., 2007).

I-5-2-La membrane érythrocytaire

La membrane érythrocytaire est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle s'insère nombre important des protéines reliées au cytosquelette sous-membranaire (figure 5). Certaines de ces glycoprotéines et certains glycolipides expriment à la surface du globule des déterminants des groupes sanguins, le cytosquelette comprend plusieurs protéines dont la spectrine , l'ankyrine et l'actine (Manaargadoo-catin *et al.*,2016).

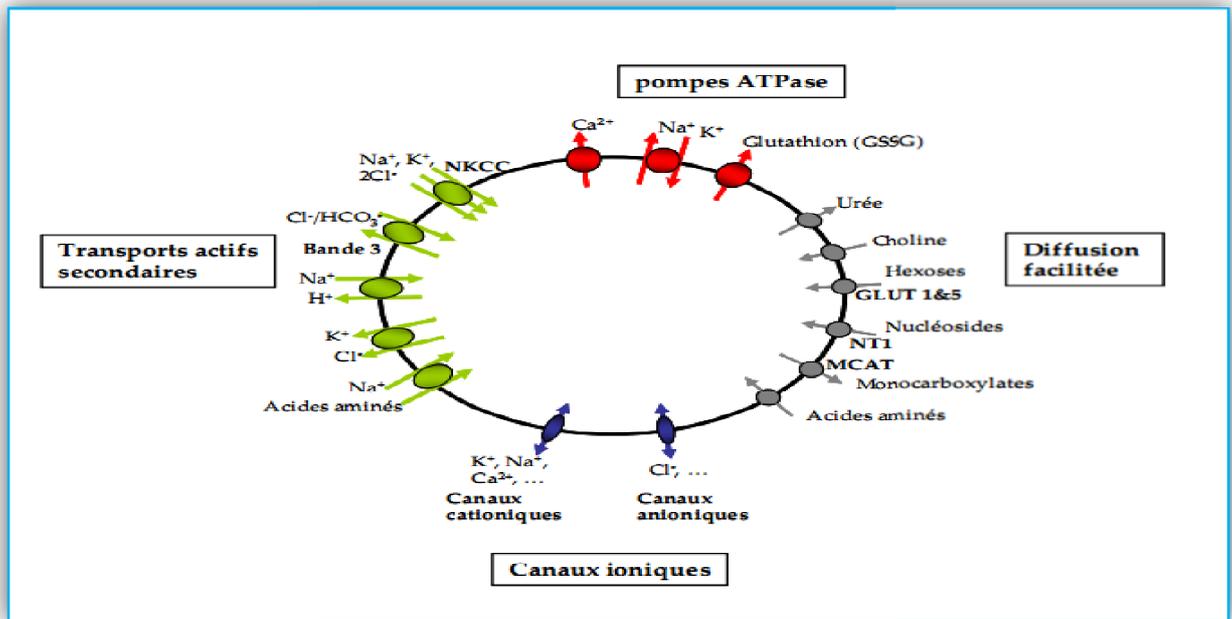


Figure n° 04 : structure de la membrane érythrocytaire (Jauréguiberry., 2015)

I-5-3-l'Hémolyse

Par définition, l'hémolyse désigne le processus visant la destruction de la membrane érythrocytaire provoquant la libération d'hémoglobine (Hb) et d'autres composants associés aux dommages causés par le (RBC) dans le plasma (Kalaiselvi et Vidhya., 2015), si elles ne sont pas neutralisées par les mécanismes de protection innés elles ont le potentiel d'activer de multiples voies inflammatoires. Le hème est l'un de ces modèles qui est capable d'activer les voies d'inflammation convergentes telles que la signalisation des récepteurs de péage, la formation de piège extracellulaire des neutrophiles. D'autres molécules puissantes qui peuvent être libérées par le GR lors de sa rupture comprennent les protéines de choc (HSP), l'interleukine-33 et le triphosphate d'adénosine 5' (Mondonaca et Silveira., 2016).

I-6-Pathologies inflammatoires

I-6-1-l'anémie inflammatoire :

Tout état inflammatoire s'il prolonge influence les paramètres de métabolisme de fer et aboutit à une anémie dite inflammatoire ou anémie des maladies chroniques (ACD) (Allocca., 2014). L'inflammation induit de nombreux changements cytokiniques, avec pour conséquence une augmentation de la synthèse de ferritine et une diminution de celle de la transferrine. L'augmentation de la production de l'IL-6 augmente les taux

d'hépcidine, une molécule centrale dans l'homéostasie de fer. En effet, l'hépcidine interagit avec les parties extracellulaires de la ferroportine en empêchant ainsi le passage de fer dans le sang et le relargage de fer par les macrophages et les hépatocytes. L'hypoxie et l'inflammation médiée par l'IL-6 diminuent le taux d'érythropoïétine (EPO) qui joue un rôle dans l'érythropoïèse influençant ainsi la régulation de l'hépcidine. (Celi et al., 2011).

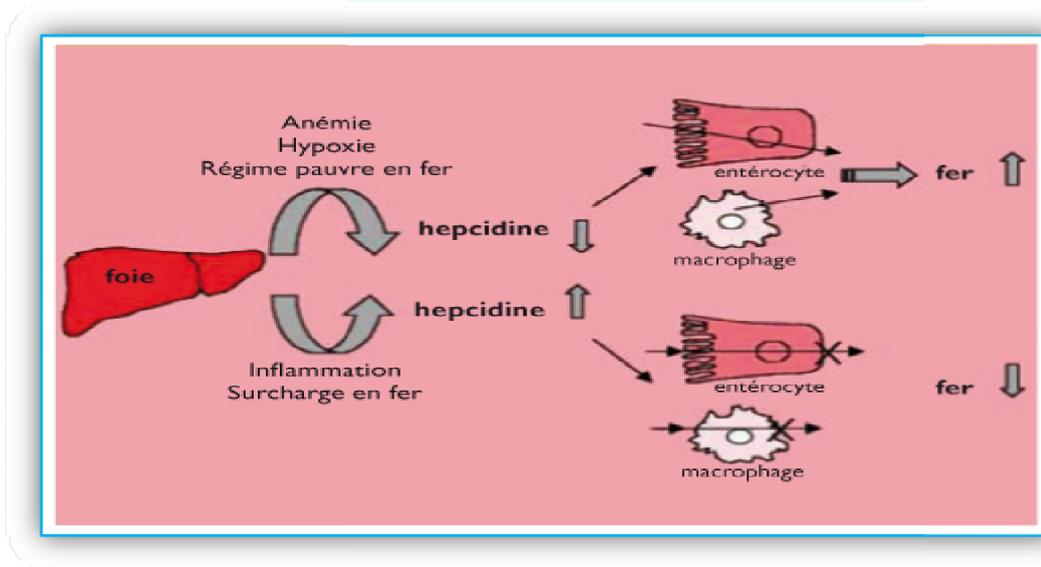


Figure n°5: Relargage de fer par les médiateurs d'inflammation(Celi.et al.,2011).

Matéri elles et Métho des

II-1 : Matériel végétal

II-1-1 Récolte, séchage et broyage

L'étude est effectuée sur les feuilles d'une espèce de citronnier dont le nom scientifique est *Citrus limon* qui ont été récoltées en février 2017 dans la vallée de la Soummam de côte de Tmezrit, wilaya de Bejaia. Les feuilles de *Citrus limon* ont été séchées à l'étuve à 37°C pendant 72h, ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine. Cette dernière est tamisée dans le but d'obtenir une poudre très fine de diamètre inférieur à 50µm qui est utilisée pour l'extraction.

II-1-2 Extraction

Dans cette étude, le protocole d'extraction appliqué est celui de **Chiang et al.,(1994)**. La poudre fine de *Citrus limon* a été macérée dans du méthanol avec un rapport masse /volume de 1 : 4 (M : V) pendant 24 h. Par la suite, une décantation de 24h, suivie d'une centrifugation de 1500rpm ont été effectuées, donnant naissance à deux phases bien distinctes dont le surnageant représente l'extrait méthanolique. Ce dernier est filtré puis versé dans un cristalliseur et a soumis un séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière, jusqu'à stabilisation complète de son poids sec.

Une fois bien sec, une partie de l'extrait méthanolique a fait l'objet d'une deuxième extraction en suivant les mêmes étapes citées précédemment ; l'extrait brut de *Citrus limon* a été macéré dans un mélange chloroforme /eau avec un rapport volume /volume de 4 : 1 (v : v), à la fin, deux extraits ont été obtenus : chloroforme et aqueux de chloroforme. Le taux d'extraction a été calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_1 - P_0)/E] \times 100$$

P₁ : poids d'extrait après évaporation (g).

P₀ : poids vide du cristalliseur ou boîte de pétri (g).

E : poids de la poudre ou de l'échantillon initial (g).

II-2 : Dosage des composés phénoliques

II-2-1 Dosage des phénols totaux

- Principe de la méthode

Le dosage des phénols totaux est effectué suivant le procédé de **Kähkönen *et al* (1999)** avec quelques modifications, dont le principe repose sur la réaction des composés phénoliques avec le réactif de Folin–Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀).

L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

- Mode opératoire

A 200 µl des extraits (à une concentration de 100 µg/ml) ont été ajoutés 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 800 µl de carbonate de sodium (7,5 %). Le mélange est incubé pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 765 nm contre un blanc contenant tous les réactifs sauf l'extrait (le contrôle)

Une courbe d'étalonnage a été préalablement préparée dans les mêmes conditions, en utilisant la catéchine comme référence.

II-2-2: Dosage des flavonoïdes

- Principe de la méthode

Le dosage des flavonoïdes est effectué suivant le protocole de **Maksimović *et al* (2005)** avec quelques modifications. Le principe de cette méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à chélater des métaux (chlorure d'aluminium AlCl₃) et de former ainsi un complexe de coloration jaunâtre. L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 430 nm est proportionnelle à la quantité de complexes formés.

- Mode opératoire

2 ml de l'extrait préparé dans de l'éthanol (100 µg /ml) ont été rajoutés à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (133 mg de chlorure d'aluminium et 400 mg d'acétate de sodium cristalline dans 100 ml d'eau distillée). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est

enregistrée à 430 nm contre un blanc de 2 ml de la solution d'extrait avec 1 ml d'eau distillée (pour les 03extraits).La concentration des flavonoïdes est déduite à partir des gammes d'étalonnage établies avec la rutine et sont exprimées en milligramme d'équivalent rutine par gramme d'extrait (mg Equivalent Rutine/g d'extrait) (Annexe 1).

II-3 : Evaluation de l'activité antioxydant des extraits

II-3-1 : Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le radical DPPH

- Principe de la méthode

L'effet scavenger des extraits de *Citrus limon* sur le radical DPPH est mesuré en utilisant la méthode de **Maisuthisakul et al (2007)**. Les antioxydants présents dans les extraits de la plante (AH) pouvant donner un hydrogène (tels que les groupements hydroxyles des composés phénoliques), réduiront le DPPH qui est un radical libre, stable et accepteur d'hydrogène (**Mohcen et Ammar, 2009**). La réaction peut se résumer comme suit:



La réduction de DPPH s'accompagne par le virage de la couleur violette de la solution à la couleur jaune, avec un pic d'absorbance à 517 nm. Le taux réduit du radical DPPH par ces molécules est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité scavenging de radical DPPH}^{\cdot} = [(\text{Ac} - (\text{At} - \text{Ab})) / \text{Ac}] \times 100$$

Ac : Absorbance de la solution contrôle (la solution DPPH).

At : Absorbance de la solution DPPH[·] + extrait.

Ab : Absorbance de l'échantillon de la solution d'extrait sans le DPPH.

- Mode opératoire

50 µl de la solution DPPH[·] (5mM) est ajoutée à 2,45 ml de la solution des deux extraits de la plante à différentes concentrations (100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10µg/ml). Après incubation à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Pour chaque concentration d'extrait, un blanc a été préparé, constitué de 2,45 ml de solution des extraits à tester additionné de 50 µl de méthanol, tous les essais ont été répétés trois fois. Le contrôle est composé de 2,45 ml de méthanol et de 50 µl de

DPPH. À titre d'indication, deux standards : l'acide tannique, et la quercitrine connus pour leur effet anti-radicalaire contre le DPPH ont été testés en parallèle.

II-3-2 : Evaluation de l'effet chélateur de fer ferreux

- Principe de la méthode

La capacité chélatrice des extraits aqueux, méthanolique et de chloroforme de *citrus limon* est déterminée selon la méthode de **Le et ses collaborateurs (2006)**, avec quelque modification .qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions Fe²⁺. L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

- Mode opératoire

500ul des solutions d'extraits ou du chélateur standard (EDTA) à différentes concentrations sont additionnées à 100 µl de FeCl₂ (0.6 mM) et 900 µl de méthanol. Après 5 min d'incubation, cent microlitres de ferrosine (5 mM) sont ajoutés, et le mélange est agité et laissé réagir pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel. L'absorbance du complexe Fe²⁺ -ferrosine est mesurée à 562 nm

II-4. Etude du l'effet protecteur des extraits sur le globule rouge humain

La susceptibilité des globules rouges au stress oxydatif fait d'eux un modèle adéquat pour l'évaluation des défenses oxydatives de différents individus. Il suffit de soumettre ces cellules à un système produisant des radicaux libres ou de l'eau oxygénée de manière constante et de mesurer le taux d'hémolyse comme marqueur *in vitro* du dommage oxydatif

Dans le présent travail ; le recours à l'utilisation de globule rouge vise à étudier l'effet protecteur probable des extraits de *Citrus limon* sur la stabilisation de la membrane cytoplasmique de ce derniers.

II-4-1 : Isolements des globules rouge humains

-Du sang frais est collecté au-dessus du coude d'un volontaire sain qui n'a pas pris d'anti inflammatoires dans les 48h qui précèdent le prélèvement. Les prélèvements sanguins ont été réalisés dans des tubes héparinés.

-Le sang est centrifugé à 3000g pendant 10min, après élimination du plasma, le culot est lavé trois fois par solution isotonique (NaCl 0.9 %). Pendant chaque lavage, la suspension est homogénéisée par un simple retournement. À l'issue de la dernière centrifugation le culot cellulaire des globules rouges est reconstitué sous forme de suspension à 20% avec la solution isotonique

II-4-1-1- : Test de cytotoxicité

-Principe

Le protocole suivi pour étudier la cytotoxicité des extraits de *Citrus limon* est celui de l'Okokoet Ere (2012), les différents extraits sont testés à des concentrations allant de 100µg/ml à 1000µg/ml. L'évaluation de lacytotoxicité de différents extraits, vis-à-vis des globules rouges humains, a été réalisée par mesure du pourcentage d'hémolyse et par l'observation sous microscope.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hémolyse dans les échantillons témoins (témoin - et +) et les échantillons traités avec les différents extraits comme suit :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{A_E}{A_C} \times 100$$

Ou

A_E: Absorbance de l'échantillon

A_C: Absorbance du control positive (solution hypotonique)

-Mode opératoire

- Préparation de solution d'hématies (20%)
- 0.8ml d'extraits +0.2 ml d'hématies (20%)
- Incubation à 37°C/30min
- Centrifugation 3000 rpm/10min
- Lecture à 470 nm

II-4-1-2- : Teste anti-hémolytique

-Principe

L'effet anti-hémolytique des extraits de *limon citrus* est évalué *in vitro* par la méthode de l'AAPH rapporté par Zhang et al., (2011). Dans le but de démontrer l'effet protecteur des extraits de *limon citrus* sur la préservation de l'intégrité cellulaire, qui est essentiellement liée aux membranes des globules rouges, nous avons soumis les érythrocytes à des conditions du stress oxydant par l'ajout AAPH (2,2-azobis(2 amidinopropanedihydrochloride)). La décomposition thermique de ce composé produit des radicaux libres à vitesse constante qui attaquent la membrane des globules rouges et

lorsque les antioxydants endogènes sont épuisés, la membrane des globules rouges éclate et l'hémoglobine intercellulaire est libérée (Bessada et al., 2015). La Quercétine est utilisée comme standard.

Le suivi de l'hémolyse est évalué quantitativement par un dosage spectrophotométrique de taux d'hémoglobine dans le surnageant à 545 nm.

Mode opératoire

- 200µl d'hématies (20%)+200µL extrait/standard à 100ug/ml
- Incubation à 37°C/30min
- Addition de 400µl d'AAPH (200 mM)
- Incubation à 37°C/2h
- Ajout 3 ml PBS
- Centrifugation 1200 rpm/10min
- Lecture à 540nm

L'effet protecteur de différents extraits est évalué en pourcentage d'inhibition d'hémolyse selon la formule suivante:

$$\% \text{d'inhibition d'hémolyse} = [1 - (\text{AE}/\text{AC})] \times 100$$

Ou

AE:Absorbance de l'échantillon

AC:Absorbance du control positive(hémolyse complet)

Résult as et Discut ions

III-1-Taux d'extraction

Cette extraction est destinée à séparer les antioxydants solubles par diffusion à travers une matrice solide (matériel végétale) vers une matrice liquide (solvant) (Kanoun,2011). C'est l'étape préliminaire avant toute analyse quantitative. Les solvants utilisés dans cette extraction sont : le méthanol, chloroforme et l'aqueux de chloroforme et cela nous a permis d'obtenir les résultats suivants

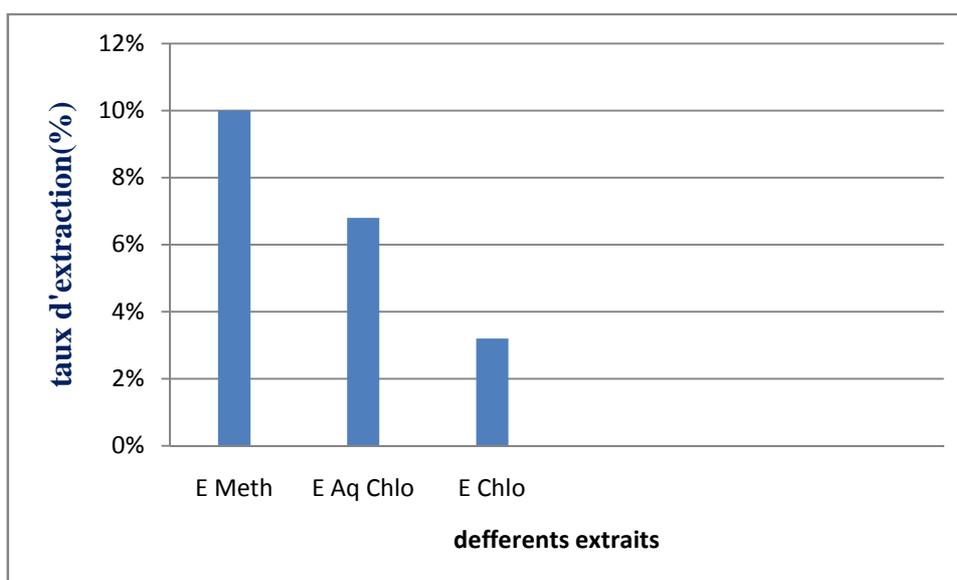


Figure n° 06:Taux d'extraction(%) des feuilles de *citrus limon*.

EMeth : extrait methanolique, Ea q chlo : extrait aqueux de chloroforme, Echlo : extrait chloroforme .

Malgré qu'on a utilisé le même matériel végétale (la poudre des feuilles de *citrus limon*) mais les taux d'extractions sont différents pour les trois solvants : l'extraction avec le méthanol a donné le rendement le plus élevé(10%),suivi par les deux autres extraits issus de l'extrait methanolique(aqueux de chloforme et chloroforme qui ont donné 6,8%(3.2%)respectivement .

La différence de rendement entre les trois extraits est due aux solvants utilisés et les types de métabolites secondaires présents dans l'extrait. La présence de l'eau augmente la perméabilité des tissu végétales et favorise le phénomène de diffusion dans l'étape d'extraction(Arimboor et Arumughan., 2011)et reste le méthanol le solvant

approprié pour une récupération importante pour la majorité des polyphénols (Vercauteren *et al.*, 1998) (Falleh *et al.*, 2008).

Nous résultats sont un peu proches à celles obtenus par d'autre chercheur pour des autre espèces de citrus. En effet, le rendement d'extraction des feuilles de *citrus medica* selon (Minichini *et al.*, 2011) est de 8.2%. Alors que, (Tachakittirungrodet *et al.*, 2007) ont obtenu un rendement de 7.42% pour celui des feuilles de *citrus hystrix*.

II. Teneur des polyphénolstotaux et des flavonoïdes

Afin de caractériser les extraits des feuilles de citrus limon, on a effectué un dosage des polyphénolstotaux et flavonoïdes et la raison pour laquelle on a choisi ces deux métabolites réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes leur sont attribuées.

II-1-Teneur des polyphénolstotaux

La teneur en composés phénoliques est estimée par la méthode de **Folin-Ciocalteu** qui est basée sur la réduction de réactif de folin par des groupements oxydables des (CP) conduisant à un produit de réduction de couleur bleu. Les résultats sont exprimés en mgEQ de catéchine par g d'extrait végétale.

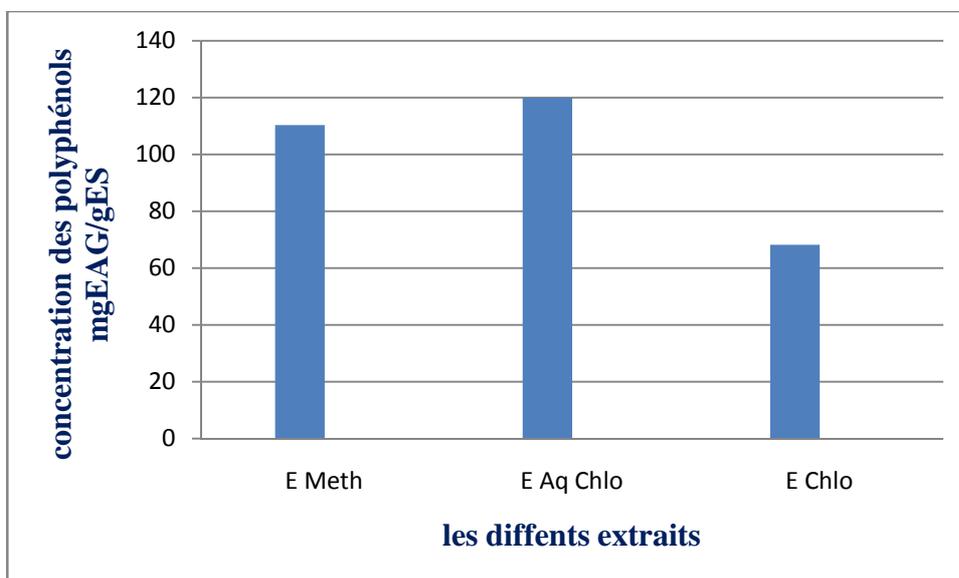


Figure n° 07: Histogramme des teneurs en composés phénoliques des extraits des feuilles de *citrus limon*.

À la première lecture des résultats rapportés dans la (figure n° 07), il ressort que l'extrait aqueux est le plus riche en polyphénolstotaux avec un rendement de 120,03 mgEC/g suivi par l'extrait méthanolique avec un rendement de 110,29

mgEC/g tandis que l'extrait chloroforme est le plus pauvre avec un rendement de 68,18mgEC/g.

La différence des résultats est due à la nature des composés phénoliques et leur solubilité qui est gouvernée par le degré de polarisation, leur interaction avec d'autres substances et le type de solvant utilisé (Falleh *et al.*, 2008) parce que les polyphénols est une classe de molécules caractérisées comme l'indique le nom par la présence de plusieurs groupes phénoliques associés en structures plus au moins complexes, sont solubles dans les solvants organiques polaire et un peu solubles dans les solvant moins polaire (Macheix *et al.*, 2005), ainsi les solvants qui ont donnés les teneurs les plus élevées sont le méthanol avec une polarité moyenne et l'eau dont la polarité est plus élevé.

Généralement, les espèce de citrus sont connus par leur composés phénoliques (Smith *et al.*, 2005) Les analyse quantitative des polyphénols des écorces de citrus limon réalisées par (Agarwalet *et al.*, 2012). ont montré que l'extrait méthanolique a une teneur proche de nos résultats (112,52 mgEC/g) ce qui montre que la teneur en polyphénols totaux des feuilles et des écorces de *citrus limon* sont presque la même quantité mais il est à retenir que la variation de rendement des métabolites secondaire peut être attribué à la partie étudié de la plante et la région de récolte (Smith *et al.*, 2005).

La faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (Vuorela *et al.*, 2005). Le dosage par ce réactif donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux polyphénols, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Tawaha *et al.*, 2007).

II-2-Teneur des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' $AlCl_3$ en utilisant comme standard la quercitrine (Annexe I), les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg ER/g d'extrait.

Une couleur jaunâtre est formée dans tous les extraits des feuilles de citrus limon après addition de la solution de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), cette coloration révéla la présence des flavonoïdes. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent de Rutine par g d'extrait sont représentées dans la figure 08.

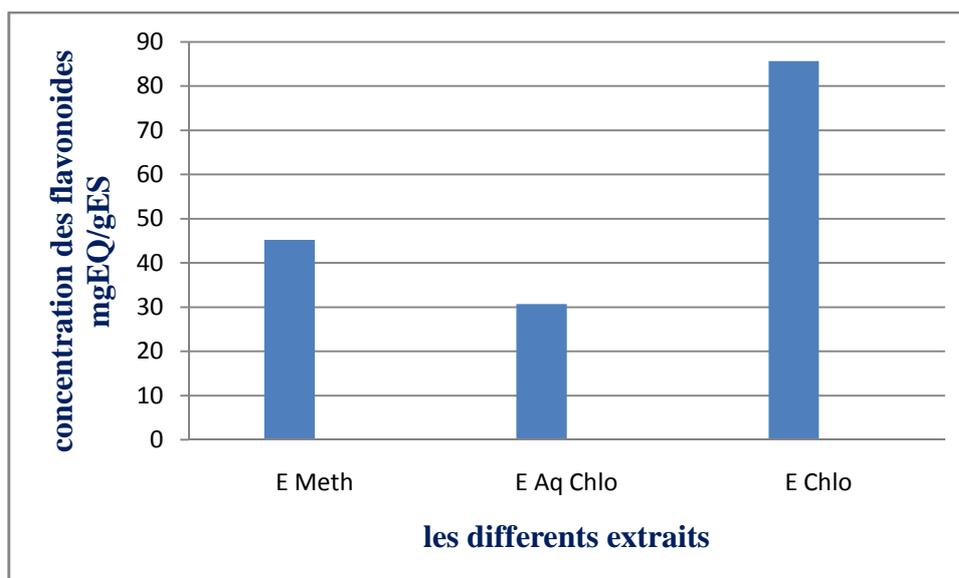


Figure n° 08: Histogramme des teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles de *citrus limon*. Emeth : extrait méthanolique, E.aq chlo : extrait aqueux de chloroforme, E.chlo : extrait chloroforme

On conclure de ses résultats que l'extrait de chloroforme a une teneur très importante ((85.68mgER/g) par rapport aux autres extraits méthanolique et l'aqueux de chloroforme qui est moins important 45.23mgER/g et 30.72mgER/g respectivement. Ceci peut être expliqué par la diversité structurales et les propriétés physico-chimiques des flavonoïdes (Verykokidou et Voyo,1986).

La teneur des flavonoïdes d'extrait méthanolique des feuilles de *citrus limon* est moins importante que la teneur des feuilles d'une autre espèce de *citrus* (*citrus medica*) qui de 97,5mgEQ/g (Minichini *etal.*,2011) cette différence est liée à l'espèce étudiée, la région de la récolte et le climat (Smith *et al.*,2005)

III.Etude de l'activité antioxydant *in vitro*

Nous avons évalué le pouvoir antioxydant de nos extraits qui se sont montrés riches en tanins et flavonoïdes. Pour ce faire, nous avons utilisé trois méthodes à savoir la méthode au DPPH, la chélation de fer fêrue

III-1-Test de DPPH :

L'activité antioxydant des extraits de *citrus limon* vis-à-vis de radical DPPH a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre ensuivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH) à la couleur jaune (DPPH-H). la méthode (DPPH) est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. (Talbi *et al.*, 2015).

Le changement de la couleur de la solution (à plusieurs concentrations) montre l'existence de la réduction de DPPH donc les trois extraits des feuilles de *citrus limon* ont un effet scavenger contre le radical DPPH

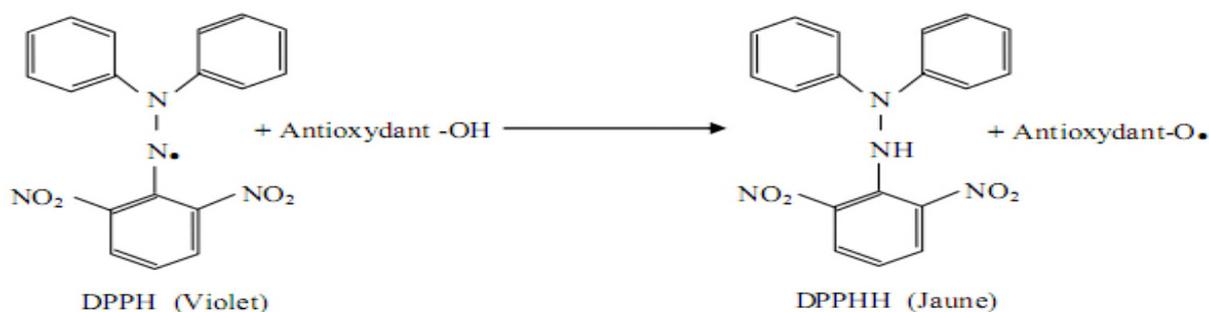


Figure n° 09: mécanisme de réduction de radical DPPH.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations différentes (de 10µg à 100µg) de l'extrait issu à partir des feuilles de *citrus limon* sont présentés dans la figure n°10

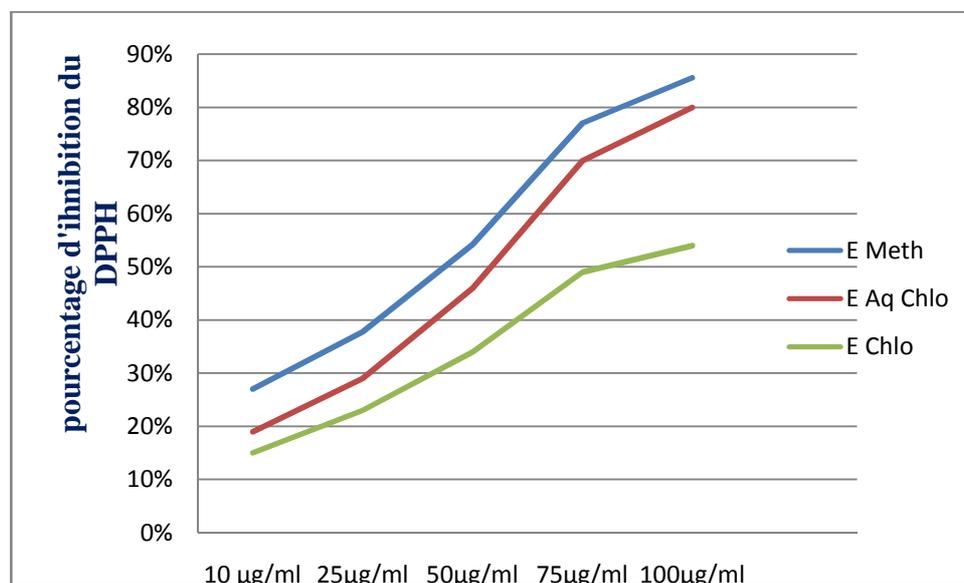


Figure n° 10: Représentation graphique de l'évaluation de la réduction de radical DPPH par les extraits des feuilles de *citrus limon*

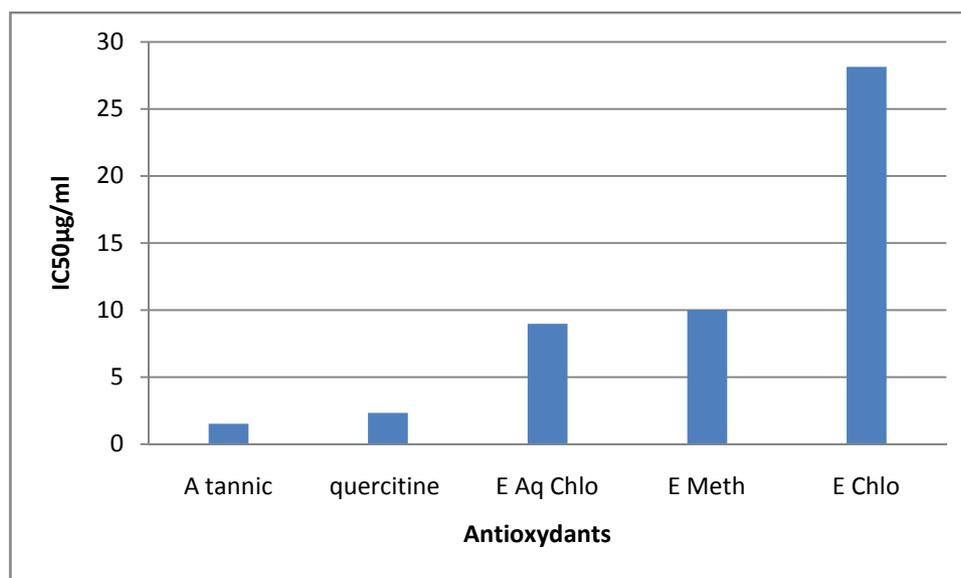


Figure n° 11: Histogramme des concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀) des feuilles de *citrus limon*. A.tannic : Acide tannique

D'après les résultats obtenus on constate que les pourcentages d'inhibition augmentent proportionnellement avec les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'inhibition presque totale du DPPH présent dans ce milieu.

L'activité antioxydant des extraits est dose dépendant pour les concentrations comprises entre 10 et 100 µg/ml, la présence d'une phase stationnaire entre **75 à 100 µg/ml** signifie que la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire, donc l'activité est maximale à la concentration (**100 µg**).

Les résultats de l'activité antioxydant ont révélé que les trois extraits de *citrus limon* possèdent une activité anti-radicalaire.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH est différent d'un extrait à l'autre, ses variations sont présentées dans le tableau IV.

Tableau IV : Les pourcentages de l'activité scavenging de radical DPPH.

phases	Concentrations/extraits	E.Méthanolique	E. Aqueuse	E.Chloroformique
Phase exponentiel	10 µg	27% à 77%	19% à 70%	15% à 49%
	25 µg			
	50 µg			
Phase stationnaire	75 µg	77% à 86%	70% à 80%	49% à 54%
	100 µg			

A travers le tableau IV, il ressort que l'activité antioxydant des extraits de feuilles de *citrus limon* vis-à-vis de radical DPPH est due à la dose et le solvant utilisé pendant la phase exponentielle, conservant les concentrations comprises entre 10 et 50 µg/ml les extraits méthanolique, chloroforme et aqueux possèdent les pourcentages 27-77%, 19-70%, 15-49% respectivement.

On peut expliquer ces résultats par les teneurs en polyphénols totaux et des flavonoïdes. Il reste le chloroforme qui a le pourcentage d'inhibition le plus faible, alors que pour les standards utilisés il ya d'activité plus élevée (même à des très faibles concentrations) que celle des extraits.

L'effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical DPPH est exprimé par la concentration inhibitrice à 50 % (CI50) qui correspond à la concentration nécessaire en extraits pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH, ce paramètre est inversement lié à la capacité antioxydant.

Par rapport aux molécules de référence et d'après les résultats obtenus, l'extrait méthanolique et aqueux sont dotés d'un pouvoir antioxydant modéré, leur IC50 est de 10 µg/ml et 7,5 µg/ml respectivement qui est un peu supérieur à celle des standards (A.tannic et quercitrine), dont les valeurs sont 7,5 µg/ml et 7,25 µg/ml respectivement. Tandis que l'extrait chloroforme a donné une valeur d'IC50 très élevée donc possède une activité antioxydant très faibles par rapport aux standards et les deux autres extraits.

III-3-Test de chélation de fer

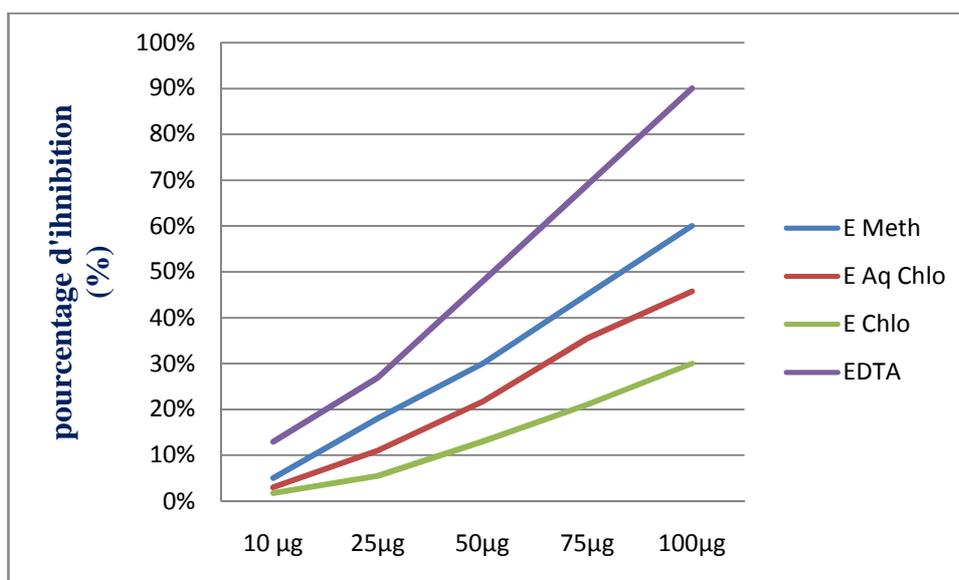


Figure n° 12 : courbe des effets chélateurs de fer en fonction des concentrations des extraits de citrus limon. Met : méthanol ; aqu : aqueux ; chl : chloroforme ; EDTA

La ferrozine peut quantitativement former un complexe avec le fer (Fe^{2+} -Ferrozine); chromophore rouge ayant un maximum d'absorption à 562nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de la couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement.

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits de *citrus limon* exercent un effet chélateur dose dépendent. Un pourcentage d'inhibition de 88,87 % non significatif par rapport au standard (EDTA) est obtenu par l'extrait méthanolique à une concentration de 100ug/ml, tandis que l'extrait aqueux et chloroforme ont donné des pourcentages de 45,5 % et 35 % respectivement pour la même concentration.

L'extrait méthanolique présente les meilleurs pouvoir chélateurs largement supérieurs à celui exprimé par l'extrais aqueux et chloroforme avec les différentes concentrations (50, 25 et 10 ug/ml) .

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres (talbi et al., 2015) qui ont rapporté que l'extrait méthanolique possède une activité antioxydant modérée . Cet extrait pourrait donc constituer une alternative à certains additifs synthétique.

L'étude de l'activité chélatrice des polyphénols de feuilles de *citrus limona* a révélé une activité chélatrice non efficace.

Dans un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas chélater les métaux de transition si ses polyphénols ne disposent pas les groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice. Les ligands bidentates sont des chélateurs plus puissants que les monodentates, par exemple un groupent catéchol se lie fortement au fer contrairement à un groupement phénol, de même la conjugaison d'un composé phénolique avec une partie glucidique entraîne la perte de l'activité chélatrice (Wong et al., 2006).

La différence dans la capacité chélatrice est probablement due à la différence du teneur en polyphénols qui se diffère d'un extrait à l'autre ainsi que aux propriétés physico-chimiques des composés qui entrent dans la composition des extraits. Par exemple, les flavonoïdes glycosylés ont une activité anti oxydante inférieures à celle des flavonoïdes non glycosylés (Bouزيد et al., 2010).

IV-Etude de l'effet protecteur des extraits sur le GRH

IV-1-Test de cytotoxicité

Plusieurs études ont montré que certains des métabolites secondaires notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes et les saponosides possèderaient des propriétés anti-inflammatoires (Sparg *et al.*, 2004 ; Fiot *et al.*, 2006).

à fin d'étudier la cytotoxicité des extraits de citrus limon sur les globules rouges , nous avons réalisé un test de cytotoxicité in vitro dans lequel on a passé par deux étapes ,dans la première étape on a met les GRH en contact avec les extraits des feuilles de *citrus limon* à différentes concentrations comparés un contrôle positif et à un contrôle négatif pendant 30 min dans un milieu isotonique (Na cl 9%) en mesurant les pourcentage d'hémolyse à partir des absorbances obtenus par spectrophotomètre

L'évolution de l'effet hémolytique est évalué par rapport à un témoin négatif et un autre positif qui contiennent respectivement de (globules rouge+ H₂O)(NaCl 0.9%+ globules rouge) ,les résultats obtenus de cette étape sont présentées dans la figures 13.

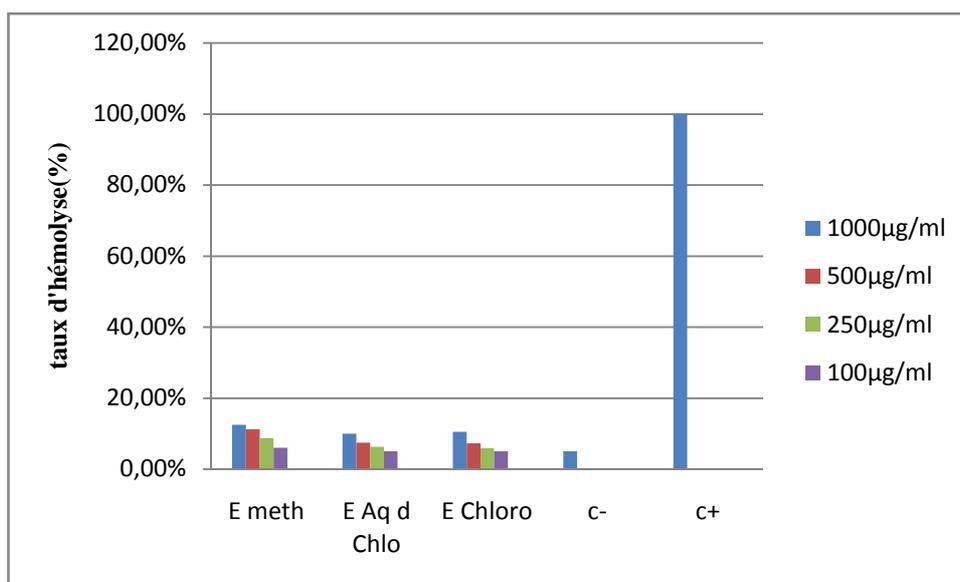
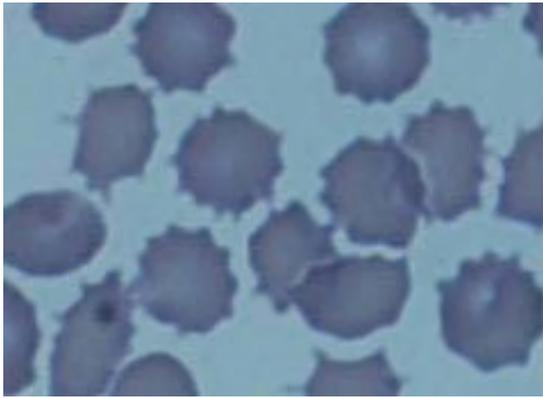


Figure n° 13: histogramme des taux d'hémolyse (%) des GR induit par différents extraits de feuilles de *citrus limon*

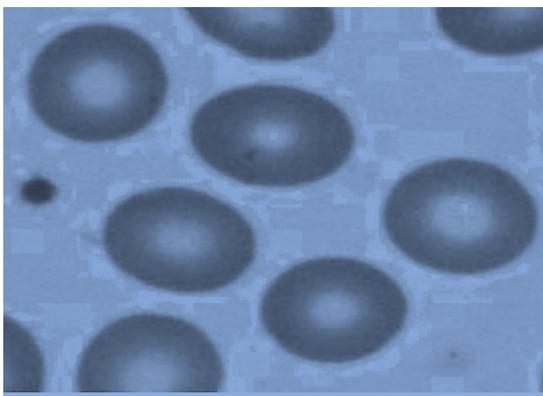
D'après la figure n°13, on constate que Les taux d'hémolyse sont très bas (entre 5 et 15%) même à des concentrations très élevées (100 µg/ml [6%] 1000 µg/ml [12%]) donc les extraits des feuilles de citrus limon n'ont pas un effet cytotoxique sur les globules rouges. L'étude de l'activité cytotoxique nous a clairement montré que les extraits de feuilles de citrus limon n'avaient pratiquement aucun effet sur les globules rouges malgré qu'elles contiennent des flavonoïdes. Ceci pourrait s'expliquer par la glycosylation des flavonoïdes bloquant leur entrée dans les cellules, d'où l'inactivité de certains extraits. En effet les

flavonoïdes sont généralement cytotoxiques, mais cette efficacité dépend d'une part de leur glycosylation éventuelle et d'autre part de leur degré de méthylation. La structure des flavonoïdes présents dans nos extraits de feuilles ne correspondrait pas à celle des flavonoïdes à activité cytotoxique. (Nadour.,2015).

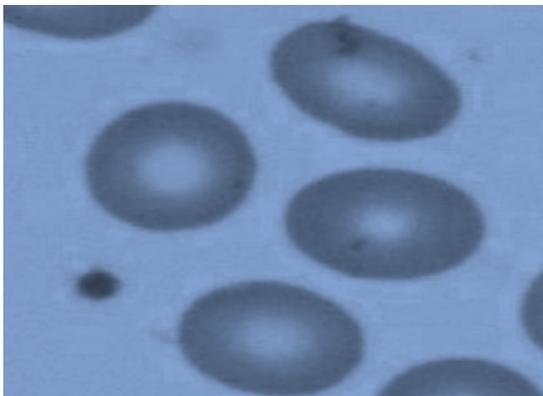
Dans la deuxième étape de cette étude on a assuré les résultats de l'étape précédente par observation sous microscope des différents échantillons et de témoin positif. La forme normale des globules sous le microscope assure l'absence d'un effet cytotoxique des extraits des feuilles de *citrus limon* comparativement au contrôle positif. Comme il est montré sur la figure n° 14.



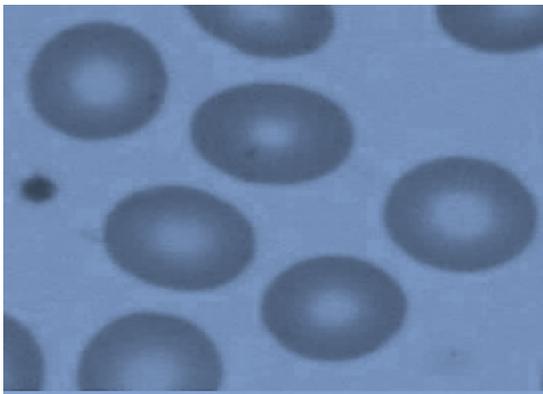
Contrôle
Positif



Extrait
méthanolique à
1000µg/ml



Extrait aqueux de
chloroforme à
1000µg/ml



Extrait de
chloroforme à
1000µg/ml

Figure n° 14: photos de globules rouges traitées avec les deux extraits E méthanolique et l'aqueux de chloroforme et du témoin positive vu sous microscope optique x100

IV-2-Test anti hémolytique

À fin d'étudier l'effet des extraits de *citrus limon* sur les globules rouges, nous avons soumis ces dernières à des conditions du stress oxydant par l'ajout de AAPH(2,2-azobis(2 amidinopropane) dihydrochloride). Lorsque les globules rouges sont soumis à un stress oxydatif, les RO conduisent à des altération membranaires et par conséquent une hémolyse (bureau et al . 2005)

Dans le présent travaille, nous nous sommes intéressés à évaluer l'effet protecteur que pourraient avoir les métabolites secondaire de citrus limon sur la préservation de L'intégrité membranaire des GRH à différentes concentration au couredes intervalles de temps différent, les résultats obtenus sont présentés sur la figure 15.

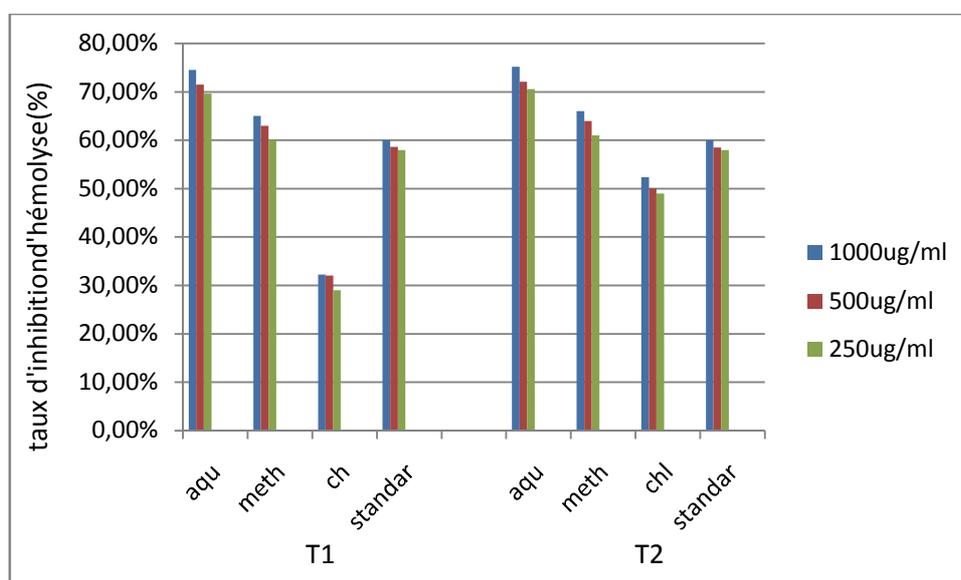


Figure n° 15 : Histogramme des taux d'inhibition d'hémolyse par les extraits des feuilles de *citrus limon*

La figure 15 montre les taux d'inhibition d'hémolyse des différents extraits de feuilles de citrus limon à différentes concentrations en fonction de temps, T1=1H et T1=2H, on remarque que à T1 les taux d'inhibition d'hémolyse les plus élevés sont obtenus avec l'extrait aqueux et méthanol qui ont donné des taux d'inhibition comprises entre 69 et 74% en fonction des concentrations (250ug/ml, 500ug/ml et 1000ug/ml) pour l'extrait aqueux et entre 60 et 64% pour l'extrait méthanol pour les mêmes concentrations ce qui permet de leur conférer un effet antihémolytique, en présence de AAPH, tandis que l'extrait

chloroforme a donné des taux d'inhibition qui ne dépassent pas les 33% (inférieur à celle de standard pour les mêmes concentrats).

À T2, les pourcentages d'inhibition d'hémolyse sont un peu plus élevés par rapport à celles obtenus à T1 mais l'extrait chloroforme reste toujours le moins puissant à exercer un effet antihémolytique.

On constate d'après les résultats que l'effet antihémolytique des extraits de feuilles de citrus limon est dépendant de la dose, de solvant utilisé ainsi que de la durée d'exposition des GRH à l'extrait.

L'ajout du AAPH fait augmenter la perméabilité de la membrane érythrocytaire et la décomposition thermique de ce dernier produit un radical libre qui attaque les lipides de la membrane induisant par la suite la peroxydation lipidique et la libération de l'Hb au milieu extracellulaire (hémolyse) mais il existe des substances qui exercent une activité antihémolytique telles que les flavonoïdes (**Trabsa., 2015**) donc on peut dire que la protection des (GRH) par les extraits des feuilles de citrus limon pourrait être attribuée à la richesse de cette plante en polyphénols (les flavonoïdes surtout).

L'effet antihémolytique 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 hydroxyl donc induit à la prévention des dommages oxydatifs empêchant ainsi la production d'hémolyse (**Nadour., 2015**).

Puisque notre plante est riche en flavonoïde donc les résultats qu'on a obtenus sont en accord avec (**Verstraeten et al., 2003 ; Ramchoun et al., 2015**) qui ont montré que les flavanols et les procyanidines (classes des flavonoïdes) interagissent avec les groupes 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.

**Con
clus
ion**

Conclusion et perspectives

Les extraits des feuilles de *citrus limon* ont fait l'objet d'une étude basée sur le niveau phytochimique, la capacité antioxydante et l'effet protecteur vis-à-vis des (GRH).

Le criblage préliminaire par des tests colorimétriques a révélé la présence de composés ayant de grande valeur thérapeutique (les composés phénoliques et flavonoïdes). L'effet antioxydant et anti hémolytique ont été évalués.

Les deux tests de l'activité antioxydant ont montré que les extraits étudiés possèdent un grand pouvoir antioxydant qui se varie selon le solvant employé et le test effectué, en effet, la capacité antioxydante vis-à-vis de radical DPPH est très importante dans l'extrait méthanolique et aqueux qui ont donné des IC_{50} 10ug/ml et 7,5ug/ml respectivement, et de même pour la capacité chelatrice vis-à-vis de fer ferreux.

Le test de cytotoxicité réalisé sur les (GRH) qui ont été incubées avec les extraits de feuilles de *citrus limon* à différentes concentrations a montré que ces extraits n'ont entraîné aucun effet toxique.

Dans un second temps nous avons évalué un test anti hémolytique par lequel on a montré l'effet protecteur des composés issus de feuilles de citrus limon sur la prévention de l'intégrité membranaire des (GRH) au cours des intervalles de temps différents.

L'ensemble des résultats obtenus de ce travail montre que la plante de citrus limon possède un pouvoir pharmacologique, ce qui supporte son usage traditionnel pour le soulagement de diverses pathologies.

En perspectives, il est souhaitable de réaliser des études in vivo et complémentaires pour comprendre le mécanisme moléculaire et cellulaire des activités biologiques qui sont attribuées aux métabolites secondaires de cette plante.

**Réfé
renc
es
Bibli
ogra**

References bibliographiques

References bibliographiques

Alloca, M., Fiorino, G., Danese, S. (2014). Iron deficiency: the hidden miscreant in inflammatory bowel disease. *15(11):2011-9.*

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

Athamena, I., Chalghem, A., Kassah-Laouar, S., Laroui et S. Khebri. (2010). Activity anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* l. s. *lebanes science journal.11 :76p.*

Badiaga, M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p

Barnes, P.J.(1998). **Antiinflammatory action of colonic corticoids:** Molecular mechanism. *Clinical science,97:557-572.*

Bessada, S.M.F., Barreira, J.C.M., Oliveira, M.B.P.P. (2015). Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications : A review. *industrial crops and products,76:604-615.*

Blancke R. 2001. Guide des fruits et légumes tropicaux. Bien être et beauté avec les essences. Ed : De Vecchi, Paris. Pages 11,15, 61 et 111.

Blain, J and Natter, J.(2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Bouزيد, M., Yahia, M., Abdeddaim1, M.C., Aberkane et A. Ayachi. (2010) .évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'aubépine monogyne, 65p.

Bureau, A., Lahet, J.J., Lenfant, F., Bouyer, F., Petitjean, M., chaillot, B., Freyesz, M.(2005). optimization of a mode of red blood cells for the study of anti-oxidant rungs, in terms of concentration of oxidant and phosphate buffer. *Biomed .pharmacother .59:341-344.*

Celi, J., Reny, J-L, Perrier, A, Samii, K.(2011). Anémie ferriprive, inflammation ou mixte, comment orienter le diagnostic ? *Revue médecine suisse, 2018-2023*

Cardeñosa, V., Barreira JC, Barros L., Arenas-Arenas FJ, Moreno-Rojas JM., Ferreira IC. (2015).Variety and Harvesting Season Effects on Antioxidant Activity and Vitamins Content of *Citrus sinensis* Macfd. 20(5):8287-30

Frankel, E.N and Mayer,A.S.(2000).The problem of using one-dimensional method to evaluate multidimensional food and biological antioxidants, *Journal of science and food agriculture*, 80:1925-1941.

Chiang,H .,Wen,P .,Lu,F.(1994).Xanthine oxidase inhibitions from the leaves of *alsophila spinulosa* (Hook)Tryon. *Journal of enzyme inhibition*, 8(1):61-71.

Dubois C.(2006). Les arbres fruitiers. Ed :rustica , paris. 127 p)

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.

Falleh, H., Ksour, R., Chaieb, K., Karraya-Bouraoui,N., Terabelsi,N., Boulaaba , M and abdely, C. (2008).Phenolic composition of *synara cardunculus* L .orangs and their biological activities. *Comptes rendus biologies*, 331:372-379.

Ferrazzano,F.G., Amato,I,Ingenito,A.,Zarrelli,A.,Panto,G.,Pollio,A.(2011). Plant polyphenol and their anti-cariogenic proprieties. (16):1486-1507.

Ford R.A., Hawkins, D.R., Mayo B.C., Api A.M. (2001).The *in vitro* dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, p39, 153-162.

Frutos, P., Hervás, G.,Giráldez , F and A , Mantecón.(2004). Review: Tannins and ruminant nutrition.*Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (2):191-202 p.

Guillaume,L. (2007).Elasticité de squelette de globules rouge humain-une étude en pince optique .thèse de doctorat, université de paris 4, p17

Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H Y (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3, 43-53

Iwamas, M., Nito, N., and Ling, J.T. (1988). Intra- and intergeneric hybridization in the orange subfamily, Aurantioideae. *In: Goren R. and Mendel K. (eds.) Proc. Int. Soc. Citricult.* 1. Balaband, Rehovot, Israel and Margrat Publishers, Weikersheim, Germany, pp. 123–130

Jaureguirry, S. (2015) .Rétention et "pitting" splénique des globules rouges au cours du paludisme aigu traité par dérivé de l'artémisine, université pierre et marie 2015 page 54

Kalaiselvi, V. et Vidhya, R. (2015). In vitro membrane stabilizing activity of different extracts of *bahinia tomentosa* (L) leaves. *World journal of pharmaceutical research*, 4(4):1700-1715.

Kanoun, K. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honnaine) Thèse de magister. Université Aboubeker Belkaid de Tlemcen. 96 p.

Kharazi, H., Vaisi, R.A., Rayani, A., Rahimi, Z., Tavalani, H., Aminian, M., Pourmtabbed, T. (2008) . Association between enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein genotypes in Alzheimer disease. *Clinical biochemistry* 41:932-936.

Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H. W and Kong, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanism. *Journal of Pharmacology .Science*, 96, 229-254

Koudaly, S., benemasaoud., left, D., A. Essaqui, A., zerbouti, M., AZZI, M., benaissa, M. (2014). Study of antioxidant activity and anticorrosion of the methanol extracts of dwarf palm leaves (*chamaerops humilis* L.) from morocco. 5(3)887-898

Le K, Chiu, F and Ng, K. (2006). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, 353-363

Losada, S., Barreiro, a.b., Bravo, C. (2017). Free radicals and polyphenols: the redox chemistry of neurodegenerative disease, *euro pen journal of medicinal chemistry*. 133:379, P381.

Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed presses poly technologiques et universitaires romandes*

Maksimovic, Z., Maleni, D., Kovacevi, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extract. *Bio resource technology*, 96(8):873-877.

Mannargadoo-Catin,M.,Ali-Cherif,A/,Pougnas,J.L.and Perrin, C. (2016).Hemolysis by surfactants.Areview.Advances in colloid and interface science, 228:1-16.

Meguel,M.G.(2010).Antioxidant and anti-inflammatory activities of essentials oils: a short review. 15:9252-9287.

Menichini,F.,Loizzo.M.R. ,Bonesi,M.,Conforti,F.,DeLuca,D.,Statti,G.A.,Cindio,B.,Menichini, F and Tundis,R.(2011).phytochemical profile,antioxydants,anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydro alcoholic extract form *citrus medica L* cv diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food and chemical toxicology*, **49**,1549-1555.

Mendonça, R., Silveira, A.A., Conran, N.(2016).Red cell DAMPs and inflammation ,65(9) :565-78

Naczka,M.,et Shahidi,F.(2004).Extraction and analysis of phenolic in food. Journal of chromatography A. **1054**, 95-111

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

Nicolas, J., François,F., Florence, C and Jean ,T.(2001).Immunologie clinique et allergologie. Asperine et AINS : Intolerance et allergie .Johen Libeyeurotext.2001:55-58.

Noah,T.A., Zachary, M. W and Randy, J. N.(2012).Inflammation: mechanism, cost and natural variation. The Annual. Review of .ecologyand, evolution and system.43:385-406.

Okoka,T .and Ere,D (2012).Antioxidant activities of Solenostemon monostachyus leaf extract using in vitro methods .ScientificResearch and Essays, 7(6):621-626.

Padrini, P et Lucheroni, M.T. (1996). Le grand livre des huiles essentielles –guide pratique Pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences. Ed: De Vecchi, Paris. Pages 11,

Park,P .J .,Jung,W.KJ .,Nam,K.S.,Shahidi,F.,Kim,S.K.(2001),purification and characterization of ant oxidative peptides from protein hydrolysate of lethin free egg yolk. Journal of the American oil chemists society,78(6):651-656

Power, SK ., smuder, AJ.,Kvarisan, H.(2010) .experimentale guide line for stadies designed investgate the impact of antioxidantssupplementation on exercuce performance international journal of spot nutrition and exircice metabolism , 20 :12-14)

Ramchoun,

M.,Sellam,K.,Harnafi,H.,Alem,C.,Benlyas,M.,Khallouki,F.,Amerani,S.(2015).Investigation n of antioxidant and ant hemolytic proprieties of thymus satureioides collected from tafilalet region , south –Est of morocco. Asian pacific journal of tropical biomedicine ,5(2):93-100.

Riazl,T.,Abbasi,M.A.,Rehman,A.U.,Shahzadi,T.,Ajaib,MandKhan,K.M.(2012). Phytochemical screenings, free radical scavenging , antioxidant activity and phenolic content of Dodonaea viscosa Jacq. Journal of the serbrian chemical society ,77(4):423-435.

Ribéreau-Gayon,P. (1968).Notion général sur les composes phénoliques .In « Les composés phénoliques des végétaux ».Ed.Dunod.1-27.

Sathiya,J.,Satitha,J.,Ananthalakshmi,R., Rajkumari,S., Ramesho, MandKrishenan,R. (2015).Enzymatic antioxidants and its role in oral disease, Journal of pharma bio allied science,7(2):331-333.

Sharma, V.,Singh, M.(2013).In vitro ant arthritic and hemolysis preventive : membrane stabilizing efficacy of ethanoic root extract of operculina turpethum.World journalof pharmacy and pharmaceutical sciences,2(1):302-312.

Krishenan, R.(2015).Enzymatic antioxidants and its role in oral disease, Journal of pharma bio allied science,7(2):331-333.

Sidana, J., Saini,V.,Dahiya,S, Naim, P., Bala, S. (2013). A review on “citrus-the boon of nature”college of pharmacy, MM university mullana(Ambala).133207.India.18 (2):20-27.

Smith,R.L.,Cohen,S.M.,Doull,J.,Feron,V.J.,Goodman,J.I.,Marnet,L.J.,Portoghese,P.S., Waddell,W.J.,Wagner,B.M.(2005). A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. Food chem.toxicol, 43:345-363

Sun,V.,Wang,S.,Zhao,W.,Gwen,H .G,Hongxun,T.,Lu,J .J.,Wang,Y.,Chen,X.P.(2016).chemical constituents and biological research on plants in the genus curcuma .4(20):9-16.

Tawaha, K., El-Elimat ,T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Nielsen ,S.J., Wheaton ,W.D., Falkinham ., Oberlies ,NH. (2007)Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project .**21(12):1121-31.**

Vania, M., nakajima, G., abriela,a., julianaalves,m. (2014).Citrus bioactive phenolic: role in the obesity treatment volume 59(2), 2p

Verdan A M, Wang H C, García C R, Henry W P and Brumaghim J L (2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105, 1314-1322.

Vercauteren, J., Cheze, C et Triaud,J.(1998).Polyphénols 96.Ed,INRA.France 289p.

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.

Verykokidou, Vand Voyo,E.C. (1986).Methylated flavones from teucriumplolium. *Plantamedica*, 5,343-432

Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., Heinonen, M. (2005). Effect of plant phenolic on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. 53(22):8492-

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*,34:84-92
37)

Wong, S.P, Leong, L.P, William Koh, J.H. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. 99: 775-783

Yarnell, E. (2007). Plant chemistry in veterinary medicine: Medicinal constituents and their mechanisms of action. In: Veterinary herbal medicine, ed. Mosby Elsevier, St Louis, p. 159-182.

Xinmiao, L.V., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., Xiao, C., Lu, C., Liu, Y. (2015). Citrus fruit as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(9):2-14

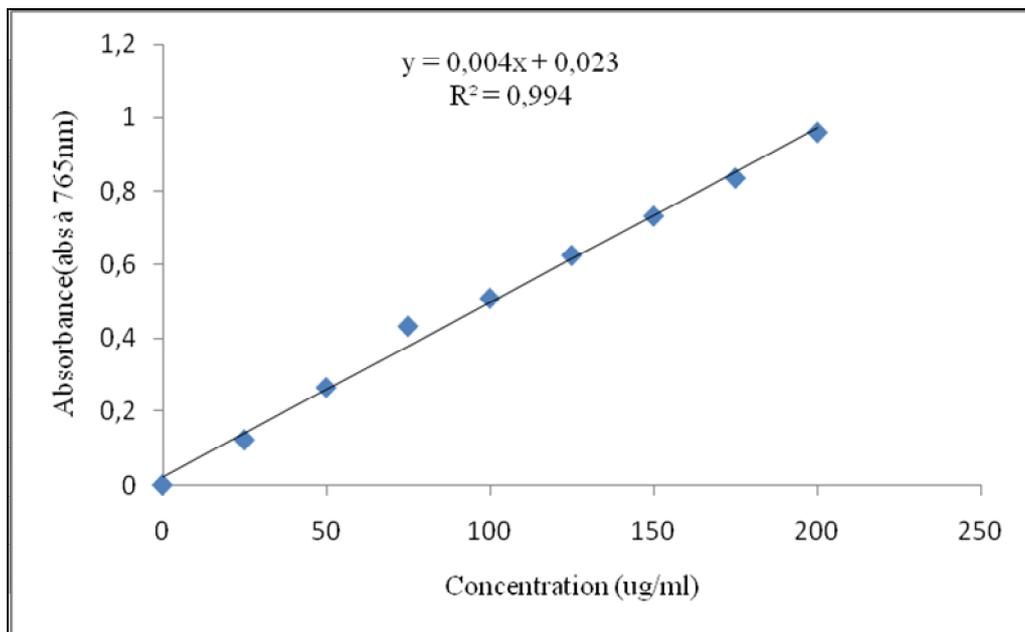
Zang, Y., Giboulot, A., Zivy, M., Valot, B., Jamet, E., Alenne, C. (2011). Combining various strategies to increase the coverage of the plant cell wall glycoproteome. *Photochemistry Elsevier*, 72(10):1109-23.

Ann

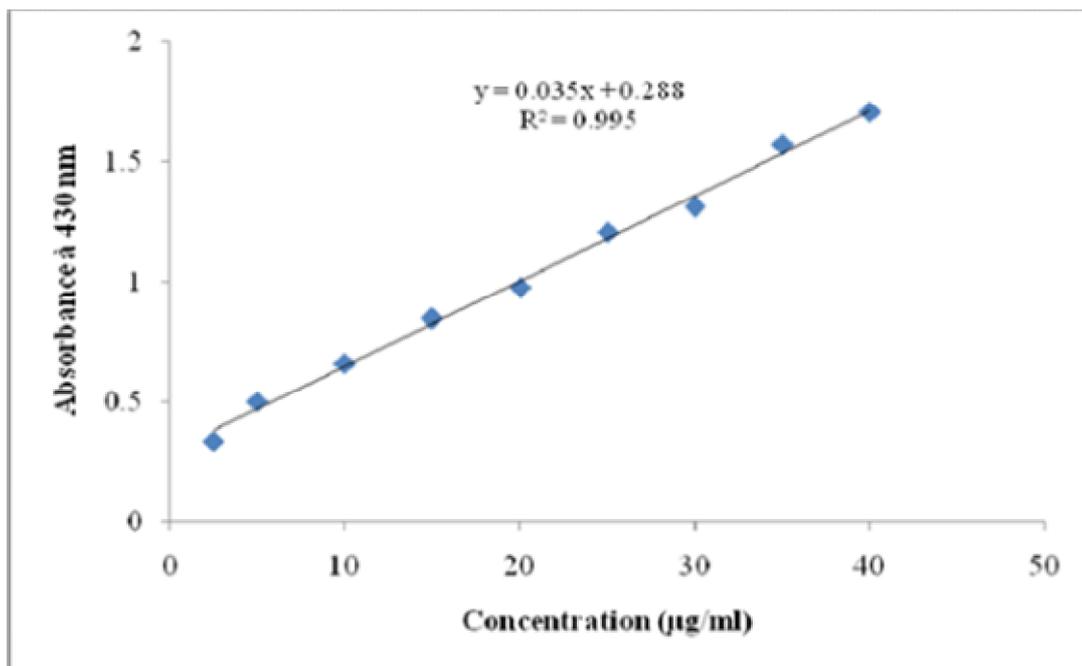
exe

s

Annexe 1 : Courbes d'étalonnages utilisés pour la détermination des taux de phénols totaux et flavonoïdes dans les extraits des feuilles de *citrus limon*.



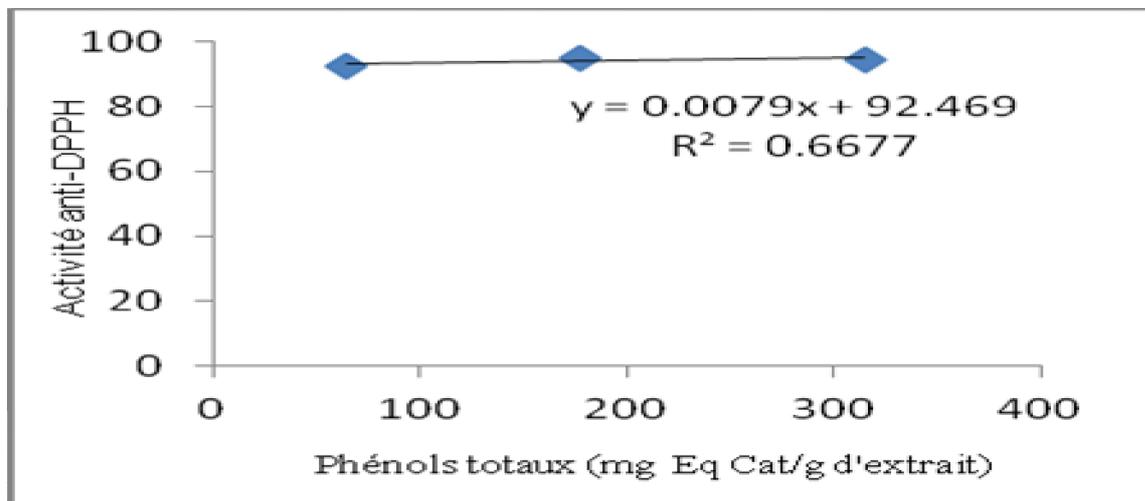
1. Coube d'etalonnage avec la catéchine pour le dosage des phénols totaux.



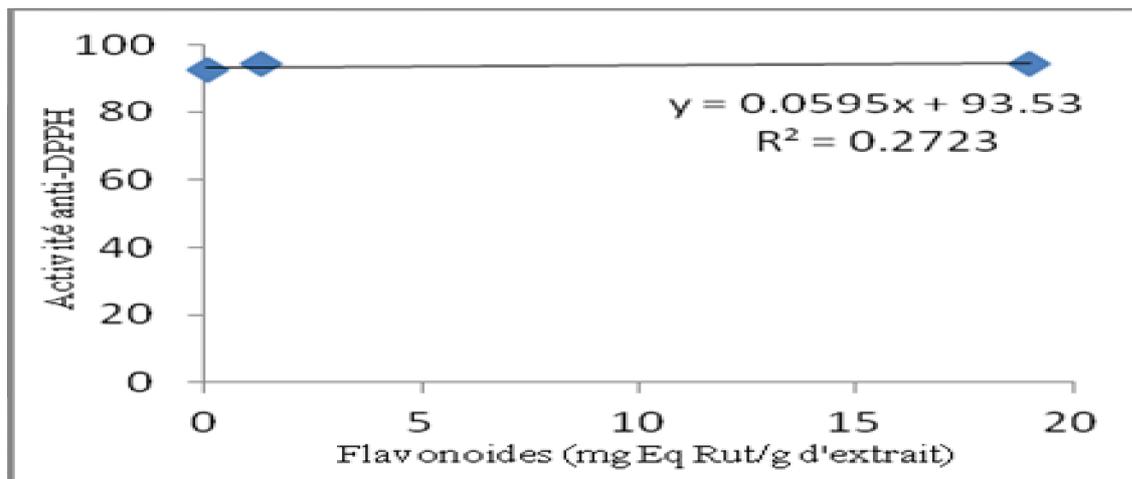
2. Courbe d'étalonnage avec la rutin pour le dosage des flavonoïdes.

Annexe 2 : Courbes de corrélation.

Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-DPPH :

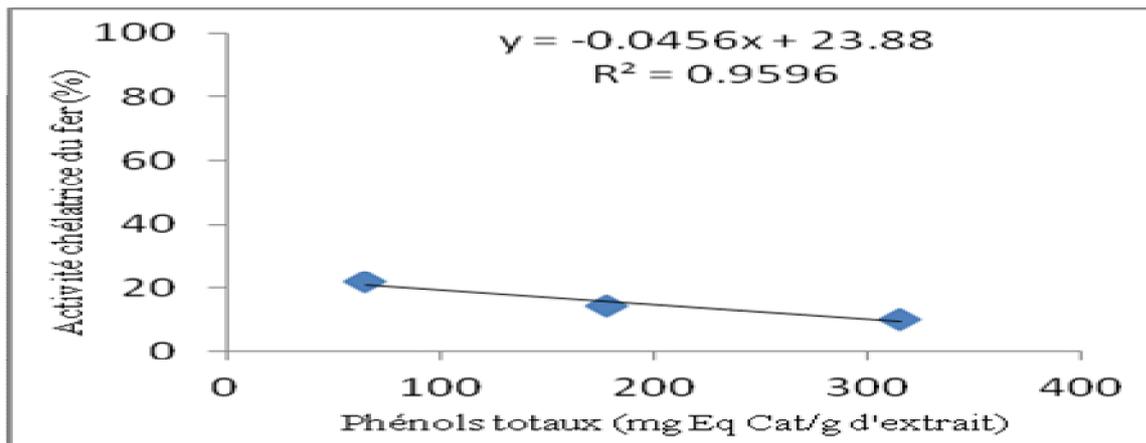


- Courbes de corrélation entre le taux en phénols totaux et l'activité anti-DPPH des extraits de feuilles de *citrus limon*.

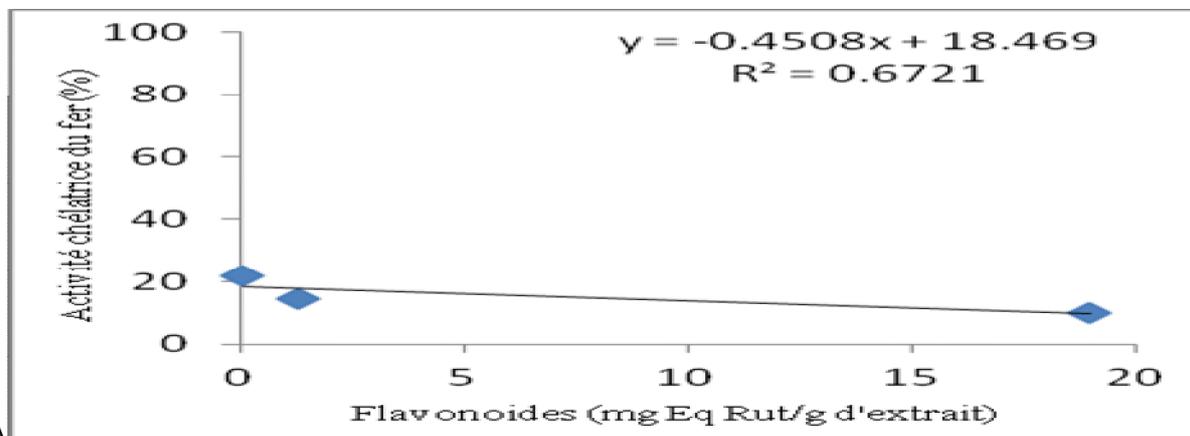


- Courbes de corrélation entre le taux flavonoïdes et l'activité anti-DPPH des extraits des feuilles de *citrus limon*.

Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité chélatrice du fer ferreux :



- Courbes de corrélation entre le taux en phénols totaux et l'activité chélatrice des extraits des feuilles de *citrus limon*.



A

B

- Courbes de corrélation entre le taux en flavonoïdes et l'activité chélatrice des extraits des feuilles de *citrus limon*.

Résumé :

Le *Citrus limon* connue sous le nom citron est une plante de la famille des rutacées, largement utilisée en médecine traditionnelle à l'échelle mondiale et comme produit alimentaire et cosmétique. Dans le présent travail trois extraits ont été préparés, à partir des feuilles de cette plante : méthanolique, chloroforme et aqueux. L'estimation quantitative par la méthode colorimétrique des flavonoïdes et des polyphénols totaux auxquels sont attribuées les diverses activités biologiques a montré que les extraits sont riches en ces composés. L'évaluation de pouvoir antioxydant qui a été réalisé en utilisant les deux tests : méthode de piégeage de radicale libre DPPH et la chélation de fer ferreux a indiqué que les différents extraits ont montré une bonne efficacité antioxydante. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée par la mise en contact des globules rouges humaine avec les extraits issues des feuilles de citron limon, le test de cytotoxicité qui a été réalisé à des concentrations comprises entre 100 µg/ml et 1000 µg/ml des différents extraits a montré que ces extraits n'exercent aucun effet toxique. Le test anti hémolytique a indiqué que les extraits de citron limon exercent un effet protecteur sur la membrane érythrocytaire contre le stress oxydant induit par l'AAPH.

Mots clés : Antioxydants, Activité anti-hémolytique, *Citrus limon*.

Abstract:

Citrus lemon, known by the common name lemon, is a medicinal plant from the *rutaceae* family, widely used in traditional medicine across the world as a food and cosmetic product. In this work, three extracts were prepared from citrus lemon leaves: methanolic, aqueous and chloroform. The colorimetric estimation method of flavonoids and total phenols showed that these extracts are rich in these compounds. Evaluation of antioxidant power was performed using two methods: method of DPPH free radical trapping and iron chelation. This evaluation indicated that these extracts showed a high antioxidant power. The anti-inflammatory activity was carried by contacting the (HRC) red cells with various extracts. The toxicity test on (HRC) shows that extracts of citron lemon leaves do not exert any toxic effect at concentration between 100 µg/ml and 1000 µg/ml. The anti-hemolytic test indicated that extracts of citrus lemon leaves exert a great protection of the erythrocyte membrane against oxidative stress induced by AAPH.

Key words: Antioxidants, Anti-hemolytic Activity, *Citrus lemon*.