

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

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



Réf :

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

MASTER

Spécialité : Biochimie physiopathologique

Thème

**Effet préventif de pathologies hémolytiques liées au
stress oxydatif des extraits de l'écorce de
*Fraxinus angustifolia***

Présenté par : CHALAL Farida & CHIBOUT Meriem

Soutenu en: 22 Juin 2017 à 09h00

Devant le jury composé de :

M^{me} DEBBACHE-BENAIIDA N.	M.C.B, UAMB	Présidente
M^{me} AYOUNI K.	M.A.A., UAMB	Encadreur
D^r LESLOUS M.	D^r, CTWS	Co- promoteur
M^{me} BENMESSAOUD-KARTOUT. Y	M.A.A., UAMB	Examinatrice

Année universitaire : 2016 / 2017



Remerciements

*On remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*On tient particulièrement à remercier notre promotrice, **M^{elle}.AYOUNI Karima**, enseignante à l'université de Bejaia pour avoir accepté la charge d'être rapporteuse de ce mémoire, on la remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consentie durant la réalisation de ce travail. Ce dernier est un témoignage de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et notre respect.*

*On tient aussi à remercier vivement le Directeur du **Centre de transfusion sanguine (CTSW)**, Dr **LESLOUS Mourad** qui a accepté de nous accueillir en stage au sein de son organisme. On voudrait remercier également tout le personnel du centre pour leur gentillesse et leur soutien.*

*Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres de jury : **M^{me} DEBACHE. N** qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de président de jury et **M^{me} BENMESSAOUD-KARTOUT. Y.** qui a accepté d'examiner ce travail.*

*Nous tenons aussi à exprimer notre reconnaissance à **M^{me} ATMANI. D.** de nous avoir accueillies dans le Laboratoire de Biochimie Appliquée, pour ses conseils avec beaucoup de sympathie.*

*Notre reconnaissance va également à **M^{me} RAHMANI M.** et la doctorante **M^{me} YOUS F.**
Pour leur aide et leur gentillesse.*

Un remerciement particulier pour l'ensemble des membres de laboratoires de Biologie Moléculaire, de la Biologie Physico-Chimique et techniques d'analyses Chimiques.

Nous ne pourrions achever ce mémoire sans exprimer notre gratitude à tous les enseignants pour leur dévouement et leur assistance tout au long de nos études universitaires.

On adresse, enfin et surtout, notre plus profonde gratitude et tout notre amour à nos familles, qui ont su nous faire confiance et nous soutenir en toutes circonstances, ainsi qu'à tous nos proches amis qui nous ont toujours soutenus et encouragés même dans les périodes difficiles.

*Merci**

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A la mémoire de mes parents, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère sœur : Katia, mes chers frères : Massi et Jugo, aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve envers vous, Puisse ce travail être la récompense de vos soutiens moraux et sacrifices.

Que Dieu le tout puissant vous préserve et vous procure santé et longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler.

A tous mes cousins et cousines.

A mon binôme : Meriem.

Ainsi qu'à tous mes amies et camarades.

HOUDA

Dédicace

Je dédie ce travail

*A mes très chers parents « **Louiza et Meheni** », aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte.*

Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements. Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation.

Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur !

*A mes très chères sœurs « **Karima Kouka et Souhila** » et mon frère **Omar**, pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de la rédaction de ce travail.*

A ma très chère amie Houda et mon binôme dans ce travail, merci d'être toujours là pour moi, merci de m'avoir supportée, et d'être ma sœur avant d'être mon amie. Tu me donnes toujours confiance en moi que Dieu te bénisse, te donne la force et le courage.

*A ma chère grand-mère « **Ghnima** » qu'elle est si fière de moi aujourd'hui.*

*A tous mes nièces et neveux « **Nour el Houda, Nariméne louize, Ines, Anis et Adem** ».*

*A toutes mes amies avec lesquelles j'ai travaillé au laboratoire « **Nouna Malika Souhila et Ryma** » que Dieu vous protèges.*

*A toutes mes amies et collègues « **Houda, Kahina, Sylia et Leila...** ».*

Meriem.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Sommaire

Introduction 01

I- Synthèse bibliographique

I-1-Les érythrocytes 02

I- 2- Hémolyse..... 03

II-2-1- Hémolyse physiologique 03

II-2-2-Hémolyse pathologique 03

II-2-2-1-Hémolyse d'origine corpusculaire 03

II-2-2-2- Hémolyse d'origine extra corpusculaire 03

I-3 Hémolyse liée au stress oxydatif 04

I-3-1 Le Stress oxydatif 04

I-3-1-1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO_s)..... 04

I-3-1-2 Le mécanisme d'hémolyse par oxydation des érythrocytes..... 05

I-3-1-3 La peroxydation lipidique 05

I-3-1-3-1-Les produits de la peroxydation lipidique 05

I-3-2-Les antioxydants 05

I-3-2-1- Le système de défense enzymatique..... 06

I-3-2-2- Le système de défense non enzymatique 07

I-4 - Les Plantes médicinales 07

I-5 -*Fraxinus angustifolia* 09

I-5-1- La description..... 09

I-5-2 -L'utilisation et intérêt pharmacologique ... 10

I-5-3- La composition phytochimique 10

II- Matériel et méthodes

II -1- Matériel 13

II -1 -1-Appareillage et produits chimiques 13

II-1-2-Matériel végétal	14
II-1-3-Echantillons du sang	14
II-2-Méthodes	14
II-2-1-Préparation des extraits éthanoliques et aqueux de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> 14	
II-2-1-1 Extraction éthanolique	15
II-2-1-2-Extraction aqueuse (préparation de décoction)	15
II-2-2-Dosage des contenus phytochimiques	15
II-2-2-1-Détermination de la teneur en phénols totaux	15
II-2-2-2-Détermination de la teneur en flavonoïdes	16
II-2-2-3-Détermination de la teneur en tannins	16
II-2-3 Evaluation de l'activité hémolytique et anti hémolytique des extraits éthanoliques et aqueux de l'écorce de <i>F. angustifolia</i>	17
II-2-3-1-Préparation des suspensions érythrocytaires	17
II-2-3-2-Hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)	17
II-2-3-3-Effet des extraits de <i>F.angustifolia</i> sur les suspensions érythrocytaires	17
II-2-3-4-Effet anti hémolytique des extraits aqueux et éthanoliques d'écorce de <i>F. angustifolia</i>	18
II-2-3-5-Estimation de la peroxydation lipidique	18
II-3-Analyse statistique	19

III- Résultats et discussion

III-1-Résultats et interprétations	20
III-1-1-Taux d'extraction	20
III-1-2-Dosage des contenus phénoliques des extraits de <i>F.angustifolia</i>	20
III-1-3-Evaluation de l'effet hémolytique et taux des malondialdéhydes induits par le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	21
III-1-4-Evaluation de l'effet hémolytique des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i>	23
III-1-5-Estimation des taux des MDA en présence des extraits de l'écorce de <i>F.angustifolia</i>	24
III-1-6-Evaluation de l'effet anti hémolytique des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i>	25
III-1-7- Estimation des taux des MDA produits de la peroxydation lipidique induite par H ₂ O ₂ après traitement des érythrocytes par les extraits de l'écorce de	

<i>F. angustifolia</i>	26
III-2- Discussion	28
Conclusion et perspectives	34
<i>Référence bibliographiques</i>	36
<i>Annexe</i>	

Liste des abréviations

Liste des abréviations

·OH : Radical hydroxyle

AAPH : 2,2'-Azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride .

AGPI : Acide gras polyinsaturée

ANOVA : Analyse de la variance

BSA : Albumine de sérum bovine

CWTS : Centre de transfusion sanguine

ED : Eau distillée

Eq.A.G. : Equivalent acide gallique

Eq.A.T. : Equivalent acide tannique

Eq.Rut. : Equivalent Rutine

EROs : Espèces réactives de l'oxygène

G6PD : Glucose 6 phosphate déshydrogénase

GR : Globule rouge

GSH : Glutathion réduit

GST : Glutathion S-transferases

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

Hb : Hémoglobine

IAA : d'indole-3- acide acétique

LOO· : Radicale pyroxyde

MDA : malondialdéhyde

MetHb : méthémoglobine

OH : groupement hydroxyle

POX : peroxydase de gaïacol

S.E : Suspension érythrocytaire

SEM : Somme des écarts moyens

SOD : Superoxyde dismutase

Liste des Figures

Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1	Photographies originales de l'arbre et des écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i>	08
Figure 2	Photographie originale de l'écorce et la poudre de <i>Fraxinus angustifolia</i>	13
Figure 3	Effets hémolytiques induits par différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	20
Figure 4	Taux de MDA induits par différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	21
Figure 5	Effet hémolytique de l'extrait éthanolique (A) et de l'extrait aqueux (B) de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> :	22
Figure 6	Taux des malondialdéhydes produits en présence de l'extrait éthanolique (A) et de l'extrait Aqueux (B) d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	23
Figure 7	Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique (A) et de l'extrait Aqueux (B) de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> de l'hémolyse	24
Figure 8	Taux des MDA produits en présence de l'extrait éthanolique (A) et l'extrait Aqueux (B) de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	25

Liste des Tableaux

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau I	Composition de la membrane de l'érythrocyte	02
Tableau II	Les types des espèces réactives oxygénées et leurs sources	04
Tableau III	Effet anti hémolytique de quelques plantes médicinales	08
Tableau IV	Principales classes des composés phénoliques	12
Tableau V	Différents appareils et produits chimiques utilisés	13
Tableau VI	Teneur en composés phénoliques dans les extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i>	20
Tableau VII	Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par H ₂ O ₂ après traitement des érythrocytes par les extraits de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	25
Tableau VIII	Pourcentage d'inhibition des taux de MDA induite par H ₂ O ₂ après traitement des érythrocytes par les extraits de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	27

Introduction

Malgré l'amélioration remarquable des conditions de vie durant ces dernières décennies, l'anémie demeure un problème majeur de santé publique en affectant la croissance physique, le développement cognitif, la reproduction et la capacité de travail physique, ce qui aboutit à une diminution de la performance humaine. Elle a été classée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme l'un des dix problèmes les plus sérieux du monde moderne (**Agrwal et al., 1991**).

L'hémolyse pathologique se présente le plus souvent comme une anémie lorsque l'érythrocytose ne peut pas correspondre au rythme de la destruction des globules rouges, elle se définit comme l'élimination ou la destruction exagérée précoce des globules rouges. Elle peut être héréditaire ou acquise, dont ces dernières ont principalement des causes immunologiques, infectieuses et même toxiques citant les radicaux libres (**Gurpreet Dhaliwal et al., 2004**).

Depuis quelques années, le monde des Sciences Biologiques est envahi par un nouveau concept, celui de stress oxydant, c'est-à-dire une situation où la cellule ne peut plus contrôler la présence excessive des radicaux libres (**Berger, 2006**). Cependant, des molécules dites anti-oxydantes interviennent selon différents modes d'action afin de limiter la production des radicaux libres, elles constituent donc un mécanisme de défense pour l'organisme. Certains antioxydants existent de façon endogène dans l'organisme, d'autres sont assimilables par voie exogène, qu'ils soient naturels ou synthétiques (**Haleng et al., 2007**).

Les remèdes naturels par les plantes médicinales, ont été pendant longtemps le principal, voire même l'unique recours à la tradition pour soigner les pathologies depuis XIX siècle. Ces plantes ont l'aptitude de synthétiser de nombreux composés appelés métabolites secondaires et constituent donc un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique, possédant un large éventail d'activités biologiques (**Jean et al., 1983**).

Cette thématique a pour objectif d'évaluer le potentiel d'une espèce utilisée traditionnellement pour le traitement de pathologies à caractère oxydatives. Ceci par une étude phytochimique, ainsi qu'une investigation des activités anti-hémolytiques et anti-péroxydantes des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Cette étude a pour but de renforcer la base scientifique justifiant l'utilisation de cette plante dans le traitement traditionnel et la prévention de pathologies liées au stress oxydatif.

Partie bibliographique

I-1-Les érythrocytes

L'érythrocyte, hématie ou globule rouge (GR) est une cellule anucléée unique, avec un cytoplasme se composant de 95% d'hémoglobine. Cette cellule présente de nombreuses propriétés attribuables aux protéines et aux lipides de la membrane, et hautement spécialisée pour le transport des complexes d'oxygène à partir des poumons au reste du corps (**Girasole et al., 2012 ; Kozlova et al., 2012**).

Smith, J.E, a rapporté l'architecture de la membrane des érythrocytes qui est caractéristique de toutes les membranes vivantes dans l'interposition d'une bicouche lipidique et de cytosquelette, décrite dans le tableau I

Tableau I : Composition de la membrane de l'érythrocyte

Domaine lipidique			Cytosquelette
Nature	Composition	Localisation	
Lipides	Cholestérol	Entre les deux moitiés ou feuillet de bicouche lipidique (Bretscher et al., 1972 ; Gordesky et al., 1973).	Le cytosquelette érythrocytaire se compose de plusieurs protéines qui forment un réseau filamenteux sous la bicouche lipidique. Le réseau est composé de spectrine, Ankyrine et actine. Les protéines de cytosquelette interagissent avec les protéines intégrales et les lipides de la bicouche pour maintenir l'intégrité de la membrane. (Lux, 1983).
	Phospholipides	Asymétriquement distribuée (Bretscher et al., 1972 ; Gordesky et al., 1973).	
	Glycolipides, Phosphatidylcholine, Sphingomyélines	Dans la moitié externe de la bicouche lipidique (Borochov et al., 1977).	
	Phosphatidyl-inositol, Phosphatidyl-ethanolamine et phosphatidylsérine	Dans la couche intérieure faisant face au cytoplasme (Borochov et al., 1977).	
Protéines	Récepteurs, Transporteurs et Enzymes.	S'étend depuis l'intérieure de l'érythrocyte vers l'extérieur. (Steck et al., 1974).	

I-2-Hémolyse

On distingue différents types d'hémolyse regroupée en deux catégories :

II-2-1-Hémolyse physiologique

L'hémolyse est caractérisée par la destruction prématurée par éclatement des globules rouges et la diffusion de l'hémoglobine du stroma dans le milieu extérieur. C'est un phénomène qui touche les hématies à la fin de leur vie dont la durée moyenne est de 120 jours, ce phénomène physiologique peut être intra ou extravasculaire. La phagocytose est réalisée par les macrophages qui portent sur les GR dont le vieillissement s'est traduit par : soit des modifications biochimiques, morphologiques ou de la plasticité, soit par le phénomène oxydatif, ou encore des troubles des échanges ioniques (**Bratosin et al., 1998**).

II-2-2-Hémolyse pathologique

C'est la destruction précoce et exagérée des GR sous l'effet d'un processus hémolytique qui peut être d'origine intrinsèque (hémolyse corpusculaire) ou extrinsèque (hémolyse extra corpusculaire).

II-2-2-1 Hémolyse d'origine corpusculaire

L'hémolyse corpusculaire est due soit à des anomalies de la membrane par la perte de sa déformabilité ou bien anomalies de sa perméabilité entraînant une fragilité accrue des GR (**Morton et al., 1962**), soit à des anomalies d'hémoglobines (y compris les syndromes thalassémiques et la drépanocytose), à une déformation des GR suite à la modification de la composition lipidique de leur membrane ou bien à des anomalies enzymatiques dues à un déficit en G6PD qui peuvent passer longtemps inaperçus et n'être découverts qu'en cas de stress oxydatif (**Wajcman, 2006**), un déficit en pyruvate kinase par défaut de régénération d'ATP (**Zanella et al., 2005**) ou encore un déficit en 5' pyrimidine nucléotides (**Marinaki et al., 2001**).

II-2-2-2-Hémolyse d'origine extra corpusculaire

L'hémolyse d'origine extra corpusculaire peut être d'origine immunologique ; allo immune caractérisée par la présence des agglutinines irrégulières et des anticorps naturels, ou anticorps d'hétéro-immunisation préexistants à toute exposition à des GR hétérologues, auto immunes qui est caractérisé par une hémolyse liée à la présence d'auto-anticorps dirigés contre les antigènes de la membrane érythrocytaire (**Valent et al., 2008**) ou bien d'origine toxique tels que les toxiques industriels, médicamenteux, animaux, végétaux et physiques (**Streichman et al., 1998**).

I-3-Hémolyse liée au stress oxydatif

I-3-1-Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un état caractérisé par un déséquilibre entre la production d'éléments oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme d'un individu, ou un excès d'espèces réactives mal contrôlé qui favoriserait une maladie ou un vieillissement accéléré (Betteridge, 2000).

I-3-1-1-Espèces réactives de l'oxygène (ERO_s)

Les ERO_s sont des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et instables, participant au vieillissement protéique, la peroxydation lipidique et l'altération de l'ADN. Elles peuvent être des radicaux libres ou des espèces oxydantes non radicalaires. A de faibles concentrations, elles jouent plusieurs rôles physiologiques à savoir la signalisation cellulaire, l'apoptose et la fécondation de l'ovule, néanmoins elles sont impliquées dans un nombre considérable de cas pathologiques tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies dégénératives et le diabète (Hare, 2004).

Tableau II : les types des espèces réactives oxygénées et leurs sources

Classification des EROs	
Espèce radicalaires	Espèce non radicalaires
-Anion superoxyde (O ₂ ^{•-}) -Radical hydroxyle (OH [•]) -Monoxyde d'azote (NO [•]) (Goudable et Favier,1997).	-Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) -Oxygène singulier (¹ O ₂) -Acide hypochlorique (H ₂ O ₂)
Les sources des EROs	
Endogène	Exogène
-Par la fuite d'électrons à partir de la chaîne mitochondriale -Par de nombreux systèmes enzymatiques, (Beaudeau et al., 2006)	-Le tabac, la fumée de cigarette (Guerine et al., 2005). Consommation d'alcool, exposition prolongée au soleil, les radiations ionisantes, ainsi les rayonnements UV.

I-3-1-2-Mécanisme d'hémolyse par oxydation des érythrocytes

L'attaque oxydante des EROs dans les érythrocytes est ciblée à l'hémoglobine (Hb) et à la membrane cellulaire. Malgré un système de défense efficace, le fer ferreux dans l'oxyhémoglobine peut transférer un électron à l'oxygène en générant un radical superoxyde, ainsi la transformation de l'hémoglobine en méthémoglobine (**Misra *et al.*, 1972**).

Dans le cas physiologique 3% d'hémoglobines (Hb) est convertie en méthémoglobine (metHb) par jour, et la metHb produite est de nouveau réduite par la méthémoglobine réductase. Cependant, dans les conditions de stress élevé, la production de méthémoglobine est favorisée, ce qui implique la génération de superoxydes (**Rice *et al.*, 1987**). La dismutation enzymatique ou spontanée des radicaux superoxydes donne du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂); la présence des deux crée la possibilité pour la génération des radicaux hydroxyles (·OH), qui ont le potentiel d'initier la peroxydation lipidique (**Mossa *et al.*, 2014**).

I-3-1-3-Peroxydation lipidique :

La peroxydation lipidique consiste à arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons au niveau des acides gras polyinsaturés (AGPI). Ce processus est une réaction en chaîne car le radical pyroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras, qui forme un nouveau radical diène conjugué (**Esterbauer *et al.*, 1992**). Comme elle peuvent créer de nombreuses altérations de la membrane telles que la modification de sa fluidité et l'inactivation de récepteurs ou enzymes (**Dalle-Donne *et al.*, 2006**).

La peroxydation lipidique se déroule en trois phases; l'initiation qui est due à l'attaque d'une espèce radicalaire pour arracher un hydrogène du groupement méthylène en α d'une double liaison d'un (LH), pour former un radical qui se stabilise pour donner un radical pyroxyde (LOO·). La phase de propagation quant à elle consiste à la formation d'un hydroperoxyde en arrachant un hydrogène d'une autre molécule d'acide gras adjacente et en fin la terminaison qui conduit à des aldéhydes parmi eux malondialdéhyde (MDA) (**Michel *et al.*, 2008**).

I-3-1-3-1-Produits de la peroxydation lipidique

On distingue les produits primaires qui sont des radicaux libres formés au cours des phases d'initiation et de propagation de la réaction de peroxydation des lipides. Ces espèces très instables et très réactives sont des composés cytotoxiques susceptibles d'induire des altérations des molécules d'ADN et des protéines (**Niki *et al.*, 2005**) et des produits secondaires issus de la scission des produits primaires de l'oxydation conduisant à la

formation de composés secondaires souvent volatils (aldéhydes, cétones, et acides carboxyliques) (Marnett, 2002).

I-3-2-Antioxydants

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression des oxydants grâce à divers mécanismes de défenses enzymatiques et non enzymatiques, exogènes et endogènes.

I-3-2-1-Systèmes de défense enzymatique

- **Superoxyde dismutase**

La SOD, une métalloprotéine, est la première enzyme de désintoxication qui catalyse la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe 3 types de SODs ; Fe-SOD, Mn-SOD et Cu/Zn-SOD, leur activité peut être identifiée sur la base de leur sensibilité à H₂O₂ (Ahmad *et al.*, 2008; Gill and Tuteja, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011).

- **Catalase**

La catalase est une enzyme qui permet la conversion de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, permettant ainsi la désintoxication des EROs dans l'état d'effort et elle est également importante dans le déplacement de H₂O₂ produit dans les peroxysomes (Ahmad *et al.*, 2008; Gill and Tuteja, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011).

- **Peroxydase de gaïacol**

La POX est une enzyme qui se compose d'indole-3- acide acétique (IAA) ayant un rôle dans la biosynthèse de la lignine et dans la défense contre des efforts biotiques par consommation de H₂O₂ dans l'espace extracellulaire, la vacuole et le cytosol (Gill et Tuteja, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011).

- **Glutathion peroxydase**

Les GPXs sont des isoenzymes qui emploient le GSH pour réduire le H₂O₂. Comme elle ont un rôle dans la peroxydation des lipides (Gill et Tuteja, 2010).

- **Glutathion S-transférase**

Les GSTs sont des protéines cytoplasmiques qui ont le potentiel d'éliminer les composés cytotoxiques ou génotoxiques qui endommagent l'ADN, l'ARN et les protéines (Tuteja, 2010).

I-3-2-2-Systèmes de défense non enzymatique

Il existe différents mécanismes de défense antioxydant non enzymatique qui peuvent être produits par l'organisme (endogène) tel que le glutathion, l'acide urique et la bilirubine ; ou bien apporté par l'alimentation (exogène) comme la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les polyphénols (**Berger, 2006 ; Karou et al., 2005**).

De nombreuses plantes médicinales ont été identifiées et beaucoup d'entre elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prévention et le traitement des maladies exemple *Fraxinus angustifolia*. En effet, le patrimoine végétal est une source très riche d'une diversité de ces métabolites, notamment les composés phénoliques à effet anti-hémolytique et antiperoxydant (**Gill et Tuteja, 2010**).

I-4-Plantes médicinales

La médication par les plantes remonte à la nuit des temps, c'est une thérapie ancestrale et millénaire, il est admis que 80% de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle, du moins pour les soins de santé primaires (**Ennabili et al., 2000 ; Roth and Zaharia, 2004**). Ayant fait l'objet d'investigations, de leur extraits pour leur potentiels protecteurs contre les effets hémolytiques induits par les oxydants. Le tableau ci-dessous présente quelque plantes médicinales.

Tableau III : Effet anti-hémolytique de quelques plantes médicinales

Plantes	Dose et type d'extraction	Oxydant et Erythrocytes utilisés	Effet	Référence
<i>Cydonia oblonga</i> Miller	5 à 10 ml	AAPH, Erythrocytes humains	- Effet anti hémolytique par les extraits. -Effet hémolyse étendue a été induite par les extrais de graines -La pâte et la peau : une source importante d'antioxydants.	(Magalhães <i>et al.</i> , 2009)
<i>Camelia sinensis</i> Thé vert	12,2 pmol/L Extraction aqueuse	AAPH, Erythrocytes humains	-Effet efficace contre l'hémolyse causé après addition d'AAPH, ceci démontre que ces polyphénols sont des antioxydants efficaces pour la protection des membranes biologiques contre l'effet oxydant des radicaux libres	(Lanping <i>et al.</i> , 2000)
<i>Paradicica de Musa</i> (Peau de banane)	1ml	H ₂ O ₂ , Erythrocytes humains	-Une activité antioxydante plus élevée a été rencontré dans la peau de banane non mure. - une diminution des activités du composé phénolique avec la maturation de fruit	(Sundaram <i>et al.</i> , 2011)
<i>Unedo L. d'Arbutus</i>	-Feuille (50, 75, et 100 µg) -Fruit (100,800et 1600 µg) -Extraction Aqueuse	AAPH, Erythroctes humains	-Les deux extraits d'unedo d'A induit une protection de la membrane érythrocytaire contre l'hémolyse induite par AAPH -- -L'extrait de feuille a montré une protection plus élevé que le fruit. -L'hémolyse est faible pour des concentrations plus élevés de chaque extrait.	(Mendes <i>et al.</i> , 2011)
Gymnema sylvestre (tige feuille et fleur)	-50-500 mg/ml -Extraction Aqueuse	H ₂ O ₂ , Erythrocytes humains	-Une réduction de l'hémolyse des RBC,avec augmenter des concentrations en extrait. -L'extrait de feuille a montré l'activité anti-hémolytique la plus élevée.	(James et Mordecai Alewo, 2014)

I-5-Fraxinus angustifolia**I-5-1-Description**

Le frêne oxyphylle ou *Fraxinus angustifolia* est une essence thermophile méditerranéenne de taille moyenne, connu sous le nom de frêne à feuilles étroites ou frêne de désert. C'est un arbre à feuilles caduques qui peut atteindre jusqu'à 40-45 mètres de hauteur, et 1,5 mètre de diamètre. La couronne est dense en forme de dôme, et irrégulière avec des pousses courtes. La face externe de son écorce est de couleur grise, la face interne est de couleur brune et lisse. L'écorce à une saveur amère et sans odeur; les feuilles sont composées de forme ovale, minces, brillantes, vertes et longues avec 3-8 cm de longueur et de 1-1,5cm de largeur. Leurs fleurs sont pollinisées et se développent en automne sans pétales, le fruit est une samare de 3-4cm de longueur aplatie en état de maturation en fin de l'été (Mitchell, 1974; Bobinac, 2010). Les photographies de l'arbre et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont montrées dans la figure suivante :



Figure 1: Photographies originales de l'arbre et des écorces de *Fraxinus angustifolia*

Wallander (2008) a placé l'espèce *Fraxinus angustifolia*, dans la position systématique suivante :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales

Famille : Oléacées

Genre : *Fraxinus*

Espèce : *Fraxinus angustifolia*

Les noms vernaculaires de *Fraxinus angustifolia* sont multiples. Elle est appelée communément frêne à feuilles étroites, oxphylle, en anglais *narrow leaved ash, southern ash*, en arabe *Derdar* et en amazigh *Aslen, Thaslent*. (**Rameau et Dumé, 1989**).

Fraxinus angustifolia est une espèce à large distribution dans les habitats biogéographiques méditerranéens, c'est une espèce indigène du sud et de l'est de l'Europe, sur les côtes méditerranéennes de France, d'Italie, de Grèce et dans les zones côtières du Maroc, de l'Algérie et de la Tunisie (**Wallander, 2008**).

I-5-2-Utilisation et intérêt pharmacologique

L'espèce de *Fraxinus angustifolia* est la plus répandue dans le nord de l'Algérie et conserve ses utilisations traditionnelles (nourriture pour bétail, source principale de bois de chauffage) (**GIFA, 2012**), cette espèce est considérée également d'une grande valeur dans la médecine folklorique comme anti-inflammatoire, antioxydant, diurétique, digestif et astringent. Elle est également utilisée contre les calculs biliaires (**GIFA, 2012**), les hémorragies passives, la goutte, la cholélithiase et surtout contre les fièvres (**Beloued, 1998**). Ses feuilles et samares sont relaxant, sudorifiques et toniques (**Baba-Aissa, 2011**).

Toutes ces vertus thérapeutiques sont fortement liées à sa composition phytochimique. Récemment, la capacité antioxydante des extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été mesurée, et attribuée à une teneur élevée en composés polyphénoliques (**Djeridane et al., 2006 ; Atmani et al., 2009 ;**).

I-5-3-Composition phytochimique

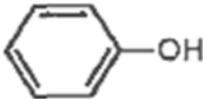
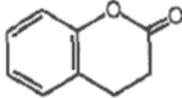
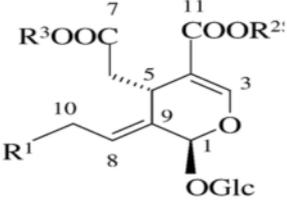
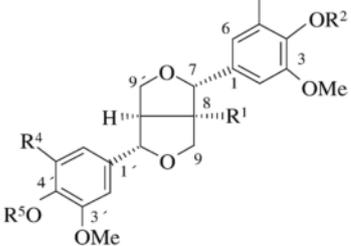
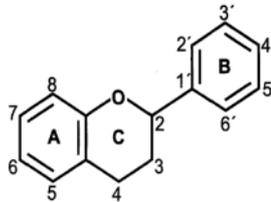
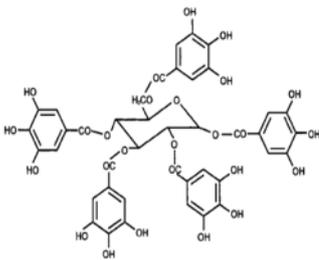
Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires largement distribués chez toutes les plantes, possédant plusieurs groupements phénoliques. Ces composés, sont largement répandus par leur importance physiologique et morphologique considérable.

En effet dans les plantes, les composés phénoliques jouent un rôle important dans la croissance et la reproduction, fournissant une protection contre les agents pathogènes et les prédateurs (**Bravo, 1998**). Ils sont répartis dans presque tous les aliments d'origine végétale, dans les fruits, légumes et les boissons (**Hertog *et al.*, 1993**). Les composés phénoliques présentent une large gamme de propriétés physiologiques parmi elles l'activité antioxydante, due à leur capacité à éliminer les radicaux libres et les dommages dus aux radiations UV, la protection contre les pathogènes, les herbivores (**Parr and Bolwell, 2000**).

Toutes les espèces de *Fraxinus* étudiées ont révélé la présence des coumarines sous forme libre ou sous forme de glucosides (**Hegnauer, 1969 ; Murray *et al.*, 1982**), des flavonoïdes glycosides, des phényléthanoides parmi eux le verbascoside et des secoiridoides (**Hosny, 1998**). L'écorce de *Fraxinus angustifolia* contient des tannins, des flavonoïdes, des résines, des glucosides (fraxine, fraxitol et rutine), des sucres, de la vitamine C, de l'acide malique et des sels minéraux (**Baba-Aissa, 2011**).

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en plusieurs classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base ensuite par le degré de modification de ce squelette. **Bravo (1998)** a rapporté les différentes classes des composés phénoliques qui caractérisent le genre *Fraxinus*, désigné dans le tableau III.

Tableau IV : Les principales classes des composés phénoliques (Bravo, 1998 ; Kostova, 2007).

Chaîne carbonée	Classe	Structure	Exemples
C6	Phénol simple		Acide caféique
C6-C3	Coumarines		Esculine Esculetin Fraxine Fraxitine
C6-C3	Secoiridoids		Oleuropeine Ligstroside
(C6-C3)2	Lignans		Pinoresinol
C6-C3-C6	Flavonoïdes :		Quercétine glucoside Rutine Kaémpférol et dérivés
(C15)	Tanins		Tannins condensés Tannins hydrolysables

Cette étude a été entreprise dans l'objectif de tester l'effet protecteur des extraits éthanolique et aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* contre la peroxydation lipidique et l'hémolyse induites par le H₂O₂ sur les érythrocytes humains. Cela afin de justifier son utilisation dans le traitement traditionnel de pathologies liées au stress oxydatif.

Matériel et Méthodes

II -1-Matériel

II-1-1-Appareillage et produits chimiques

Pour la réalisation de ce travail, plusieurs produits chimiques et appareillages ont été utilisés, le tableau suivant les résume.

Tableau V : Différents appareils et produits chimiques utilisés.

Produits chimiques	Appareils et matériels divers
-Acétate de sodium($C_2H_3NaO_2$)	-Agitateur (VELP)
-Acide acétique -Acide gallique	-Bain marie (MEMMERT)
-Acide thiobarbiturique (TBA)	-Balance (RADWAG)
-Azide de sodium (N_3Na)	-Broyeur électrique (KIKA-WERKE)
-Carbonate de sodium ($NaCO_3$)	-Centrifugeuse (SIGMA)
-Catéchine/ Rutine/sang	-Congélateur $-80^\circ C$ (TELSTAR)
-Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$)	-Vortex (VELP)
-Chlorure de sodium ($NaCl$)	-Distillateur (GFL2104)
-Chlorure ferrique ($FeCl_3$)	-Etuve (ECOCELL)
-Diméthylsulfoxyde (DMSO)	-Lyophilisateur (CHRIST)
-Folin- Ciocalteu.	-Micropipettes (50 μ l-100 μ l-1000 μ l)
- Chlorure d'hydrogène HCl	-PH mètre (HANNA)
-Hydroxyde de sodium ($NaOH$)	-Rota vapeur (HEIDOLPH)
-Dihydrogène-phosphate de potassium ((KH_2PO_4))	- Spectrophotomètre (SHIMADZU)
-Hydrogène-phosphate de sodium (Na_2HPO_4)	-Tamiseur électrique (Retsch)
-Méthanol absolu (99,99%)/Ethanol (96%)	-Tubes à hémolyse
-Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	-Tubes de Falcon
-Protéine Albumine de sérum bovin (BSA)	-Ballon à fond plat
-Sodium Dodecyl sulfate (SDS)	-Barreaux magnétiques
-Triéthanolamine (TEA)	-Béchers
-Eau distillée obtenue à partir du distillateur au niveau du Laboratoire de Biochimie Appliqué	-Entonnoir
- Les réactifs sont en majorité de marque Sigma	- Tubes Eppendoff
-Les solvants et acides utilisés sont de marque Biochem, Prolab.	-Erlenmeyer
	-Tubes héparines
	-gants

II-1-2-Matériel végétal

L'écorce de *Fraxinus angustifolia* utilisée dans cette étude a été récoltée dans la forêt d'Akfadou, région de Chemini située 70 km à l'ouest de la ville de Bejaia, en juillet 2016, cette plante a été préalablement identifiée pour plusieurs autres travaux menés sur cette espèce au niveau de Laboratoire de Biochimie Appliquée.

II-1-3-Echantillons du sang

Cinq échantillons de sang provenant du **CTSW** (centre de transfusion sanguine) de Bejaia ont été recueillis à partir de personnes saines pour l'évaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

- La manipulation a été effectuée au sein du CTSW.

II-2-Méthodes :

Les différentes étapes réalisées dans cette étude sont : l'extraction éthanolique et aqueuse à partir de la poudre des écorces de *Fraxinus angustifolia*, les dosages des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins, puis l'évaluation *in vitro* des activités antioxydantes et anti-hémolytiques des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

II-2-1-Préparation des extraits éthanolique et aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

L'écorce a été séchée à une température ambiante dans un endroit aéré et ombragé, puis broyée à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre obtenue a été tamisée et celle dont le diamètre est inférieur à 63 μ m a été soumise à deux types d'extraction (éthanolique et aqueuse).

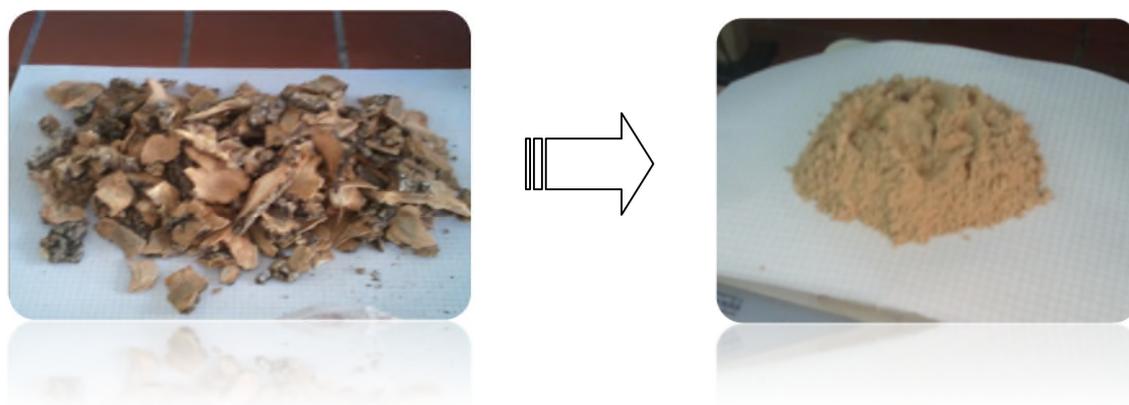


Figure 2: Photographies de l'écorce et de la poudre de *Fraxinus angustifolia*.

II-2-1-1-Extraction éthanolique

Un échantillon de 50 g de poudre fine de la plante a été macéré dans l'éthanol (96 %) avec un rapport de 1:4 (m:v) à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous agitation pendant 24 h. Après une décantation pendant 12h, le surnageant a été récupéré et une deuxième extraction identique sur le culot a été réalisée, par une procédure d'extraction par épuisement. Les surnageants obtenus ont été homogénéisés et centrifugés pendant 10 min à 1500 g. Le solvant a été éliminé de la solution extraite par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur, permettant ainsi d'obtenir l'extrait brut éthanolique sec.

II-2-1-2-Extraction aqueuse (Préparation de la décoction)

L'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été obtenu par décoction de 25g de poudre dans 250 ml d'eau bouillante maintenue à 100 °C pendant 30min sous agitation continue. La suspension a été laissée décanter pendant 2 h, ensuite le surnageant a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min et filtré à travers la laine de verre et une deuxième extraction a été réalisée sur le culot. Le surnageant a été surgelé à -80 °C pendant une semaine, ensuite introduit dans un lyophilisateur jusqu'à obtention d'un lyophilisat totalement sec. Le pourcentage d'extraction a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [\text{Résidus sec /masse de la poudre initiale}] * 100$$

II-2-2-Dosage des contenus phytochimiques

II-2-2-1-Détermination de la teneur en phénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits éthanolique et aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu, suivant la méthode décrite par **Kahkonen et al. (1999)**. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). L'intensité de cette couleur renseigne sur le contenu en phénols totaux dans le mélange réactionnel.

A 200 µl de solution d'extrait convenablement dissous, 1 ml du réactif de Folin (0,1 N), puis 800 µl de carbonate de sodium à (75%) ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 765 nm.

La quantité des phénols totaux a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage (**Annexe 1**), en utilisant l'acide gallique comme standard et la concentration des phénols totaux est exprimée en µg équivalent acide gallique/ mg d'extrait sec (µg Eq.AG./mg d'ext.).

II-2-2-2-Détermination de la teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits bruts a été déterminée selon la méthode des chlorures d'aluminium décrite par **Maksimovic et al. (2005)**. Le principe de la méthode est basé sur la réaction du chlorure d'aluminium avec l'extrait, entraînant ainsi la formation d'un complexe jaune qui absorbe à 430 nm.

Une prise de 2 ml de solution d'extrait a été mise dans un tube à essai avec 1 ml de chlorure d'aluminium. L'intensité de la couleur jaune développée a été mesurée à 430 nm après 10min d'incubation. La teneur en flavonoïdes a été déduite à partir des gammes d'étalonnage établies avec la rutine et exprimée en µg d'équivalent de rutine par mg d'extrait sec (µg Eq.Rut./mg d'extrait).

II-2-2-3-Détermination de la teneur en tannins

Les teneurs en tannins dans les deux extraits ont été déterminées selon la méthode de **Hagerman et Butler (1978)**, qui est basée sur la formation d'un précipité entre les tannins et la BSA (Albumine du Sérum Bovin). Le précipité a été récupéré et dissout par un détergent (SDS/TEA), puis les tannins ont été révélés par une réaction colorimétrique avec une solution de FeCl₃. Un volume de 2 ml de la solution BSA a été ajouté à 1 ml de solution d'extrait pour former, après 24 h d'incubation à 4°C, un précipité de complexe tannins-BSA. Ensuite les solutions ont été centrifugées à 5000 rpm pendant 15 min. Le surnageant a été éliminé et le précipité a été redissout à l'aide de 4 ml de SDS/TEA en agitant délicatement, pour ensuite ajouter 1 ml de FeCl₃. Après 10 min d'incubation, l'intensité de la couleur pourpre développée a été mesurée à 510 nm.

La teneur en tannins a été estimée par une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions expérimentales, avec l'acide tannique comme référence et exprimée en µg équivalent acide tannique /mg d'extrait sec (µg Eq.AT./mg d'extrait sec).

II-2-3-Evaluation de l'activité hémolytique et anti hémolytique des extraits éthanolique et aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Les tests hémolytiques et anti-hémolytiques sur les érythrocytes ont été réalisés selon le protocole de Rafat *et al.* (2009) décrit par sundaram *et al.* (2011).

II-2-3-1-Préparation des suspensions érythrocytaires

Les échantillons de sang humain ont été recueillis dans des tubes héparinés et centrifugés à 1500 rpm pendant 10 min afin d'éliminer le surnageant, puis le culot globulaire a été lavé trois fois par centrifugation (à 3500 rpm/10 min) avec une solution saline de tampon phosphate à pH=7,4 (0,58 mM de KH_2PO_4 , 3,4 mM de NaHPO_4 , 150 mM de NaCl et 1 mM d'azide de sodium) et remis en suspensions dans le même tampon à un hématocrite de 10%.

II-2-3-2-Hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

L'hémolyse a été réalisée avec le H_2O_2 comme initiateur de peroxydation lipidique. Une prise de 250 μl de la suspension érythrocytaire a été soumise à une attaque oxydante radicalaire par addition de 500 μl de H_2O_2 à différentes concentrations (1Mm-100mM) et laissée incubée à 37 °C pendant 3 h. Un témoin négatif et un témoin positif ont été préparés en substituant la solution H_2O_2 par la solution tampon phosphate saline et de l'eau distillée, respectivement. Après incubation, le volume des différents échantillons a été ajusté à 4,5 ml par la solution tampon. L'hémoglobine libérée dans le surnageant a été mesurée à 540 nm, après centrifugation à 2000 rpm pendant 10 min.

II-2-3-3-Effet des extraits de *F.angustifolia* sur les suspensions érythrocytaires

La même procédure expérimentale a été reprise avec des concentrations croissantes d'extrait de *Fraxinus angustifolia* préparé dans du tampon phosphate à 5% de DMSO. Le taux d'hémolyse induite par différentes concentrations des extraits a été calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{\text{Abs de l'hémolyse de l'extrait} - \text{Abs du témoin négatif}}{\text{Abs de l'hémolyse totale}} * 100$$

II-2-3-4-Effet anti-hémolytique des extraits aqueux et éthanolique d'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Dans cette partie, la résistance des érythrocytes à l'attaque radicalaire en présence de différentes concentrations des extraits de *Fraxinus angustifolia* qui ne présentent pas un effet hémolytique a été effectuée, selon le même protocole précédent.

Elle consiste à ajouter, un volume de 500 µl d'extrait végétal à 250 µl de la suspension érythrocytaire. Après 30 min de préincubation à 37 °C, 500 µl de H₂O₂ à 8 mM ont été additionnés au milieu réactionnel et le mélange est remis en incubation jusqu'à 3 h. Un témoin négatif (préparé avec du tampon phosphate) et deux témoins positifs (préparés avec de l'eau distillée et H₂O₂) ont été réalisés en parallèle. Après incubation, le volume de tous les essais a été ajusté à 4,5 ml.

L'hémolyse a été mesurée à 540 nm après centrifugations à 2000 rpm pendant 10 min, et l'inhibition de l'hémolyse a été calculée comme suit :

$$\%d'inhibition = \frac{(\%d'hémolyse H_2O_2 - \% d'hémolyse l'extrait) *100}{\% d'hémolyse H_2O_2}$$

II-2-3-5-Estimation de la peroxydation lipidique

Afin d'évaluer le taux de la peroxydation lipidique, le dosage des MDA (malondialdéhydes) résultants a été réalisé selon le protocole de **Tebekeme et Diepreye (2012)**.

Un mélange de 500 µl d'extrait avec 250 µl de la suspension érythrocytaire ont été incubés 30 min à 37 °C, puis 500 µl d'H₂O₂ ont été ajoutés et le mélange a été réincubé à nouveau pour une heure. Le mélange par la suite a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min. 500 µl de surnageant ont été récupérés et additionnés à un volume de 2 ml de la solution TBA pour le remettre en incubation à 100 °C pendant 1 heure.

Après refroidissement et centrifugation, l'absorbance du surnageant a été mesurée spectrophotométriquement à 532 nm. Les résultats sont exprimés en µmol MDA/ml de suspension érythrocytaire. Cette démarche expérimentale a été réalisée en parallèle avec tous les tests hémolytiques et anti hémolytiques cités précédemment.

II-3-Analyse statistique

Les résultats des tests des activités hémolytiques et anti-hémolytiques ont été exprimés en moyenne \pm moyenne d'erreur standard (S.E.M.). Les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel Graph pad prism 5.3. L'analyse de variance, ANOVA *one way*, a été utilisée avec un post-test de Dunett, et affirme que les populations sont différentes avec un risque d'erreur tel que $p < 0,001$ (différence très hautement significative ***). Les résultats sont considérés significatifs à $*p < 0,001$ comparativement à l'hémolyse induite par le H₂O₂ et $\#p < 0,001$ comparativement à l'hémolyse totale induite par l'eau distillée.

- S.E.M. = écart-type / Racine (nombre d'échantillons)

Résultats et discussion

III-1-Résultats et interprétations

III-1-1-Taux d'extraction

Les taux d'extraction à partir de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été calculés par rapport à la poudre initiale pour les extraits éthanolique et aqueux. Les résultats obtenus montrent des rendements d'extractions inférieurs à 10 % malgré que les extractions soient réalisées par épuisement. Ils sont de 9,82 % pour l'éthanol et de 7,4 % pour l'eau distillée, ceci indique que le solvant et la procédure utilisée influence le taux d'extraction à partir de la même matrice végétale qui est l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

III-1-2-Dosage des contenus phénoliques des extraits de *Fraxinus angustifolia*

Les contenus phénoliques des extraits éthanoliques et aqueux de *Fraxinus angustifolia* à savoir les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins ont été estimés par des méthodes de dosages colorimétriques. Les résultats générés sont rapportés dans le tableau suivant:

Tableau VI : Teneur en composés phénoliques dans les extraits de *Fraxinus angustifolia*

Extraits	Phénols totaux ($\mu\text{g Eq. AG. / mg E}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g Eq. Rut. / mg E}$)	Tannins ($\mu\text{g Eq. AT. / mg E}$)
Ethanolique	62,60 \pm 0,03	11,37 \pm 0,02	61,6 \pm 0,04
Aqueux	26,23 \pm 0,01	6,22 \pm 0,02	39,15 \pm 0,03

- Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. $\mu\text{g Eq. AG./mg E}$: microgramme Equivalent Acide gallique par milligramme d'extrait, $\mu\text{g Eq. Rut./ mg E}$: microgramme Equivalent Rutine par milligramme d'extrait, $\mu\text{g Eq. AT./ mg E}$: microgramme Equivalent Acide Tannique par milligramme d'extrait. E : extrait

La teneur en phénols totaux obtenue par les deux méthodes d'extraction présentées dans le tableau ci-dessus montre que les deux extraits présentent des taux importants en phénols totaux, avec une teneur de deux fois plus élevée (62,60 $\mu\text{g Eq. AG. /mg d'extrait}$) pour l'extrait éthanolique comparativement à l'extrait aqueux (26,23 $\mu\text{g Eq. AG. /mg d'extrait}$). De même, les résultats de dosage des flavonoïdes dans les deux extraits éthanolique et aqueux d'écorce de *Fraxinus angustifolia* présentent également des teneurs en flavonoïdes avec un taux deux fois plus élevé pour l'extrait éthanolique qui est de (11,37 $\mu\text{g Eq. Rut./mg d'extrait}$) contre 6,22 $\mu\text{g Eq. Rut. /mg d'extrait}$ pour l'extrait

aqueux. Des teneurs en tannins ont été obtenues avec un taux plus élevé en faveur de l'extrait éthanolique (61,6 $\mu\text{g Eq.AT./mg}$ d'extrait).

III-1-3-Evaluation de l'effet hémolytique et taux des MDA induit par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Différentes concentrations de H_2O_2 ont été testées sur des érythrocytes humains pour évaluer leur activité hémolytique et le dosage des MDA. Les résultats sont représentés dans les histogrammes des figures suivantes :

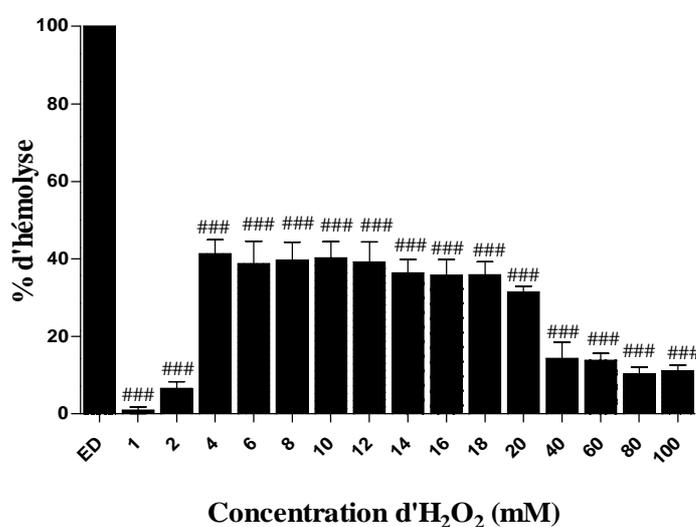


Figure 3 : Effet hémolytique induits par différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; toutes les valeurs sont exprimées par moyenne \pm SEM ($n=5$), $###P<0,001$ indique une différence significative comparé au T_{+ED} (Eau distillée), par le test ANOVA *one way*, avec le post-test de Dunnett, du logiciel GraphPadPrism.5.3.

Les résultats représentés dans la figure 3, montrent des taux différents d'activité en fonction de la concentration de H_2O_2 appliquée. En effet, la cytotoxicité de H_2O_2 aux concentrations de 1 et 2 mM sont les plus faibles. Le taux d'hémolyse optimale est obtenu entre les deux concentrations 4 et 12mM dont l'activité hémolytique est presque similaire, ensuite le pourcentage d'hémolyse a légèrement diminué dans la gamme de concentration (14-20mM), pour chuter enfin à de plus fortes concentrations par rapport au témoin positif. Cependant, tous les taux d'hémolyse obtenus aux différentes concentrations de H_2O_2 sont significativement inférieurs à celui de l'eau distillée.

Différentes concentrations de H_2O_2 ont été testées sur des érythrocytes humains pour évaluer leur activité hémolytique et le dosage des MDA. Les résultats sont représentés dans les histogrammes des figures suivantes :

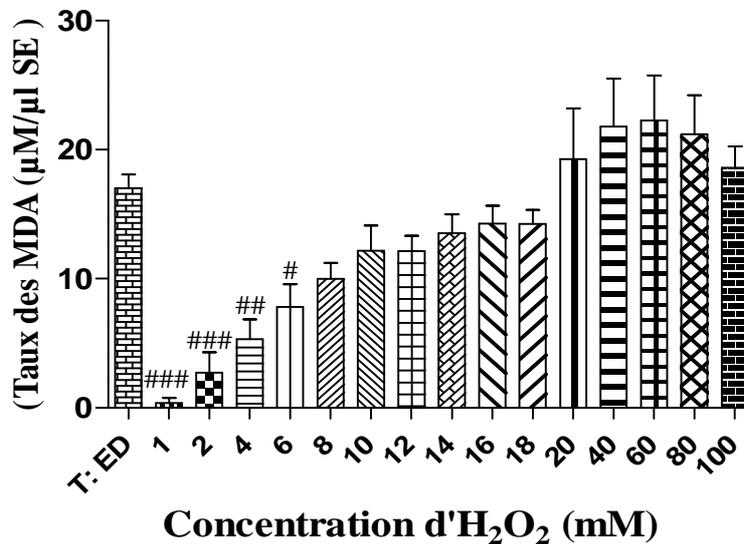


Figure 4 : Taux d'MDA induits par différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2); toutes les valeurs sont exprimées par moyenne \pm SEM ($n=5$); ### $P<0,001$ indique une différence significative comparé au T_{+ED} (Eau distillée), par le test ANOVA *one way*, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3.

Toutes les concentrations H_2O_2 testées pour leurs effets hémolytiques ont été accompagnées par des tests de dosage des MDA, un marqueur de peroxydation lipidique. Les résultats obtenus montrent clairement une augmentation du pourcentage de taux des MDA en fonction des concentrations de H_2O_2 allant de 1 à 10 mM, puis un taux stable entre 10 et 20 mM suivie d'une augmentation importante pour les plus fortes concentrations (20-100 mM). Suite à l'analyse de ces résultats, la concentration de 8 mM de H_2O_2 a été choisie pour représenter l'hémolyse optimale dans les tests anti-hémolytiques.

III-1-4-Evaluation de l'effet hémolytique des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Différentes concentrations des extraits éthanolique et aqueux ont été testées sur des érythrocytes humains pour évaluer leur activité hémolytique. Les résultats sont représentés dans les histogrammes A et B de la figure suivante :

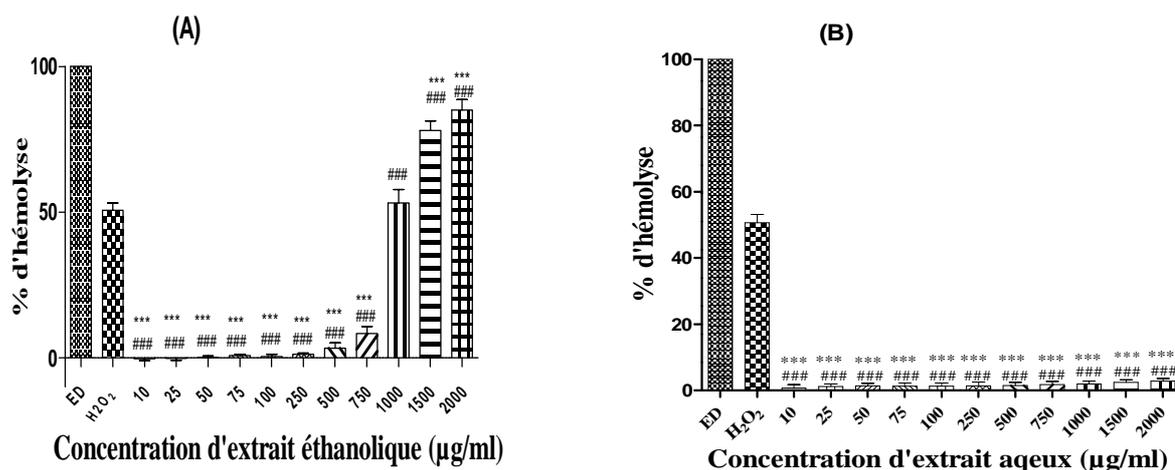


Figure 5 : Effet hémolytique de l'extrait éthanolique (A) et de l'extrait aqueux (B) de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*: toutes les valeurs sont exprimées par une moyenne \pm SEM (n=4) ; *** p < 0,001 indique une différence significative, comparé au T_{H₂O₂} (8mM), ###p<0,001 indique une différence significative, comparé au T_{ED} (Eau distillée) par le test ANOVA *one way*, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3.

D'après les résultats de l'extrait éthanolique, on constate que le pourcentage de l'effet hémolytique est presque nul à des concentrations allant de 10 µg/ml à 250 µg/ml, comparé aux deux témoins, eau distillée (T^{ED}) et H₂O₂, suivie d'une augmentation de l'hémolyse en fonction de la concentration à partir de 500 µg/ml d'extrait jusqu'à atteindre une hémolyse maximale à 2000µg/ml, significative (**p < 0,001, ###p<0,001) par rapport aux deux témoins.

Toutefois, l'analyse des résultats rapporte que l'incubation des érythrocytes avec l'extrait aqueux n'a presque pas provoqué d'hémolyse avec toutes les concentrations étudiées comparé à l'hémolyse totale (Témoin d'eau distillée) et celle de H₂O₂. L'étude statistique de ces valeurs a montré qu'il existe une différence significative (**p<0,001, ###p<0,001) entre le pourcentage d'hémolyse induite par les extraits et les deux témoins.

En terme de comparaison, on constate que l'extrait aqueux présente de moindres effets hémolytiques par rapport à l'extrait éthanolique aux mêmes concentrations testées.

III-1-5-Estimation des taux des MDA en présence des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Différentes concentrations de l'extrait éthanolique et aqueux ont été testées sur des érythrocytes humains pour évaluer les taux des MDA générés en leur présence. Les résultats sont représentés dans les histogrammes A et B de la figure suivante :

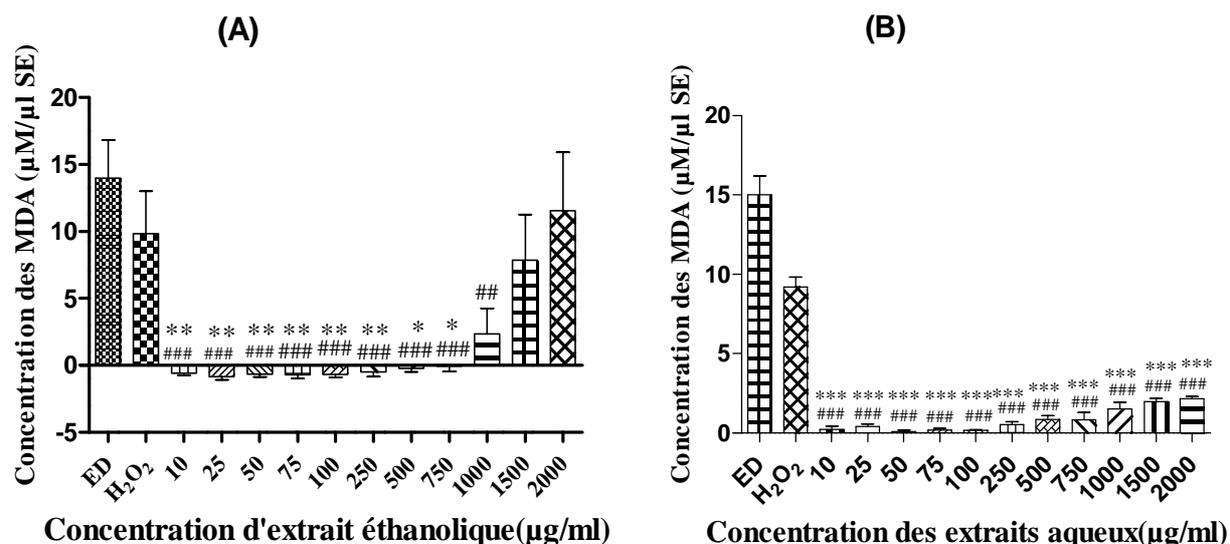


Figure 6: Taux des MDA produits en présence de l'extrait éthanolique (A) et de l'extrait Aqueux (B) d'écorce de *Fraxinus angustifolia*; toutes les valeurs sont exprimées par une moyenne \pm SEM (n=4), ***p < 0,001 indique une différence significative, comparé au T_{H₂O₂}, ####p < 0,001 indique une différence significative, comparé au T_{+ED} par le test ANOVA one way, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3.

D'après les résultats présentés dans la figure 6 (A), Pour l'extrait éthanolique, on enregistre des taux de MDA très faibles pour les concentrations de 10 µg/ml à 750 µg/ml, comparé aux deux témoins (H₂O₂ et l'eau distillée), Cependant, à partir de 1500 µg/ml on constate une augmentation des taux de MDA non significatifs par rapport aux teneurs des MDA des deux témoins (ED et H₂O₂), indiquant une peroxydation lipidique qui accompagne les hémolyses observées à ces concentrations.

L'extrait aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* enregistre une légère augmentation des taux de MDA qui ne dépasse pas 2,16 µM /µl SE à la plus forte dose testée (2000 µg/ml), Significativement inférieure aux deux témoins (ED et H₂O₂).

Des concentrations qui n'ont pas présenté des effets hémolytiques ont été sélectionnées et retenues pour l'évaluation des activités anti-hémolytiques. Elles sont de 10 à 500µg/ml pour l'extrait éthanolique et toutes les concentrations ont été reprises pour l'extrait aqueux.

III-1-6-Evaluation de l'effet anti-hémolytique des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Les pourcentages d'hémolyse observés chez les érythrocytes humains traités avec le peroxyde d'hydrogène (8mM), après leur réincubation avec les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à différentes concentrations sont présentés dans la figure 7. Les pourcentages d'inhibition relatifs aux hémolyses obtenues sont rapportés dans les tableaux VI et VII.

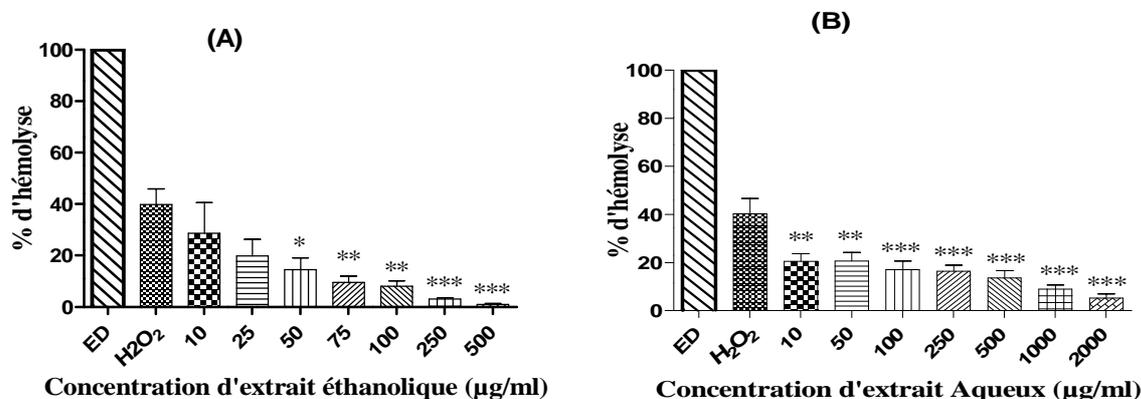


Figure 7 : Effet inhibiteur de l'extrait éthanolique (A) et de l'extrait Aqueux (B) de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* de l'hémolyse induite par le peroxyde d'hydrogène (8mM) ; *** p < 0,001 indique une différence significative, comparé au T_{H₂O₂}, par le test ANOVA *one way*, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3.

Tableau VII : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par H₂O₂ après traitement des érythrocytes par les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Concentrations d'extraits	% d'inhibition de l'hémolyse par l'extrait éthanolique	% d'inhibition de l'hémolyse par l'extrait Aqueux
10µg/ml	39,97	48,37
25µg/ml	52,80	NT
50µg/ml	64,25	49,56
75µg/ml	76,68	NT
100µg/ml	80,96	57,84
250µg/ml	91,84	59,26
500µg/ml	97,61	66,67
1000µg/ml	NT	78,66
2000µg/ml	NT	87,93

NT : non testé

D'après l'histogramme de la figure 6 (A) le pourcentage d'hémolyse des érythrocytes provoquée par H_2O_2 présente une diminution progressive dépendante de la concentration pour les deux extraits testés. A de faibles concentrations (10 et 25 $\mu\text{g/ml}$), l'extrait éthanolique n'a pas montré de diminution significative de pourcentage d'hémolyse, comparativement à celle induite par le H_2O_2 (8mM). A partir de 50 $\mu\text{g/ml}$, une diminution progressive du pourcentage d'hémolyse a été noté jusqu'à atteindre une inhibition significative ($***p < 0,001$) par rapport au témoin H_2O_2 (8mM). Concernant l'extrait aqueux, une diminution significative ($**p < 0,001$) du pourcentage d'hémolyse a été obtenue pour les plus faibles concentrations testées (10 et 50 $\mu\text{g/ml}$) par rapport au témoin H_2O_2 .

III-1-7-Estimation des taux de MDA produits de la peroxydation lipidique induite par H_2O_2 après traitement des érythrocytes par les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Les taux de MDA produits dans les tests anti-hémolytiques par le H_2O_2 (8 mM) en présence de différentes concentrations des extraits éthanolique et aqueux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont représentés dans les figures 7A et 7B, respectivement. Les pourcentages d'inhibition des taux de MDA sont calculés et rapportés dans le tableau VII.

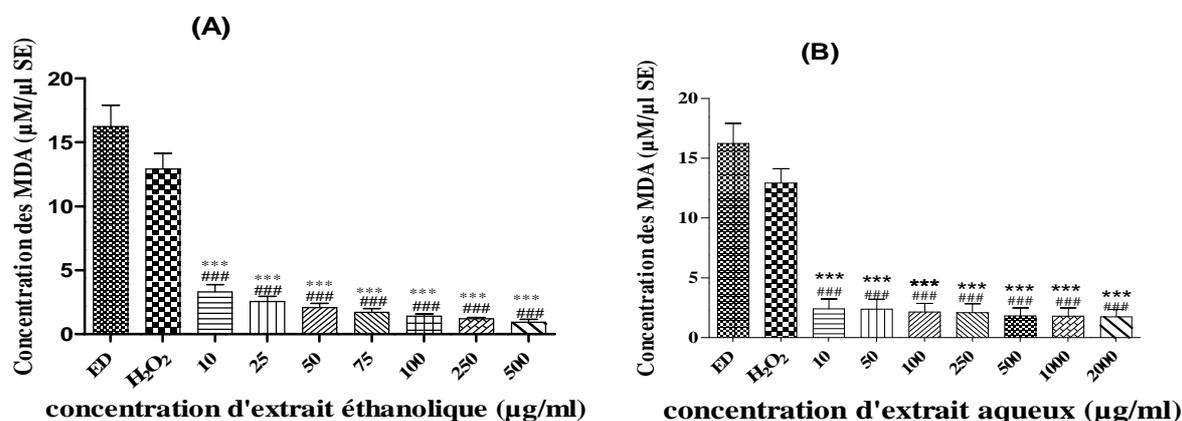


Figure 8 : Taux des MDA produits en présence de l'extrait éthanolique (A) et l'extrait Aqueux (B) de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*; toutes les valeurs sont exprimées par une moyenne \pm SEM (n=4), $***p < 0,001$ indique une différence significative, comparé au $T_{H_2O_2}$ (8mM), $###p < 0,001$ indique une différence significative, comparé au T_{+ED} par le test ANOVA one way, avec le post-test de Dunnett du logiciel de GraphPadPrism.5.3.

Tableau VIII Pourcentage d'inhibition des taux des MDA induite par H₂O₂ après traitement des érythrocytes par les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Concentrations d'extrait	% d'inhibition des MDA par l'extrait éthanolique	% d'inhibition des MDA par l'extrait Aqueux
10µg/ml	95,97	96,89
25µg/ml	96,79	NT
50µg/ml	97,84	96,85
75µg/ml	97,84	NT
100µg/ml	98,24	97,32
250µg/ml	98,50	94,35
500µg/ml	98,82	95,22
1000µg/ml	NT	96,14
2000µg/ml	NT	96,61

Une diminution significative de taux de MDA formés dans les tests anti-hémolytiques ont été observé à de très faibles concentrations des extraits (10 µg/ml), aussi bien pour l'extrait éthanolique que aqueux, qui continue à diminuer progressivement d'une manière dose dépendante, accompagnée donc d'une augmentation progressive des pourcentages d'inhibition de la génération des MDA pour atteindre un pourcentage de 98,82 % à 500µg/ml et 96,61 % à 2000 µg/ml pour l'extrait éthanolique et aqueux respectivement, témoignant d'une inhibition presque complète des dommages liées à la présence du H₂O₂.

III-2-Discussion

Le pouvoir de guérison des plantes est une notion ancienne et pendant des siècles les populations ont essayé de développer d'efficace méthodes de préparation des recettes traditionnelles, afin d'optimiser l'extraction du principe actif responsable des vertus thérapeutiques (Cowan, 1999).

Dans cette étude différents rendements ainsi que les contenus phénoliques des extraits éthanoliques et aqueux ont été obtenus. En effet, il a été rapporté que le taux d'extraction des composés phénoliques est influencé par le type du solvant, la granulométrie de la poudre végétale, qui peut augmenter la surface d'échange entre le solvant et la poudre (Bonnaillie *et al.*, 2012), le rapport solide-liquide, la température et le pH du milieu etc (Falleh *et al.*, 2008 ; Nazck et Shahidi, 2006). Les deux méthodes utilisées ont été choisies pour l'optimisation de l'extraction des composés susceptibles d'avoir une activité antioxydante tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins...etc., des composés largement extraits à l'éthanol et par préparation des décoctions. En effet, l'éthanol est connu comme un excellent solvant d'extraction de métabolites secondaires tels que les poly phénols une faible toxicité comparativement aux autres solvants organiques (Cowan, 1999). Il extrait une large gamme de composés ayant une diversité de structures chimiques, de variables degré de polymérisation, dépendant de la durée d'extraction et le nombre de répétions de la procédure d'extraction (Naczck et shahidi, 2004).

D'après les résultats obtenus, une teneur élevée en phénol totaux est trouvée dans l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, ceci peut être due à la solubilité des phénols qui dépend principalement du nombre de groupement hydroxyles, de leur faible poids moléculaire et de la longueur de chaîne carbonique du squelette de base (Mohammedi et Atik, 2011). Ils peuvent être liés aussi à la richesse de cette matrice végétale en composés phénoliques solubles dans les solvants polaires et les solutions aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires. Des résultats similaires ont été rapportés par les études réalisées par Atmani *et al.*, (2009) et Berboucha *et al.* (2010). Par ailleurs, les extraits éthanoliques enregistrent des teneurs en phénols totaux les plus élevés par rapport à l'eau distillée, ces résultats sont similaires à ceux observés par Mahmoudi *et al.* (2013).

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus hétérogène des composés phénoliques de différentes classes, dont certains sont solubles dans les solvants polaires et d'autres sont soluble dans les solvants apolaires **Makris et Kefalas, (2005)**, d'après les résultats un faible taux de flavonoïdes est obtenu, ceci peut être expliqué par leur solubilité mais aussi la partie de la plante utilisée, en effet les flavonoïdes sont beaucoup plus répandus dans d'autres parties du végétal (Fleurs,...) que les écorces.

Les extractions par décoctions sont également très utilisées dans le but de procéder de façon similaire avec les utilisations traditionnelles, néanmoins elles présentent souvent des rendements d'extraction inférieurs aux extractions par les solvants organiques tels que l'éthanol, qui est rapporté comme étant un des meilleurs extracteur de flavonoïdes (**Jokić et al., 2010**).

L'analyse des résultats de la teneur en tannins a révélé des taux élevés dans l'écorce de *Farxinus angustifolia*, ceci peut être due à leur structure qui est fortement hydroxylée, qui leur permettent d'être plus soluble, ces résultats sont obtenues par macération à l'éthanol qui est considéré comme un solvant permettant d'extraire le maximum de composés, notamment polaires.

De nombreux produits naturels y compris ces polyphénols ont été étudiés pour leurs potentiels antioxydants impliqués dans la protection des membranes biologiques. Les érythrocytes sont un moyen pratique et fréquent utilisé comme modèle d'étude du stress oxydatif, en raison de leur disponibilité et de leur simplicité. De plus, les érythrocytes sont très sensibles à la peroxydation à cause de leur membranes qui sont riches en acides gras polyinsaturés, leur exposition continue à de fortes concentrations d'oxygène et au fait qu'ils contiennent un catalyseur puissant de métal de transition (**Clemens et Waller, 1987**).

Les résultats de l'effet hémolytique induit par le H_2O_2 est variable en fonction de la concentration. A de faibles et moyennes concentrations, les résultats ont montré une augmentation légère et modérée de l'hémolyse, respectivement, indiquée par la libération d'hémoglobine. La capacité de H_2O_2 à diffuser à travers la membrane des érythrocytes lui permet d'oxyder les ions métalliques de transition pour pouvoir former un radical hydroxyle réactif (réaction de Fenton). Ce dernier à son tour est un puissant oxydant, qui en réagissant avec les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires peut initier la

peroxydation lipidique et éventuellement provoquer des lésions cellulaires, ainsi la libération de l'hémoglobine (**Blasa et al., 2007**).

Cependant, les érythrocytes traités avec de fortes concentrations de H_2O_2 ont présenté une diminution du taux d'hémolyse sur l'histogramme, indiquant une formation accrue de méthémoglobines ainsi que leur dénaturation ; l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine provoque la formation de liaisons transversales disulfures entre les chaînes de globines adjacentes, déformant ainsi la structure de l'hémoglobine qui mène finalement aux précipités visibles connus sous le nom de corps de Heinz (**Chiu et Lubin, 1989**).

D'un point de vue biologique, un danger posé par la présence de H_2O_2 est liée à sa capacité à oxyder les groupes sulfhydryle des protéines. Pour ces raisons, H_2O_2 est considéré comme étant hautement toxique (**Wlodek et Kusior, 2006**). Le malondialdéhyde est le plus connu des aldéhydes formés lors de la peroxydation, produit lors de la dégradation des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons, il se révèle être l'aldéhyde majoritaire issu de la peroxydation lipidique (**Niki et al., 2005**). La plupart des dosages visant à déterminer la concentration de MDA ont été développés sur la base de sa dérivation avec l'acide thiobarbiturique (TBA), la condensation de ces deux molécules donne naissance à un produit facilement dosable par spectrophotométrie en raison de sa forte absorbance. Malheureusement, la spécificité de ce dosage est faible, en raison de la réactivité de TBA avec des composés d'oxydation autres que le MDA (**Knight et al., 1988**). Le résultat du dosage de MDA par l'acide thiobarbiturique est donc l'ensemble de malondialdéhyde préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et d'autres substances qui donnent naissance soit à du malondialdéhyde, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud (**Gutteridge et al., 1974**), ceci appuie les taux des MDA observés dans les tests d'hémolyse totale.

Les résultats obtenus sur l'évaluation des taux des MDA, sont expliqués par le fait qu'ils soient associés à la peroxydation lipidique est proportionnelle aux nombre de cellules lysées, dépendant aussi des concentrations croissantes de H_2O_2 ; puisque ces MDA sont principalement les produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés.

Certaines plantes utilisées pour leurs effets thérapeutiques peuvent, à fortes doses, présenter une menace pour la santé de l'homme, ce qui rend leur utilisation impossible en présence de leur effet toxique. L'intérêt de la plante exige donc qu'une approche de sa toxicité soit étudiée, ce qui a nécessité l'évaluation de l'effet hémolytique des extraits de *Fraxinus angustifolia* vis-à-vis des globules rouges humains.

Effectivement, l'étude de l'activité hémolytique des extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont révélé que l'extrait éthanolique présente un effet toxique à de fortes doses. L'activité hémolytique maximale a été enregistrée à une dose de 2000µg/ml avec un taux de 85,05% et l'activité hémolytique minimale a été notée à une concentration de 500µg/ml avec un taux de 3,36%. Cependant, l'extrait aqueux n'indique aucune activité hémolytique pour toutes les concentrations étudiées. Cela pourrait être expliqué par le fait que l'extrait éthanolique est plus riche que l'extrait aqueux selon les résultats obtenu lors des dosages. On suppose que l'activité hémolytique de l'extrait éthanolique est du aux fortes concentrations de ce derniers. Plusieurs études montrent des résultats controversés d'antioxydants exogènes, en discutant que le type, la posologie et la matrice de ces antioxydants peuvent être des facteurs déterminants qui influencent sur l'équilibre entre les effets bénéfiques et délétères de ces composés naturels (**Bouayed et Bohn, 2010**). D'autres parts, quelques preuves existent pour leur action comme pro-oxydant, sous certaines conditions, telles que des doses élevées ou présence d'ions métalliques (**Decker., 1997 ; Raza et John., 2005 ; Watjen et al., 2005**). L'activité antioxydante ou pro-oxydante dépend intimement de leurs concentrations (**Bouyed et Bohn, 2010**).

Les résultats obtenus pour l'évaluation de la peroxydation lipidique lors de l'activité hémolytique indiquent, effectivement une formation des MDA pour les fortes concentrations qui présentent un effet hémolytique vis-à-vis des érythrocytes d'une manière dose dépendante.

Le test de bioactivité anti-hémolytique des extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia* révèle que le traitement des érythrocytes avec les deux extraits (éthanolique et aqueux) a augmenté leur résistance à l'effet néfaste du H₂O₂, en fonction de l'augmentation de Leurs concentrations. Il est à noter que l'extrait aqueux a présenté un effet inhibiteur par toutes les concentrations étudiées ; néanmoins malgré la toxicité de l'extrait éthanolique à de fortes doses il a exhibé un effet protecteur de la membrane érythrocytaire de 97,61% à une moindre concentration (500µg/ml) que l'extrait aqueux qui n'a atteint que 87,93% à 2000µg/ml.

Cette activité anti-hémolytique est peut être due à leurs teneur en polyphénols. **Zhang et al. (1997)** ont examiné les polyphénols de thé vert *in vitro*, et ils ont trouvé des résultats qui confirment l'activité anti-hémolytique des polyphénols. Plus particulièrement, cette activité anti-hémolytique pourrait être attribuée aux flavonoïdes qui possèdent une activité antioxydante importante ; selon une étude menée par **Asgary et al. (2005)**; la rutine a entraîné une inhibition de l'hémolyse de 42,5% à une concentration de 10µg/ml uniquement, démontrant ainsi le pourcentage d'inhibition le plus élevée parmi les flavonoïdes testés (kaempférol, quercitine et morine), indiquant qu'elle a la capacité d'entraver de manière significative l'oxydation de l'hémoglobine et sa conversion en méthémoglobine par sa capacité à attirer les radicaux superoxydes et à chélater le fer impliqué dans l'initiation de la génération des radicaux libres. De même ils ont démontré que la quercétine a inhibé l'hémolyse de 35,5% et le kaempférol a inhibé la peroxydation lipidique et l'hémolyse de 26,9 % à la concentration maximale (10µg/ml).

Il a été rapporté récemment que les flavonoïdes interagissent avec les têtes polaires des phospholipides membranaires par des liaisons hydrogènes. Ces composés peuvent par conséquent s'accumuler à la surface membranaires du côté extra et intra cellulaire. Par cette interaction ces flavonoïdes pourrait agir sur le maintien de l'intégrité membranaire en réduisant l'accès aux molécules délétères à la double région hydrophobe (**Martinez et al., 2012 ; Ramchoun et al., 2015**). D'autres études ont montré que la consommation orale d'antioxydant bioflavonoïdes chez les animaux était efficace pour prévenir le stress oxydatif qui endommage les globules rouges (**Allison et al., 2000**).

Cette activité antihémolytique et antiperoxydante pourrait être attribué également aux tannins ; des études ont montré que les tannins ont eu une inhibition très fortes de la formation des corps de Heinz, cette meme étude a révélé une corrélation élevée entre le pourcentage d'inhibition des corps de Heinz et la concentration en tannins (**Tunsaringkarn et al., 2012**). De plus, des résultats précédents ont suggéré que l'activité antioxydante des tannins était principalement due à la chélation du fer plutôt qu'à la neutralisation des radicaux hydroxyyles (**Lopest et al., 1999**).

Les coumarines comprennent un groupe de composés phénoliques largement distribuées dans les plantes naturels (**Egan et al., 1990 ; Kaneko et al., 2003**). La fraxine structurellement dérivée d'un glucoside de coumarine est une substance trouvée dans l'écorce

de *Fraxinus* (**Schempp et al., 2000**). Des études antérieures ont suggéré que la fraxine isolée de diverses plantes a montré plusieurs bioactivités intéressantes incluant le pouvoir antioxydant (**Kalein- Galczinsky, 1999 ; Whang et al., 2005 ; Park et al., 2006**). D'après **Whang et al. (2005)**, la fraxine a montré un effet protecteur contre le stress oxydatif médié par le H₂O₂. D'autres études menées par **Chang et al. (2017)** ont démontré que le traitement des cellules hépatiques par la fraxine a considérablement diminué la peroxydation lipidique.

L'analyse des taux de MDA produits lors de l'activité anti-hémolytique indique clairement que les extraits ont considérablement réduit le taux de ces derniers d'une manière dose dépendante. A cet égard, les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* pourraient agir par neutralisation directe de l'agent oxydant utilisé, le H₂O₂, car de bons effets neutralisants de ce dernier ont été prouvés par les extraits de l'écorce de *F.angustifolia* par l'étude menée par **Atmani et al. (2009)**.

Conclusion et perspectives

A l'issue de ce travail, il en ressort que la phytothérapie demeure une pratique encore largement utilisée par la population algérienne dans le traitement de nombreuses maladies, malgré le développement socioéconomique.

Dans le présent travail, l'effet pharmacologique de deux extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* (éthanolique et aqueux) a été mis en évidence par la réalisation d'une étude phytochimique et l'évaluation de l'activité hémolytique, anti-hémolytique, peroxydante et anti-péroxydante à différentes concentrations.

La quantification des composés phénoliques dans ces extraits a révélé la présence de phénols totaux, tannins et flavonoïdes, sachant que des teneurs plus élevées ont été obtenues dans l'extrait éthanolique par rapport à l'extrait aqueux.

L'étude de la toxicité de *Fraxinus angustifolia* a montré que l'extrait éthanolique présente un effet hémolytique de 85,05% à la concentration maximale (2000µg/ml). Par contre l'extrait aqueux n'a indiqué aucun effet toxique pour toutes les concentrations étudiées.

Les tests biologiques réalisés *in vitro* sur le sang humain ont prouvé des effets anti-hémolytique intéressants pour les deux extraits éthanolique et aqueux, à savoir que l'extrait éthanolique a présenté une meilleure activité avec un pourcentage d'inhibition de 97,61 % à une concentration maximale de 500µg/ml, accompagnés de forts pouvoirs antioxydant exprimés par la protections des membranes érythrocytaires et par conséquent inhiber l'hémolyse confirmé par le taux élevés des inhibitions de la génération des MDA.

Avec son potentiel bioactif, l'écorce de *Fraxinus angustifolia* constituerait donc une source très importante dans les domaines thérapeutiques et pharmacologiques pour soulager les différentes maladies liées au stress oxydatif. Les résultats de cette étude lui suggèrerait une utilisation en association avec les traitements synthétiques, ayant comme effets secondaires délétères la fragilisation des membranes cellulaires et la promotion du stress oxydatif dans l'organisme, afin d'y remédier.

En perspectives, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur ces extraits s'imposent au niveau pharmacologique et chimique, donc il serait intéressant à l'avenir d'approfondir l'étude phytochimique qui consiste en : la purification, l'identification et la caractérisation des composés actifs impliqués dans le pouvoir hémolytique et anti-hémolytique de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

Il serait aussi judicieux de compléter cette étude par l'optimisation des activités obtenues en fonctions des paramètres cinétiques et expérimentaux influençant le mécanisme antihémolytique de ces extraits.

Références bibliographiques

- A -

- Ahmad, P., Serwat, M., Sharma, S. (2008). Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Physiology*,51:167-173.
- Atmani,,D., Chaher,N .,Berboucha,M .,Ayouni,K .,Lounis,H .,Boudaoud,H .,Debbache,N .(2009). Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 2:303-309.
- Asgary ,S ., Naden, G.H ., Askan ,N .(2005). Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Experimental cardiology*.10:88-90.
- Agrawal, K.N ., Agrawal, D.K ., Mishra ,K.P .(1991). Impact of anemia prophylaxis in pregnancy on maternal haemoglobin, serum ferritin et birthweight. *Indian Journal of Medicine Resources*, 94:277-280.
- Allison, R.W., Lassen, E.D., Burkhard, M.J., Lappin, M.R. (2000). Effect of a bioflavonoid dietary supplement on acetaminophen-induced oxidative injury to feline erythrocytes. *Journal American Veterinary Medical Association* ,(217):1157–1161.

-B-

- Baba-Aissa, F. (2011). Encyclopédie des Plantes Utiles. *El-Maarifa*,157–158.
- Beguïn,Y.(2002). Le métabolisme du fer. *Hématologie*. 8 : 7-11.
- Beloued, A., (1998). Plantes Médicinales d'Algérie. *Office des publicationsuniversitaires, Alger*, 277.
- Berboucha, M ., Ayouni,K ., Atmani,D ., Benboubetra ,M .(2010). Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected Algerian plants traditionally used for the treatment of inflammatory diseases. *Journal of Medicinal Food*, 13(4):1-9.
- Bobinac, M ., Andrasev, S ., Sijacic Nikolic, M .(2010). *Periodicum Biologorum*,112- 341 .
- Boročov, H ., Zahler, P ., Wilbrandt, W ., Shinitzky, M. (1977). The effect of phosphatidylcholine to sphingomyelin mole ratio on the dynamic properties of sheep erythrocyte membrane. *Biochimica Biophysica Acta* , 470:382-388..
- Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J.P., Estaquier, J., Huart, J.J. (1998). Ameisen JC et al. Cellularand molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages.A review. *Biochimie*, 80:173-95.
- Beloued, A. (1998). Plantes Médicinales d'Algérie. *Office des publicationsuniversitaires, Alger*, 277.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*,56 :317-333.

-Bretscher., M. (1972). Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature*, 236: 1 1-12.

-Berger, M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant. *état de connaissance nutrition cliniques et métabolisme*, 20 : 48-53.

-Blasa, M., Accorci, A ., Piacentini, M.P ., Piatti, E. (2007). Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food chemistry*, 104:1635-1640.

-Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova,E.,Saykova, I. (2012). Etude de l'extraction de composée phénoliques à partir de pillicules d'arachides (Arachids Hypogaea). *Revue de génie industriel*, 7 :35-45.

-Betteridge, D.J.(2000). What is oxidative stress ? *Metabolism*, 49: 3-8.

- Bouayed, J., Bohn, T. (2010). "Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state.Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4):228-237.

-Beaudeau, J.L., Peynet, J., Bonnefont-Rousslot, D., Therond, P., Delattere, J., Legrand, A. (2006). Source cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. *Annales Pharmaceutique Francaise*, 64 :373-381.

-C-

- Clemens, M.R., Waller,H.D.(1987). Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chemistry and physics of lipids*,45:251-268

-Cowan, M.M. (1999). Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:564-582.

-Chiu, D., Lubin, B. (1989). Oxidative hemoglobin denaturation and RBC destruction: the effect of hem on red cell membranes, *Semin,Hematology*, 26:128-135.

-Chang, A.Y., Jung,Y.S., Yoon,C.S., Oh,J.S.,Hong,H.H., Kim, Y.C., Kim,S.Y.(2017). Fraxine Prevents Chemically induced Hepatotoxicity by Reducing oxidative stress. *molecules*, 22:1-13.

-D-

-Djeridane,A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.

-Dalle-Donne, I., Rossi, R.,Colombo, R, et al. (2006).Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52:601-623.

- Decker, E. (1997). "Phenolics: prooxidants or antioxidants?", *Nutrition Reviews*, (55). 396-398.

-E-

-Ennabili, A., Gharnit .N., El hamdouni,E.M. (2000). Inventory and social interest of medicinal aromatic and honey plants from Mokrisset region (NW of Morocco). *Botanical studies*, 19, 57-74.

-Esterbauer, H., Gebicki, J., puhl, H., Jurgens,G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 13:367-373.

-Egan, D., O'Kennedy, R., Moran ,E., Cox ,D., Prosser, E., Thornes, R.D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metabolism Reviews*, 22:503-529.

-F-

-Falleh, H., Ksouri,R., Chaieb, K., KarrayBouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008). Phénolic composition of *Cynara cardunculus* L.organs,and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331:372-379.

-G-

-GIFA.(2012). Guide Illustré de la Flore Algérienne: (IGAF) Illustrated Guide of the Algerian Flora. *Les presses de l'Imprimerie Moderne de l'Est, Paris*, 51.

-Gill, S.S. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology Biochemistry*, 48: 909-930.

- Gill, S.S., Tuteja, N.(2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Biochem*, 48: 909-930.

-Girasole, M., Dinarelli ,S., Boumis, G. (2012). Structure and function in native and pathological erythrocytes: *a quantitative view from the nanoscale*. *Micron*, 43(12):1273–1286.

-Gordesky, S.E., Marinetti, GV. (1973). The asymetrk arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane. *Biocheica Biophysica Ressource Commun*, **50**: 1027-1031.

-Gutteridge, J.M.C., Stocks,J., Dormandy, T.L. (1974). Thiobarbituric acide-reactive substances derived from autoxidizing linoleic and linolenic acids. *Analytica Chimica Acta*, 70:107-111.

-Gurpreet Dhaliwal, M.D., Patricia,A., Cornett, M.D., Lawrence, M., Tierney, J.R., M.D. (2004). Hemolytique Anemia. *American Family Physician*, 69:2599-2606.

-Goudable, J., Favier, A.(1997). Radiceaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11 :115-120.

-Guerine, J.-C., Leophonte, P., Lebas, F-X., Liard, F., Terrioux, Ph., Boulanger, P.(2005). Le stress oxydatif en pathologie bronchopulmonaire : apport de la N-acétyl-cystéine (NAC). *Revue Pnemologie clinique*, 61 :16-21.

-H-

-Hagerman, A.E., Butler, L.G. (1978). Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 :809-812.

-Hegnauer, R. (1969). Chemotaxonomic der pflanzen. V. Basel und Stuttgart. 5. *Birkhäuser Verlag*, 237.

-Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D.(1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer*, 20, 21–29.

-Hosny, M., Phytochemistry.(1998),47:1569.

-Hare, J. (2004). Nitroso-redox balance in the cardiovascular system. *The New England Journal of Medicine* , 351:2112-2114.

-Haleng,J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C.,Chapelle,J.P.(2007). Le stress oxydant. *Journal of Food science*, 62 :628-638.

- Hosny, M. (1998) .Phytochemistry, 47:1569.

-J-

-James, O., Mordecai Alewo .,I. (2014). *In vitro* Antihemolytic Activity of Gymnema Sylvestre Extracts Against Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Induced Haemolysis in Human Erythrocytes. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 232-2748.

-Jayakumar, T.,Thomas, P.A., Geraldine, P. (2009). In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom,Pleurotus ostreatus .*Innovative Food science and Emerging Technologies*, 10:228-234.

-Jokic, D., Velic, M., Bilic, A., Bucić-Kojic, M., Plan, I., Tomas, S. (2010). Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans, *Journal Food Science*, 28: 206-212.

-Jean, V., Jiri, S .(1983).Plantes médicinales.250 illustration en couleur. *Larousse,paris*, 319.

-K-

-Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.j., Rauha,J.P., Pihlaja, K., Kujala,T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 47 : 3954-3962.

-Karuppanapandian, T., Moon, J.H., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W.(2011). Reactive oxygenspecies in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms, *Australian Journal. Crop Science*. 5(6): 709-725.

-Kozlova, E.K., Chernysh, A.M., Moroz, V.V., .Kuzovlev, A.N. (2012). Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*,44:218–227.

-Klein-Galczinsky, C. (1999). Pharmacological and clinical effectiveness of a fixed phytogetic combination trembling poplar (populus tremula), true goldenrod (solidago virgaurea) and ash (fraxinus excelsior) in mild to moderate rheumatic complaints. *Wiener. Medizinische wochenschrift*, 149 : 248–253.

-Kaneko T, Baba N, Matsuo M. (2003). Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chemics Biological Interactions*,142:239-254.

--Karou, D., Dicko, M.H., Simpore, J., Traore, A.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African journal Biotechnol.* 4:823-828.

-Knight, J.A. , Pieper, R.K., Mc Clellan, L.(1988). Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use studies of lipid peroxidation . *Clinical Chemistry*, 34: 2433-8.

-L-

-Lanping , M.A., Zaiqun ,LIU., ZHOU, B.o., YANG, L.i ., Zhongli, LIU.(2000). Inhibition of free radical induced oxidative hemolysis of red cells by green tea polyphenols. *Chinese Science Bulletin*, 45 :2052-2055.

-Laura Bravo, Ph.D. (1998). Polyphenols: *Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance.* 31 7-333.

-Lux, S.E. (1983). Disorders of the red cell membrane skeleton: hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. *In: The Metabolic Basis of Inherited Disease*, ed. Stanbury JB. *McGraw-Hill, New York*, 1573-1605.

-Lopes, GKB., Schulman, H.M., Harmes-Lima.M. (1999). polyphénol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica .Biophysica, Acta*, 1472:142-152.

-M-

-Magalhães., A.S., Silva, M.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B.,Valentão, P., Carvalho, M. (2009). Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *journal of Food and Chemical Toxicology*, 47: 1372–1377.

-Mahmoudi, S., Khali,M., Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.).35-40.

-Makris, D.P., Kefalas, P. (2005).Association between in vitro antiradical activity and ferric reducing power in aged red wines: a mechanistic approach. *Food science Technology International*, 11(1):11-18.

-Maksimovic, Z., Malencic, D., Kovacevic, N. (2005).Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technology*, 96: 873–877.

-Marinaki, A.M., Escuredo ,E., Duley, J.A., Simmonds ,H.A., Amici, A., Naponelli, V., et al.(2001). Genetic basis of hemolytic anemia caused by pyrimidine 5' nucleotidase deficiency. *Blood*, 97:3327-32.

-Mendes, L., Feita,V., Baptista, P.,Carvalho, M. (2011). Comparative antihémolytique and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). *Food and chemical Toxicology*, 2285-2291.

- Mitchell, A.F. (1974)**. A field guide to the trees of Britain and northern Europe (Collins).
- Misra, H.P., Fridovich, J. (1972)**. The generation of superoxide radical during the autooxidation of hemoglobine. *Journal biological chemistry*, 247:6960-6962.
- Mohammedi, Z., Atik, F.(2011)**. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. *Inter. Journal of Pharmacology. Biological. Science*, 2:609-615.
- Morton, N.E., Mackinney, AA., Kosower , N., Schilling, R.F., Gray, M.P. (1962)**. Genetics of spherocytosis.*American journal of Human Genetics*.14:170-84.
- Murray, RDH., Mendez, J., Braun, S.A. (1982)**.The natural coumarins. Chichester *John Wiley and Sons*, 513.
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D.,Mas, E.,Théronid,P. (2008)**. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques.*Annel de Biologie clinique*, 66(6) :605-620.
- Marnett, J. (2002)**. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage *.Toxicology*,182(27):219-222.
- .
- **Mossa, A-T. H., Heikal, T.M, et Mostafa Mohamed Mohafrash, S. (2014)**. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by aspirin and diazinon: the protective role of selenium. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2): S603-S609.
- **Martínez, V., Ugartondo, V., Vinardell, M. P., Torres, J. L., & Mitjans, M. (2012)**. Grape epicatechin conjugates prevent erythrocyte membrane protein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60:4090-4095.

-N-

- Narzck, M., Shahidi, F. (2004)**. Extraction and analysis of phénolics in food. *Journal of Chromatography,A*. 1054:95-111.
- Narzck, M., Shahidi, F. (2006)**. Phenolics in cereals,fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*,41:481-425.Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56 : 31 7-333.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito,Y., gtgègèNoguchi, N. (2005)**. Lipid peroxidation:mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem*. 338:668-676.

-P-

- Parr, A. J., Bolwell, G. P. (2000)**. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 985–1012.
- Park, K.M., Yang, M.C., Lee, K.H., Kim, K.R., Choi, S.U., Lee, K.R.(2006)**. Cytotoxic phenolic constituents of acer tegmentosum maxim. *Archives of Pharmmacol medicine Ressource*, 29: 1086–1090.

-R-

- Rafat, A., Philip, K., Muniandy, S. (2009).** Antioxidant potential and content of phenolic compounds in ethanolic extracts of selected parts of *Andrographis paniculata*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 197–202. ISSN 1996-0875.
- Rameau, J.C., Dumé, G. (1989).** Flore forestière française : Tome 1. Plaines etcollines. *Institut pour le développement forestier*. 457-459.
- Roth, B., Zaharia, H. (2004).** Les plantes médicinales, patrimoine de l'humanité, en danger. *Bulletin du Réseau Semences Paysannes*, 6- 3.
- Rice-Evans, C., Bayasal, E. (1987).** β -Thalassemia. *New England journal of Medicine*, 353:1135-1146.
- Ramchoun, M., Sellam, K., Harnafi, H., Alem, C., Benlyas, M., Khallouki, F., Amrani, S.(2015).** Investigation of antioxidant and antihemolytic properties of *Thymus satureioides* collected from Tafilalet Region, south-east of Morocco. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(2):93-100.
- Raza, H. John, A. (2005).** "Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments", *Toxicology Applied Pharmacology*, (207) :212-220.

-S-

- Sokol, R.J., Booker ,D.J., Stamps, R.(1992).** The pathology of autoimmune haemolytic anaemia. *Journal of clinical pathology*, 45:1047-52.
- Steck, TL. (1974)** .The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review *Journal of cell Biology*, 62:1-19.
- Streichman, S., Gescheidt, Y. (1998).** Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis. *American Journal Hematology* , 58: 206-12.005
- Sundaram, S, Anjum, S., Dwivedi, P., Kumar Rai, G. (2011).** Antioxidant Activity and Protective effect of Banana Peel against Oxidative Hemolysis of Human Erythrocyte at Different Stages of Ripening, *Appl Biochem Biotechnol*. 164:1192–1206.
- Schempp, H., Weiser, D., Elstner, E.F. (2000).** Biochemical model reactions indicative of inflammatory processes. Activities of extracts from *Fraxinus excelsio* and *Populus tremula*. *Arzneimittelforschung*,50:362-372.

-T-

- Tavano, L., Muzzalupo, R., Picci,N., de Cindio, B. (2014).**Co-encapsulation of lipophilic antioxidants into niosomal carriers: percutaneous permeation studies for cosmeceutical applications. *Colloids Surf.B Biointerfaces Journal*, 144-149.
- Tebekeme, O., Diepreye, E. (2012).** Reduction of hydrogen peroxide- induced erythrocyte damage by *Carica papaya* leaf extract. *Asian Pacific, journal of Tropical Biomedicine*, 449-453.

-Tunsaringkarn, T., Soogarun, S., Rungslythin, A., Palasuwan, A. (2012). Inhibitory activity of Heinz body induction in vitro antioxidant model and tannin concentration of in vitro mimosaceous plant extracts. *Journal of medical plants research*, 6(24): 4096-4101.

-V-

-Valent, P., Lechner, K.(2008). Diagnosis and treatment of autoimmune haemolytic anaemias in adults: a clinical review. *Wien Klin Wochenschr*, 120:136-51.

-W-

-Wajcman, H. (2006). Déficits en glucose-6-phosphate- deshydrogénase. EMC (Elsevier SAS Paris), *Hematologie*, 13-006-D-10.

-Wajcman, H. (2006). Anémies hémolytiques dues à des déficits en enzymes érythrocytaires autres que la G6PD. EMC (Elsevier SAS Paris), *Hematologie*, 13-006-D-11. 2006.

-Wallander, E. (2008). Systematics of Fraxinus (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Journal systematics and Evolution*, 273 :25-49.

-Wlodek , L., kusior, D. (2006). Oxidative hémolysis of erythrocytes. *Biochemistry and Molecular Biology*, 34:438-443.

-Widmer, C.C., Pereira,C.P., Gehrig,P.,Vallelian, F., Schoedon,G., Buehler,P.W., Schaer, D.J.(2010). Hemoglobine can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Forum Original Research communications*, 12(2):185-198.

-Wang, W.K., Park, H.S., Ham,I., Oh, M., Namkoong, H., Kim,H.K., Hwang,D.W., Hur,S.Y., Kim, T,E., Park,Y.G., Kim, J.R., Kim,J.W. (2005). Natural compounds, fraxin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress. *Experimental and molecular medicine*, 37(5):436-446.

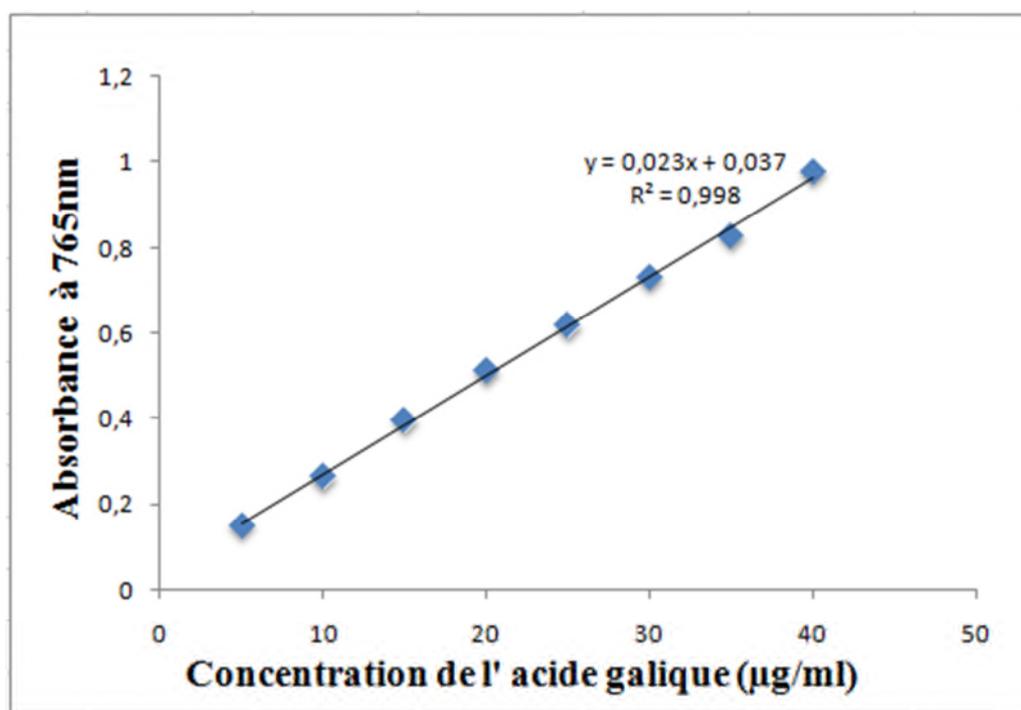
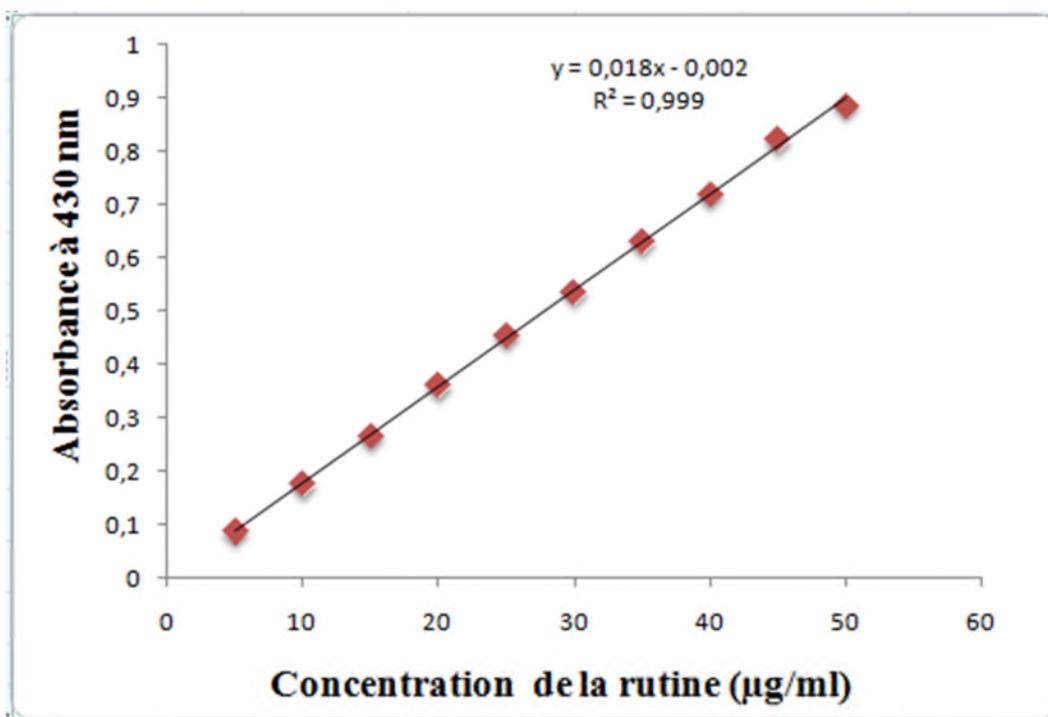
-Watjen, W., et al. (2005). "Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. ", *Journal of Nutrition*, (135

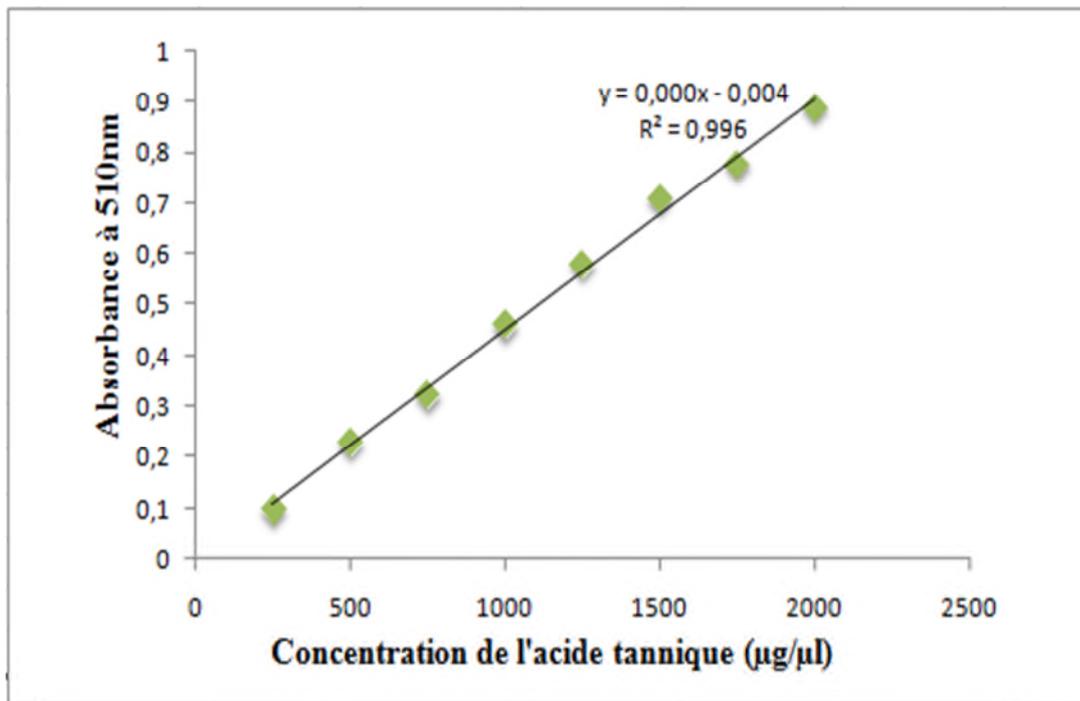
-Z-

-Zanella, A., Fermo, E., Bianchi, P., Valentini, G. (2005). Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *British Journal of Heamatology*, 130:11-25.

-Zhang,A., Zhou,Q.Y., Luk,Y.S., Ho,K.Y., Fung,K.P., Chen,K.Y. (1997). Inhibitory effects of jasmine Green tea epicatechin isomers On free radical-induced lysis of red blood cells. *Lif sciences*, 61:383-394.

Annexes

Annexe I : Courbe d'étalonnage pour dosage des phénols totaux**Annexe II : Courbe d'étalonnage pour dosage des flavonoïdes**

Annexe III : Courbe d'étalonnage pour dosage des tanins

Résumé

L'écorce de *Fraxinus angustifolia* est connue pour son usage en médecine traditionnelle et plus précisément pour le soin des pathologies à caractère liées au stress oxydatif. Ce travail a pour objectif de tester l'effet protecteur de différentes concentrations des extraits éthanolique et aqueux de cette partie de plante contre la peroxydation lipidique et l'hémolyse induites par le H₂O₂ (8mM), mené *in vitro* sur un modèle membranaire des érythrocytes humains. D'autres parts, la toxicité de ces extraits a été étudiée et leurs contenus en phénols totaux, flavonoïdes et tanins ont été estimés par des dosages colorimétriques. Les résultats démontrent que l'extrait éthanolique présente une teneur deux fois plus élevée en phénols totaux, flavonoïdes et tanins que l'extrait aqueux. Il a exhibé un effet toxique (85 %) à de fortes concentrations (2000 µg/ml), par contre, l'extrait aqueux n'a présenté aucun effet toxique dans la marge de concentrations testée. Cependant, les concentrations ne présentant pas d'effet hémolytique ont été testées pour leur effet préventif, effectivement, elles ont montré une activité anti-hémolytique de 97,61 % à 500 µg/ml pour l'extrait éthanolique et 87,93 % à 2000 µg/ml pour l'extrait aqueux. De même, leur effet anti-péroxydant a été estimé de 98,82% à 500 µg/ml et 96,61% à 2000µg/ml, respectivement. En conclusion, ces résultats renforcent la base scientifique et justifient l'utilisation de *Fraxinus angustifolia* dans le traitement traditionnel et la prévention des pathologies liées au stress oxydatif.

Mots clés : *Fraxinus angustifolia*, composés phénoliques, anti-hémolytique, antipéroxydant, H₂O₂.

Abstract:

Fraxinus angustifolia stem bark is known for its use in traditional medicine and more precisely to prevent oxidative stress related pathologies. The objective of this work is to test the protective effect of different concentrations of the ethanolic and aqueous extracts of this plant part against lipid peroxidation and haemolysis induced by H₂O₂ (8 mM), carried out *in vitro* on a membrane model of human erythrocytes. First, the toxicity of these concentrations was studied and their content in total phenols, flavonoids and tannins was estimated by colorimetric assays and then followed by anti-haemolytic and antioxidant assays. The results show that the ethanolic extract has a twice higher content of total phenols, flavonoids and tannins than the aqueous one. It exhibited a high level of hemolysis (85 %) at high concentrations (2000 µg / ml), however no toxic effects were showed by all tested concentrations of the aqueous extract. These non haemolytic concentrations were assayed for their preventive effect, indeed they showed anti-haemolytic activity of 97,61% to 500 µg/ml for the ethanol extract and 87,93% to 2000 µg / ml for the aqueous extract. Moreover, their anti-peroxidant effects were estimated to 98,82% at 500 µg/ml and 96,61% at 2000 µg/ml, respectively. In conclusion, these results reinforce the scientific basis and justify the use of *Fraxinus angustifolia* in the traditional treatment and prevention of oxidative stress related pathologies like anti-haemolytic diseases.

Keywords : *Fraxinus angustifolia*, phenolics, anti-haemolytic, antiperoxidant, H₂O₂.

ملخص

إن لحاء فراكسينوس أنغستيفوليا معروف لاستخدامه في الطب التقليدي خاصة لرعاية الأمراض المتعلقة بالإجهاد التأكسدي، الهدف من هذا العمل هو اختبار التأثير الوقائي لتركيزات مختلفة من المستخلصات الإيثانولية و المائية لهذا الجزء النباتي ضد إنحلال الدم الناجم عن 8 ميليمول من بيروكسيد الهيدروجين، التي أجريت في المخبر على نموذج غشاء الكريات الحمراء من ناحية أخرى، تمت دراسة سمية هذه المستخلصات وتم تقدير محتواها في الفينول الكلي، الفلا فونويد و العفص بواسطة المقاييس اللونية. أظهرت النتائج أن المستخلص الإيثانولي يحتوي على محتوى أعلى مرتين من الفينول الكلي، الفلافونويد و العفص، و قد أظهر تأثير سمي بـ 85% بتركيزات عالية (2000 ميكروغرام /مل). من ناحية أخرى ، لم يظهر المستخلص المائي أي آثار سامة عند التركيزات التي تم اختبارها. لقد تم اختيار التركيزات التي لا تظهر تأثير إنحلال الدم من أجل تأثيرها الوقائي، حيث أظهرت نشاط مكافحة إنحلال الدم بـ 97.61% عند 500 ميكروغرام /مل لمستخلص الإيثانول و 87.93 % عند 2000 ميكروغرام/مل للمستخلص المائي. كما تم تقدير نشاطها المضاد للأوكسدة بـ 98.82 % عند 500 ميكروغرام/مل للمستخلص الإيثانولي و بـ 96.61 % عند 2000 ميكروغرام/مل للمستخلص المائي. في الخاتمة، هذه النتائج تعزز الأساس العلمي وتبرر إستخدام فراكسينوس أنغستيفوليا في العلاج التقليدي و الوقاية من الأمراض المرتبطة بالأوكسدة.

الكلمات الرئيسية: فراكسينوس أنغستيفوليا، الفينول، مكافحة انحلال الدم، النشاط المضاد للأوكسدة، بيروكسيد الهيدروجين.