

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de BEJAIA
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire de Fin de Cycle

En Vue de l'Obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures
en Biologie cellulaire et moléculaire
Option : Biochimie

Thème

**Activité antioxydant, *in vivo*, des extraits
de feuilles d'une plante médicinale
*Fraxinus angustifolia***



Présenté par :

M^{lle} BOUTEGRABET Sabah

M^{lle} CHEURFA Nabila

Membres de Jury

Présidente: M^{lle} LAIB Yasmina

Examinatrice : M^{lle} TAHIRI Wahiba

Promotrice : M^{lle} CHERAFT Nassima

Promotion 2012



Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu le tout- puissant, de nous avoir donné la force et la patience de pouvoir mener ce travail à terme.

Nous tenons à exprimer nos gratitudee et nos sincères remerciements à notre promotrice M^{elle} Cheraft .N pour nous avoir proposé ce sujet très intéressant, sa disponibilité malgré ses nombreuses charges, ses encouragements, ses conseils et orientations.

Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury: M^{elle} Laib .Y qui nous à fait honneur par sa présence en qualité de présidente de jury et à M^{elle} Tahiri .W qui a accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements sont également exprimés à tous le personnel du laboratoire de Biochimie Appliquée, au premier lieu Mme Atmani, Mme Debbache, Mme Rahmani, M^{lle} Ayouni, M^{lle} Chaher, M^{lle} Tahiri, M^{lle} Sebaihi, l'ingénieure du labo M^{lle} Saidene Naima sans oublier l'ensemble des étudiants en particulier notre équipe: Ahmed, Baya, Katia, Nora, Ghania et Karima.

Enfin, mes remerciements s'adressent à M^{lle} Boucheffa, à tous les enseignants et à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de réalisation de ce travail.

M^{elle} Boutegrabet Sabah

M^{elle} Cheurfa Nabila



édicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents, qui m'ont soutenue tout au long de mes études, que Dieu les protège et leur procure le bonheur, la bonne santé et une longue vie.

A mes adorables et très chères sœurs : Meriem, samia, kamel, kahina et djaouida.

A mes très chers grands pères et grandes mères paternelles et maternelle.

A mes très chers Cousins, cousines, oncles et tantes.

A mon très cher fiancé Noureddine qui est toujours à mes cotés, qui me soutiens et qui m'encourage énormément sans oublier toute sa famille Yahiaoui.

A mes très chères copines : les deux Samira, Akila, Siham, Assia, Maria et Djamila.

A mes très bons amis qui m'ont beaucoup aidé : Walid, Faham, Fares, Rbiha, Zobir, Lyes, Boualam, Dalil et sans oublier le couple soualems.

Tout la promotion Biochimie 2011 /2012

Ma chère collègue et mon amie Nabila qui ma accompagnée durant ce travail et sa famille.

En fin à toute personne qui m'est chère au cœur et qui m'a aidé de près ou de loin.

SABAH





Dédicaces

Je dédie ce travail

*A mes très chers parents, qui m'ont soutenue tout au long de mes études,
que Dieu les protège et leur procure le bonheur, la bonne santé et une longue vie.*

A mon adorable et très chère sœur : Lydia

A mes très chers frères : Raid, Hafid et Kossaila

A mes grands-mères: Djida Tata et Zahra

A tous mes Oncles et ma Tante

A tous mes Cousins et Cousines.

A toutes mes copines de Chambre :Saloua ,koço

A mes copines : Rahima, Nadia ,Souad, Fatiha, kamilia ,et nadjwa

A mes amis : Lyes, Zoubir, Kamel, Fahme, Taher ,Saad et Djamel

*A ma chère binôme et mon amie Sabah qui ma accompagnée durant ce travail et toute sa
famille*

Tout la promotion Biochimie 2011 /2012

En fin à toute personne qui m'est chère au cœur et qui m'a aidé de près ou de loin.

NABILA



Étude bibliographique

I. Les radicaux libres.....	02
I.1. Définition	02
I.2. Classification.....	02
I.3. Sources	02
I.4.Effet bénéfique des radicaux libres	05
1.4. Stress oxydant.....	06
1.5. Cibles biologiques des radicaux libres.....	06
I.6. peroxydation lipidique.....	07
I.6.1. Définition.....	07
I.6.2. Les facteurs inducteurs de la peroxydation lipidiques.....	07
I.6.3. Mécanisme généraux de l'oxydation des lipides.....	07
I.7.Définition d'un antioxydant.....	15
I. 7.1 .Les antioxydants enzymatiques.....	15
I.7.2. Systèmes antioxydant non enzymatiques.....	15
I.7.3. Autres antioxydants	16
I.8.4.Définition de la bilirubine	17
I.8.4.1.Structure.....	17
I.8.4.2. Fonction biologique.....	18
I.9. Les composés Phénoliques.....	19
I.9.1. Définition.....	19
I.9.2. Biosynthèse des composés phénoliques.....	19
I.9.3. La classification des composées phénoliques	20
I.9.3.1. Les phénols simples.....	21
I.9.3.2.Les flavonoïdes.....	21
I.9.3.3.Les tannins.....	23
I.9.3.Les activités biologiques des composés phénoliques.....	24
I.10. Mécanismes d'action de système antioxydant sur la peroxydation lipidique.....	24

Partie pratique

II. Matériel et méthodes.....	27
II.1. Matériel végétal.....	27

II.1.1. Description.....	27
II.1.2. Composition chimique de <i>Fraxinus angustifolia</i>	28
II.1.3. Propriétés et usage	28
II.2. Méthodes.....	28
II.2.1. Préparation la poudre végétale	28
II.2.1.1. Récolte du matériel végétal	28
II.2.1.2. Séchage, broyage et tamisage.....	29
II.2.1.3. Extraction des composés phénoliques.....	29
II.2.2. Expérimentation animal.....	32
II.2.2.1. Choix des Animaux	32
II.2.2.2. Traitement des animaux	32
II.2.2.3. Prélèvement du sang et sacrifice des animaux	33
II.2.2.4. Dosage des protéines	34
II.2.2.5. Dosage de Bilirubine.....	34
II.3. Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité antioxydant de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	34
II.3.1. La peroxydation lipidique.....	34
II.3.1.1. Le principe de la méthode.....	34
II.3.1.2. Procédure expérimentale.....	35
II.4. Poids relatif de foie.....	37
II.5. Evaluation statistique.....	38
III. Résultats et discussions.....	38
III.1. Extraction.....	38
III.2. Poids corporel des souris.....	39
III.3. Poids relatif des souris.....	40
III.4. Dosage de la bilirubine.....	41
III.5. Évaluation de fonction de foie.....	44
III.5.1. Mesure du pouvoir antioxydant par la mesure de taux de MDA.....	44
III.6. Corrélations	48
III.6.1. Corrélation entre le taux de MDA et le poids corporel des souris.....	48
Conclusion et perspectives	49
Références bibliographiques.....	50
Annexes	

Liste des figures

Figure 01: sources endogènes et exogènes des radicaux libres	05
Figure 02 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR	06
Figure 03 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique...08	
Figure 04 : Initiation de la peroxydation lipidique	09
Figure 05 : Propagation de la chaîne de peroxydation lipidique	10
Figure 06 : Autoxydation de l'acide linoléique par l'oxygène singulet et l'oxygène triplet	12
Figure 07 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés	13
Figure 08 : Conséquences cellulaires de la peroxydation lipidique	14
Figure 09 : Catabolisme de Heme, formation de la bilirubine IX du heme IX.....	18
Figure 10 : Voies de biosynthèse des composés phénoliques.....	20
Figure 11 : Structures chimiques des acides phénoliques	21
Figure 12 : Structure de base des flavonoïdes	22
Figure 13 : Structure chimique de base de différents flavonoïdes	22
Figure 14 : Exemple de structure de tannins hydrolysables (Gallotannin)	23
Figure 15 : Exemple de structure d'un tannin condensé	23
Figure 16 : Interaction d'un composé phénolique avec un radical lipidique	26
Figure 17 : Régénération de la vitamine E via l'action de la vitamine C lors de la peroxydation lipidique	26
Figure 18 : Photographie du matériel végétal de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	28
Figure19: Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction	31
Figure 20: Les souris de variété albinos	32
Figure 21 : Le gavage gastrique des souris.....	32
Figure 22: Formation du chromogène par condensation du TBA avec le MDA	35
Figure 23: Protocole de la peroxydation lipidique	36
Figure N°24: Taux de peroxydation lipidique en terme de MDA	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les radicaux libres avec leurs réactions	03
Tableau II : Les réactions catalysées par les antioxydants enzymatiques.....	16
Tableau III : Principales activités biologiques des composés phénoliques	24
Tableau IV : Systématique de <i>Fraxinus angustifolia</i>	27
Tableau V : Le Taux d'extraction des extraits des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	38
Tableau VI : La variation de poids corporel des souris de différents lots	39
Tableau VII : Poids relatif des foies des souris.....	41
Tableau VIII: Les résultats de dosage de bilirubine dans le sérum des groupes de souris....	42



Introduction


Dans des conditions normales, l'organisme produit en permanence des molécules hautement réactives, bénéfiques pour l'homéostasie cellulaire à de faibles doses, il s'agit des Espèces réactives oxygénées (ERO). La surproduction de ces dernières provoquent des effets délétères sur les macromolécules notamment les lipides, et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés qui sont facilement oxydables. Ceci conduit à une réaction en chaîne de peroxydation lipidique.

Ce phénomène oxydatif peut être responsable de nombreuses altérations tant structurales, que fonctionnels, participant à l'apparition de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et d'autres. **(Koechlin-Ramonatxo, 2006)**

Une supplémentation aux antioxydants enzymatiques par la vitamine C et E, a été proposée comme un traitement complémentaire réduisant la propagation de la peroxydation lipidique au cours d'un stress oxydant. Ainsi, plusieurs métabolites secondaires dont les composés phénoliques, isolés à partir de plantes ont montré une activité antioxydant et une capacité de prévenir l'oxydation des lipides **(Hannebelle et al., 2004)**.

C'est dans cette optique, que les feuilles d'une plante, *Fraxinus angustifolia*, largement utilisée en médecine traditionnelle locale, ont été choisies dans cette étude visant, évaluation *in vivo* de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de cette plante, l'effet inhibiteur de peroxydation lipidique induit par Le tétrachlorure de carbone (CCL₄). Pour cela deux parties ont été établies :

- ❖ Une synthèse bibliographique comportant des généralités sur les radicaux libres, le stress oxydant, la peroxydation lipidique et les antioxydants.
- ❖ Une partie expérimentale qui consiste à extraire les polyphénols à partir des feuilles de *Fraxinus angustifolia*, puis à l'étude du pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux par la mesure du taux du malonyldialdéhyde (MDA), produit final de la peroxydation lipidique.



Synthèse
Bibliographique

I. Les radicaux libres

I.1. Définition

Un radical libre est une espèce chimique (molécule ou atome), qui possède un ou plusieurs électrons non apparié (s) sur leur couche externe (**Berger, 2006 ; Valko et al., 2007**). Cette structure électronique déséquilibrée leur confère une grande réactivité sur les structures cellulaires (**Aurousseau, 2002**). Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente, pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radicalaire (**Kœchlin-Ramonatsco, 2006**). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Favier, 2003**).

I.2. Classification

Les radicaux libres et leurs dérivés ont été classés suivant l'élément qui porte l'électron célibataire. Ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) représentent la plus importante classe d'espèce radicalaire générée dans les organismes vivants (Tableau N° I) (**Valko et al., 2007**).

I.3. Les sources

Les radicaux libres sont produits par un grand nombre de sources tant endogènes qu'exogènes (Figure N°01).

I.3.1. Sources exogènes

Les radicaux libres peuvent être produits en excès à cause des agents externes environnementaux comme la fumée de cigarette, le tabac, l'exposition aux rayons UV et les radiations ionisantes (**Kirkham et al., 2006**).

Ainsi que les métaux de transition comme le fer et le cuivre. Par ailleurs d'autres toxiques comme le chrome, le vanadium peuvent facilement céder un électron par les réactions d'oxydoréduction et générer ainsi les radicaux hydroxyles à partir de H₂O₂ (**Valko et al., 2006**).

I.3.2. Sources endogènes

A l'état physiologique, il existe lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, une fuite d'électrons au niveau du complexe I et III, à l'origine de la production

des radicaux libres (Kœchlin-Ramonatsco, 2006). Par ailleurs, les cellules phagocytaires sont une source importante de production des produits des ERO (Favier, 2003).

Tableau I : Les radicaux libres avec leurs réactions

Espèces réactives	Symbole chimiques	La réaction	Commentaire
Oxygène Singulet	(¹ O ₂)	<p style="text-align: center;">Myéloperoxydase</p> $\text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{}^1\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}$	L' ¹ O ₂ est une forme excitée d'oxygène moléculaire, il est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Milan, 2004).
Anion superoxyde	(O ₂ ^{°-})	<p style="text-align: center;">Cytochrome</p> $\text{O}_2 + 1\text{é} \longrightarrow \text{O}_2^{\circ-}$ <p style="text-align: center;">NADPH oxydase</p> $\text{NADPH} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + \text{O}_2^{\circ-}$	Le radical superoxyde O ₂ ^{°-} est peu réactif, mais représente un précurseur d'espèces agressives (Gutteridge, 1990).
Radical hydroxyde	([°] OH)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{++} \longrightarrow \text{}^{\circ}\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{+++}$ <p>(reaction de fenton).</p> $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\circ-} \longrightarrow \text{}^{\circ}\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$ <p>(Reaction de Haber Weiss).</p>	Le radical hydroxyle est très réactif et hautement toxique, il est considéré le plus dangereux des ERO (Valko et al., 2007).
Peroxyde d'hydrogène (eau oxygéné)	(H ₂ O ₂)	$\text{O}_2^- + \text{O}_2^{\circ-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ <p style="text-align: center;">Glucose Oxydase</p> $\text{O}_2 + 2\text{é} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	Le peroxyde d'hydrogène est produit, en grande partie, lors de la neutralisation du radical superoxyde en présence de (SOD) (Afonso et al., 2007).

<p>Peroxynitrite</p>	<p>(ONOO⁻)</p>	$\text{NO}^\circ + \text{O}_2^{\circ-} \longrightarrow \text{ONOO}^-$	<p>Le peroxynitrite, est très oxydant et forme de nouvelles espèces actives, dont certaines sont radicalaires ($\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{NO}_2$), à la base de nitrations et d'hydroxylations (Deby-Dupont et al., 2002).</p>
<p>Radical peroxyde</p>	<p>ROO[°]</p>	$\text{R}^\circ + \text{O}_2 \longrightarrow \text{ROO}^\bullet$	<p>Le radical peroxyde est très réactif, formé par addition d'O₂ sur les radicaux libres carbonés issu de la peroxydation lipidique (Gutteridge, 1995 ; Lee et al., 2004).</p>
<p>Le radical alcoxyle</p>	<p>RO[°]</p>	$2\text{ROOH} \xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\text{Complexe (Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3})} \text{RO}^\circ + \text{ROO}^\circ +$	<p>Le radical alcoxyle est issu de la dégradation des peroxydes organiques en présence du complexe (Fe⁺²/Fe⁺³) (Gutteridge, 1995).</p>

D'autres sources enzymatiques, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites cellulaires, peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire, xanthine oxydase, enzymes de la voie de l'acide arachidonique, enzyme de réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450) et peroxysomes (**Beaudeau et al., 2006**) (Figure N 01).

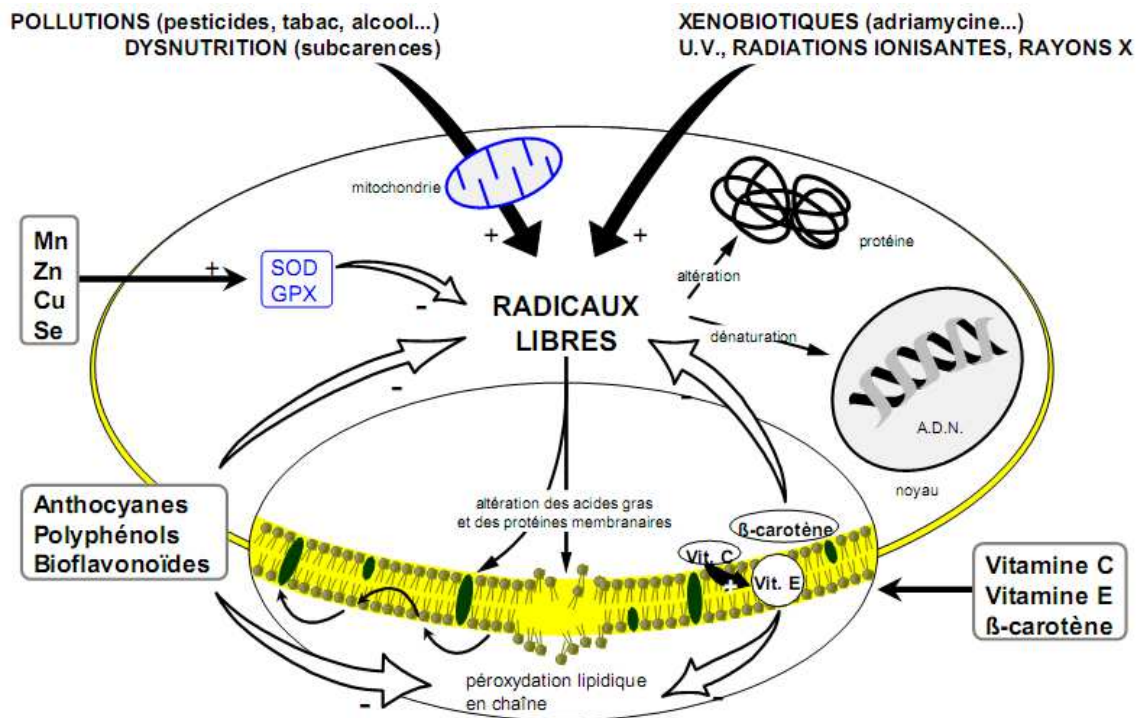


Figure N° 01 : les sources endogènes et exogènes des radicaux libres (Afonso, 2007).

I.4. Effet bénéfique des radicaux libres

Bien que les radicaux libres sont susceptible d'engendrer un nombre considérable de dommages oxydatifs, elle restent indispensables à la vie car elle jouent un rôle important dans le contrôle de différents processus cellulaires physiologiques (la croissance, la migration, la sénescence, l'apoptose), en intervenant comme seconds messagers (**Bonnefont et al., 2002**). Ils sont capables d'induire des modifications fonctionnelles de multiples protéines impliquées dans l'homéostasie vasculaire, l'augmentation de leur production au niveau vasculaires entraine une activation endothéliale , une réponse inflammatoire et la prolifération des cellules musculaires lisses ,a l'origine de la lésion athéroscléreuse (**Beaudeau et al., 2006**).

De plus ces radicaux libres participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, la défense immunitaire contre les agents pathogènes (**Pincemail et al., 2001 ; Valko et al., 2007**), la destruction par apoptose des cellules tumorales, la différenciation cellulaire, la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire ainsi que la fécondation de l'ovule (**Favier, 2003**).

I.5. Stress oxydant

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à doses physiologiques. Cette production est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense maintenant l'équilibre de la balance antioxydants /pro-oxydants. Suite à un déficit en antioxydants ou à une surproduction des ERO, un état de stress oxydant sera signaler (Favier, 2003).

I.6. Les cibles biologiques des radicaux libres

L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Helliwell et al., 2004; Valko et al., 2006) (Figure N°02).

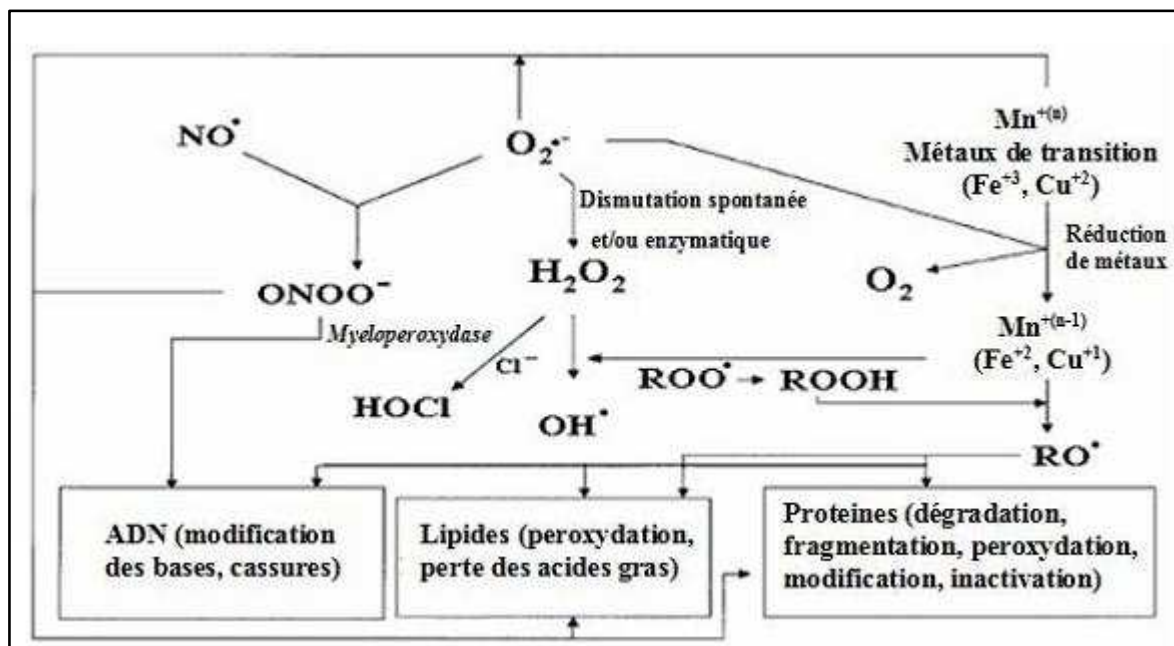


Figure N°02 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR (Kohen et Nyska, 2002).

L'attaque radicalaire inactive le fonctionnement des protéines mais aussi, elle les rend particulièrement vulnérables à l'action des protéinases. Les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont les nitrotyrosines et les composés carbonylés résultants de l'oxydation des acides aminés par les radicaux oxygénés libres ((Kohen et Nyska, 2002).

Ces derniers peuvent aussi provoquer des lésions au niveau des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. Certaines attaquent les bases, d'autres induisant des cassures dans les brins d'ADN. L'un des marqueurs d'une attaque oxydative des acides nucléiques est la présence de 8-hydroxy-guanine (8-OH-G) (**Ré, 2005**). Comme ils provoquent une fragmentation des polymères des glucides comme l'acide hyaluronique qui maintient la viscosité élevée du liquide synovial (**Pasquier, 1995**).

I.7. La peroxydation lipidique

Les lipides sont des molécules énergétiques mais aussi des molécules signales et font partie intégrante des membranes cellulaires. Parmi les lipides membranaires, les phospholipides sont les plus abondants, qui sont riches en acides gras polyinsaturés (**Genot, 2010**). Ces derniers sont la cible privilégiée des ERO en raison de leur richesse en doubles liaisons qui sont particulièrement susceptibles à l'attaque radicalaire (**Pasquier, 1995**).

I.7.1. Définition

La peroxydation lipidique est définie comme étant la détérioration oxydative des (AGPI), tels que les acides linoléique et arachidonique qui sont facilement oxydables conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables. Cela engendre la désorganisation complète de la membrane en altérant ses fonctionnements d'échange et d'information par modification de sa fluidité et sa perméabilité (**Ré et al., 2005**).

I.7.2. Les facteurs inducteurs de la peroxydation lipidiques

Les facteurs qui provoquent l'oxydation des lipides sont nombreux, il s'agit des facteurs endogènes, caractérisant la nature ou la qualité du corps gras (le nombre et la position des insaturations) et des facteurs exogènes tels que la présence d'ions métalliques, des systèmes enzymatiques, les ERO, la lumière, le PH et la température (**Genot et al., 2010**).

I.7.3. Mécanisme généraux de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

I.7.3.1. Voie enzymatique

Le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés peut être d'origine enzymatique. Les deux enzymes principalement impliquées dans ce phénomène sont la lipoxygénase et la cyclooxygénase (**Gutteridge, 1995**).

- La lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé selon une réaction stéréospécifique et aboutit à la formation d'hydroperoxydes. Elle agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés. Son activité est souvent couplée avec celle des lipases et phospholipase (**Pokorny et al., 2001**).
- La cyclooxygénase est l'autre enzyme impliquée dans la peroxydation des lipides, c'est une lipoxygénase qui incorpore deux molécules d'oxygène au niveau d'un acide gras pour former des hydroperoxydes spécifiques (**Gutteridge, 1995**) (Figure 03).

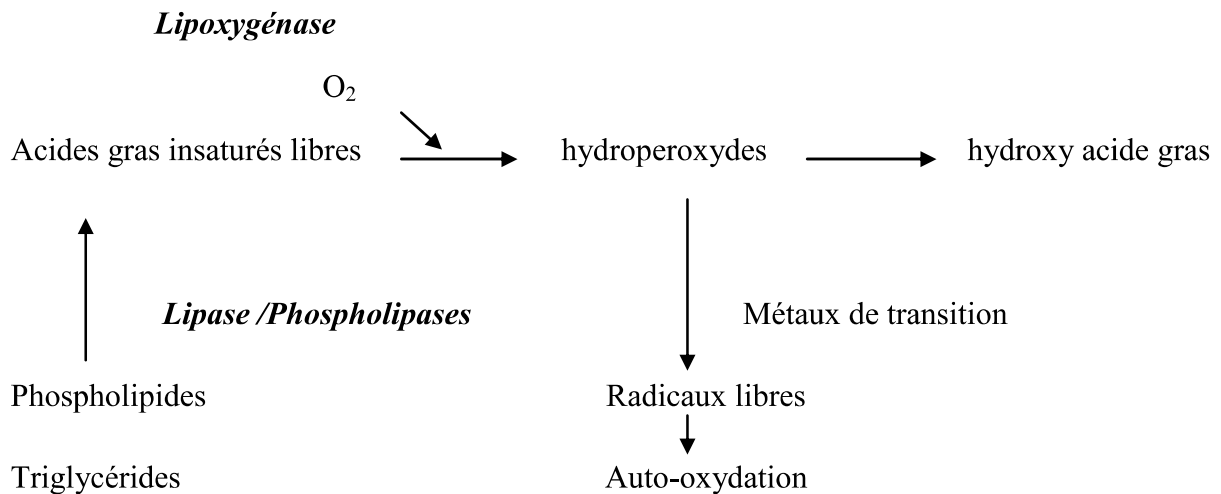


Figure N° 03 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique (**Eymard, 2003**).

I.7.3.2. l'autoxydation

La caractéristique de l'autoxydation des AGPI par l'oxygène à l'état fondamental (3O_2) est d'être une réaction en chaîne radicalaire qui se déroule en trois étapes (**Cillard et al., 2006** ; **Antolovich et al., 2001**).

a) Phase d'initiation :

C'est une phase très lente, en présence de fer (initiateur), elle débute par l'attaque d'un radical libre (radicaux hydroxyles, peroxydes, oxygène singulet...), entraînant l'abstraction d'un atome d'hydrogène du groupement (CH₂) d'un acide gras polyinsaturé (RH) qui aboutit à la formation d'un radical centré sur l'atome de carbone (R°) (réaction 1) . Ce dernier stabilisé par un réarrangement électronique conduisant à la formation de deux diènes conjugués, signe de la présence d'un stress oxydant. (Armelle, 2004 ; Bonnefont et al., 2002 ; Cillard et al., 2006).

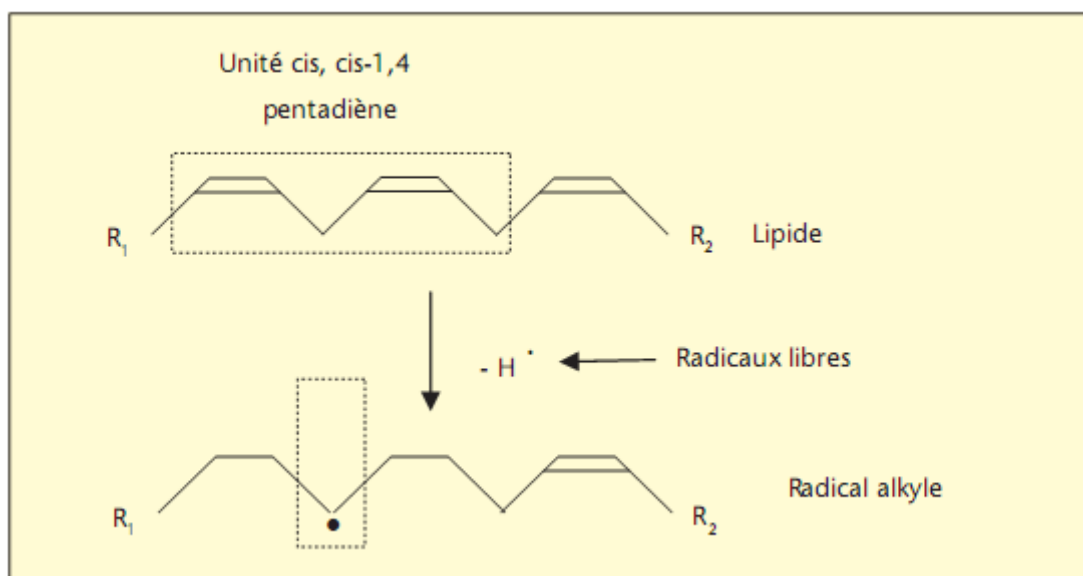
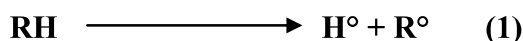


Figure N° 04 : Initiation de la peroxydation lipidique (Cillard et al., 2006).

Dans les conditions d'aérobioses, le radical libre (R°) se combine avec l'oxygène pour donner un radical peroxyde (ROO°) (Bonnefont et al., 2002) .

b) Phase de propagation

Le radical peroxyde ROO° est capable à son tour d'arracher un atome d'hydrogène d'un autre acide gras polyinsaturé en donnant un hydroxyde (ROOH) et un nouveau radical (R°) (Réaction 2). Ce dernier réagit avec l'O₂ pour former un autre radical peroxyde (ROO°) (réaction 3), capable de transformer un autre acide gras polyinsaturé en radical lipidique pour former un hydroperoxyde lipidique (ROOH), créant ainsi une réaction en chaîne de la peroxydation, En présence de métaux, (Fer, cuivre) les hydroperoxydes (ROOH) forment les radicaux alkoxydes (RO°) et hydroxydes (°OH) (Bonnefont et al., 2002 ; Armelle, 2004 ; Ré et al., 2005) .

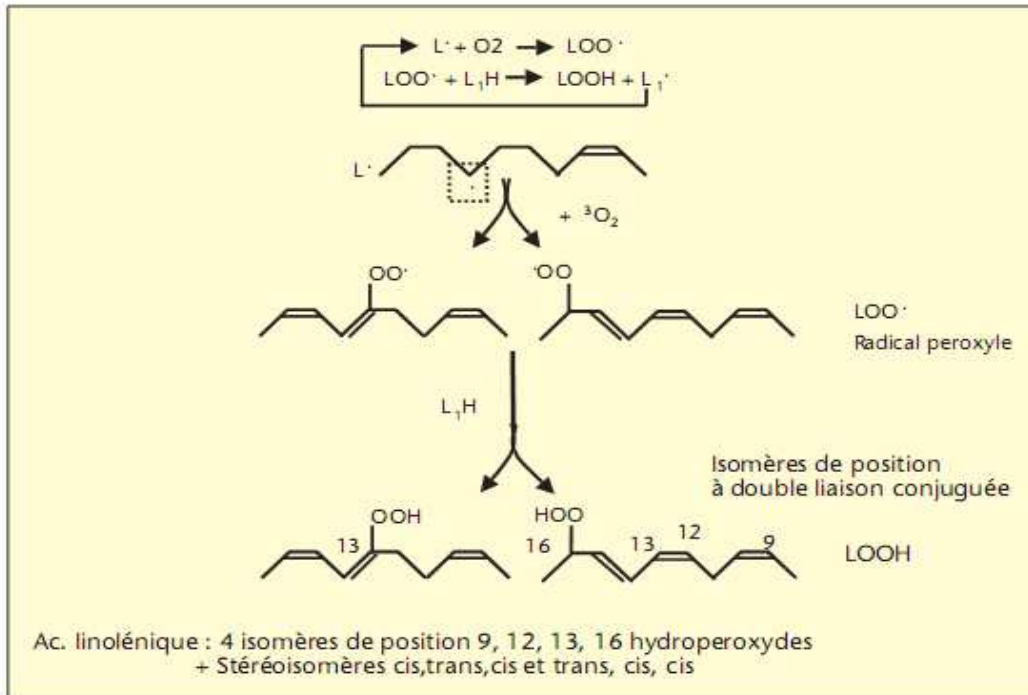


Figure N° 05 : Propagation de la chaîne de peroxydation lipidique (Cillard et Cillard, 2006).

c) Terminaison

Au cours de cette phase, y'aura stabilisation des radicaux libres. Le radical (R°) réagit avec un autre radical libre (ROO°) ou (R°), ce qui permet la neutralisation des radicaux libres lipidiques en s'associant entre eux pour donner des produits non radicalaires (réaction 4, 5, 6) (Cillard et Cillard, 2006 ; Laguerre et al., 2007).



La terminaison peut également avoir lieu en faisant intervenir des molécules antioxydantes qui jouent le rôle de piègeur de radicaux interrompant ainsi la réaction en chaîne tel que la vitamine E (Ré et al., 2005 ; Laguerre et al., 2007).

d) Photo-oxydation

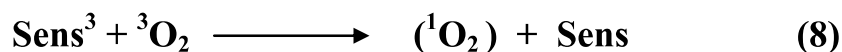
La photo-oxydation est une voie importante de production d'hydroperoxydes en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs (Armelle et al., 2004). Grâce à la présence nécessaire d'un agent photosensibilisateur (pigments type chlorophylle, certains colorants, certaines vitamines), l'oxygène moléculaire est activé, passant de son état fondamental dit « triplet » à un état excité dit « singulet » (Cillard et Cillard, 2006).

Les photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes (Frankel, 1998).

- **Les photosensibilisateurs de type I**, ils agissent comme les radicaux libres initiateurs telle que la riboflavine. Dans leur état triplet, elles arrachent un atome d'hydrogène ou un électron aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène (réaction 7).



- **Les photosensibilisateurs de type II**, telle que la chlorophylle et l'érythrosine, réagissent dans leur état excité (Sens^3) avec l'oxygène triplet (réaction 8) auquel elles transfèrent leur énergie pour donner de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$).



L'oxygène singulet ainsi formé est très électrophile et peut réagir directement sur un acide gras insaturé (RH) formant ainsi un hydroperoxyde ROOH (réaction 9).



Par la suite, interviennent les réactions radicalaires en chaîne de l'auto-oxydation. Les hydroperoxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par auto-oxydation (Frankel,1998)

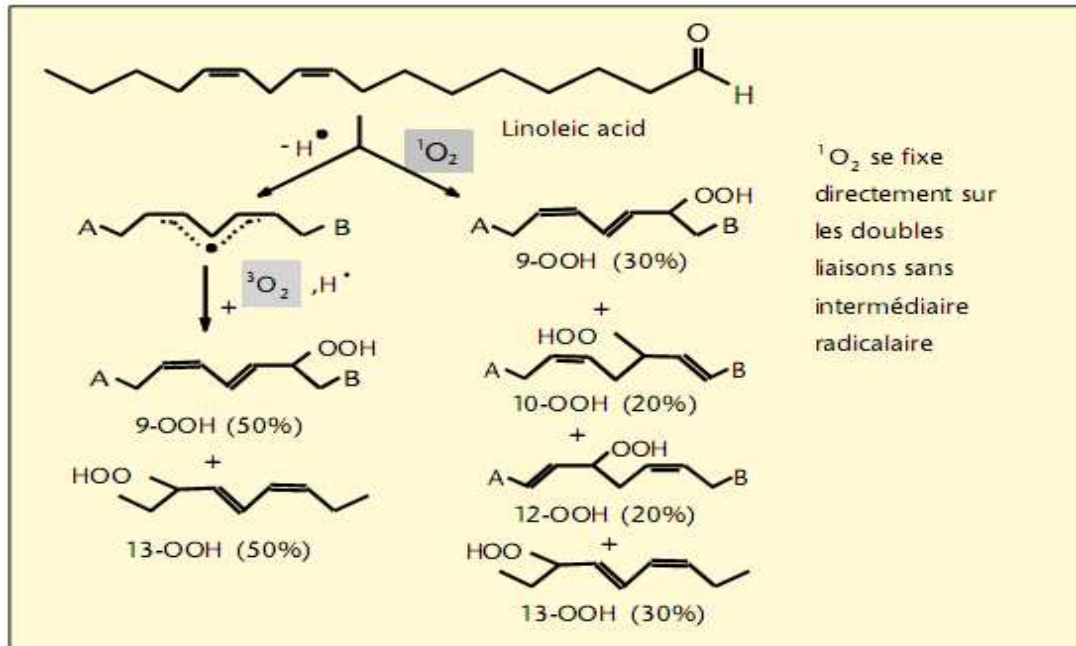


Figure N° 6 : Autoxydation de l'acide linoléique par l'oxygène singulet et l'oxygène triplet (Cillard et Cillard , 2006).

I.7.4. Les produits de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique fournit une grande variété de produits. En effet, la décomposition des produits primaires d'oxydation est un mécanisme complexe dans lequel un hydroperoxyde simple peut produire plusieurs types de molécules volatiles (des hydrocarbures, des aldéhydes, des alcools et des cétones) ou non-volatiles (triacylglycérols oxydés et leurs polymères) selon le type de scission des doubles liaisons dans la chaîne d'acide gras (Laguerre et al., 2007). D'autres composés secondaires sont également formés, y compris l'isoprostane ou 4-hydroxynonéal ou HNE et le malonodialdéhyde (MDA). Ces derniers sont appelés aussi produits terminaux stables, qui peuvent être mesurés dans le plasma et dans les urines en tant que marqueurs du stress oxydant (Çanakçi et al., 2005 ; Ann, 2008).

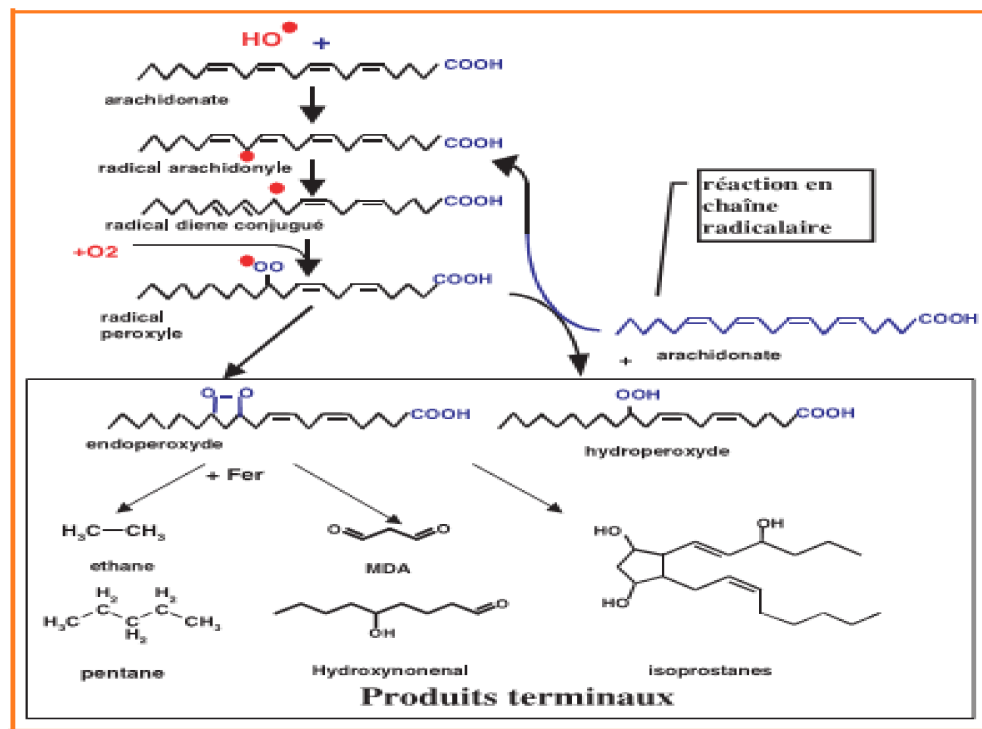


Figure N °7: Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

- **Les malondialdéhyde (MDA)**

Le MDA est un produit de décomposition oxydative de lipides insaturés, comme produit secondaire du métabolisme de l'acide arachidonique. L'excès de MDA produit dans un tissu peut se combiner aux groupements amines libres des protéines (essentiellement les résidus lysines) (Ann, 2008).

- **Isoprostanes**

Isoprostanes sont des biomarqueurs du stress oxydant, des eicosanoïdes cycliques formés d'une manière non enzymatique *in vivo*, lors de la peroxydation lipidique d'acides gras polyinsaturés (AGPI) libres ou estérifiés dans les phospholipides membranaires (Ann, 2008).

I.7.5. Conséquences de la peroxydation lipidiques

Les conséquences de la peroxydation lipidique sont très nombreuses, en effet, les hydroperoxydes instables en se décomposant donnent de nouveaux radicaux libres provoquant

des oxydations des biomolécules, mais aussi des aldéhydes réactifs qui établissent des adduits sur les groupements NH_2 des biomolécules tels que les protéines.

Cela par oxydation de leurs fonctions thiols altérant ainsi leurs structures et leurs fonctions (perte d'activités des enzymes et des récepteurs). Aussi, toutes les structures de la cellule seront touchées et particulièrement les membranes (plasmiques, mitochondriale, lysosomale). A cet effet, de nombreuses pathologies sont engendrées par la peroxydation des lipides notamment les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, le cancer, les maladies inflammatoires, et le vieillissement... (Cillard et Cillard, 2006).

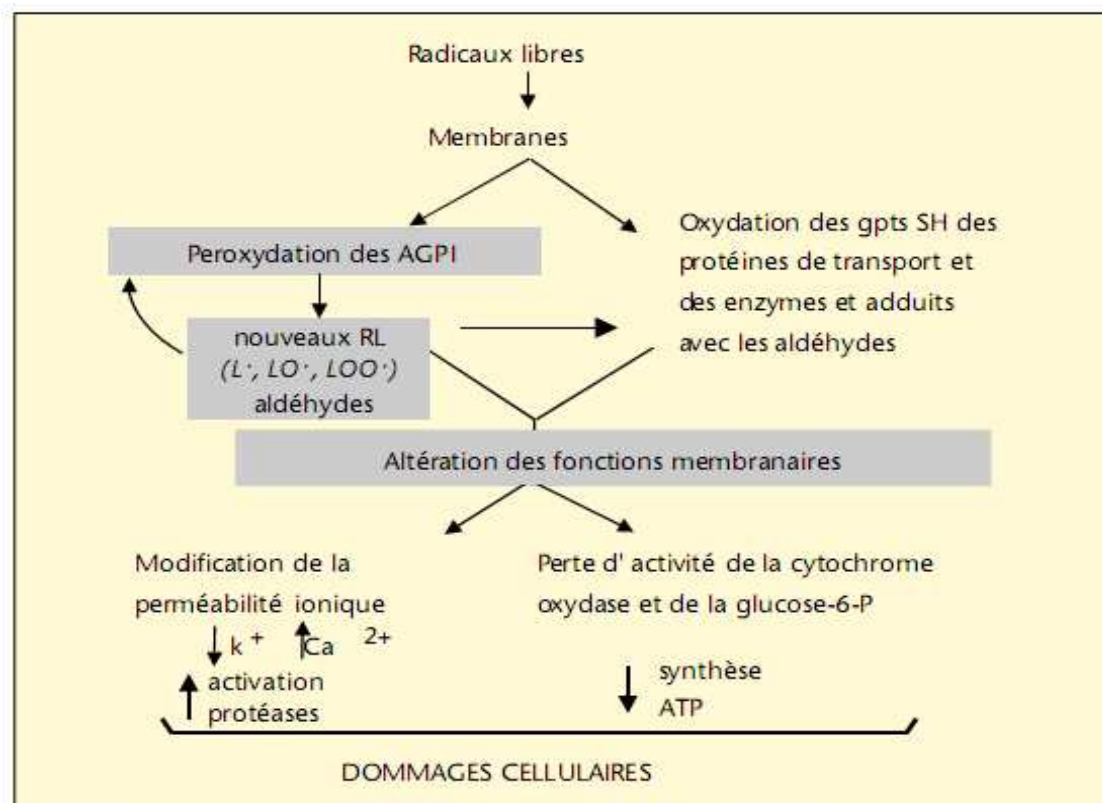


Figure N°08 : Conséquences cellulaires de la peroxydation lipidique (Cillard et Cillard, 2006).



Partie

Pratique



*Matériels et
Méthodes*

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur une plante largement utilisée en médecine traditionnelle locale dont le nom scientifique est : *Fraxinus angustifolia*.

II.1.1. Description

Fraxinus angustifolia est un arbre de hauteur moyenne de 15 m à 25 m avec une couronne ovoïde un peu irrégulière, de 10 m à 15 m de largeur. Ses Feuilles sont caduques, opposées et imparipennées, de 12 cm à 25 cm de long, à 9 ou 13 folioles et de coloration d'automne pourpre violacé ou bordeaux. Ils vivent environ 200 ans (**Kandamir, 1997**) (Figure N 18). La systématique de la plante est mentionnée dans le tableau suivant :

Tableau IV : Systématique de *Fraxinus angustifolia* (**Bernard, 1997 ; Kostova et Iossifova, 2007**).

Nom scientifique	<i>Fraxinus angustifolia</i>
Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylidones
Ordre	Oléale
Famille	Oléacéae
Genre	Fraxinus
Espèce	<i>Fraxinus angustifolia</i>
Nom vernaculaire berbère	Asléne
Nom vernaculaire arabe	Dardar



Figure N°18 : Photographie du matériel végétal de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.
(Originale)

II.1.2. Composition chimique de *Fraxinus angustifolia*

Les investigations photochimiques sur les espèces de *Fraxinus* indiquent l'occurrence d'un éventail de composés chimiques comprenant des coumarines, des secoiridoides, des phenylethanoides, des lignans, des flavonoïdes et des composés phénoliques simples (Kostova, 2006).

II.1.3. Propriétés et usage

Fraxinus angustifolia est une plante utilisée localement, en médecine traditionnelle contre l'arthrose mais aussi comme diurétique et antirhumatismale. Les feuilles les fruits du frêne sont astringents, laxatifs et fébrifuges, l'écorce est anti-hémorroïdaire. Dans la présente étude, nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydant *in vivo* d'un extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia* (Raynoaud, 2005).

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation de la poudre végétale

II.2.1.1. Récolte du matériel végétal

Sur la base de l'utilisation traditionnelle locale, la plante *Fraxinus angustifolia* a été choisie pour la réalisation de notre étude dont nous avons utilisé uniquement les feuilles. Elles ont été récoltées et échantillonnées en juin 2011 dans la forêt d'Azru n BECHAR à Amizour,

Wilaya de Bejaia, loin de la pollution afin d'écartier toute modification dans la composition chimique de l'espèce.

II.2.1.2. Séchage, broyage et tamisage :

Après la récolte, le matériel végétal a été séché à la température ambiante à l'abri de la lumière vive, jusqu'à son épuisement en eau. La matière sèche obtenue est réduite à l'aide d'un broyeur électrique puis le broyat a été tamisé via une série de tamiseurs, permettant l'obtention d'une poudre fine à particules de granulométrie homogène inférieure à 63 μm (Atmani *et al.*, 2009) (Figure N°19). La poudre des feuilles a été ensuite conservée dans des bocaux en verre, fermés hermétiquement et stockées à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

La finalité de cette étape est l'obtention d'une poudre végétale destinée à une extraction des composés phytochimiques.

II.2.1.3. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été réalisée selon la méthodologie d'extraction décrite par Chiang et ses collaborateurs (1994) avec quelques modifications (Atmani *et al.*, 2009), basée sur une extraction sélective à plusieurs solvants de différente polarité.

100g de la poudre de feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont été macérées dans l'éthanol à 95 % pendant 24 heures sous agitation et à un rapport de 1g de poudre pour 4ml d'éthanol.

Après décantation, le surnageant récupéré (extrait éthanolique) a été versé dans des cristallisoirs et a été soumis à un séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière jusqu'à la stabilisation complète de son poids sec.

La deuxième étape de l'extraction est la macération de l'extrait éthanolique, mis à part une faible quantité retenue pour l'étude, dans un mélange d'acétates d'éthyle /eau avec un rapport volumique de 3 : 1 (V/V). Après 24h de macération, la décantation suivante a donné naissance à deux phases non miscibles (une phase aqueuse et une phase organique d'acétate d'éthyle). Ces dernières ont été séparées par la suite et laissées sécher dans les mêmes conditions précédemment citées.

La troisième et la dernière étape de l'extraction est la macération d'une partie de l'extrait organique d'acétate d'éthyle dans un mélange chloroforme /eau avec un rapport volumique 3 : 1 (V/V). Après 24h de macération, suivie d'une décantation, les deux phases résultantes ont été séparées et laissées sécher jusqu'à stabilisation complète de leurs poids sec. Le taux d'extraction de l'extrait éthanolique est calculé à partir de la poudre initiale et pour les autres extraits, le taux d'extraction est calculé à partir de l'extrait issu de l'étape précédente selon la formule suivante :

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

P1 : Poids de l'extrait après l'évaporation (g).

P0 : Poids initial du cristalliseur ou de la boîte de pétri (g).

E : Poids de l'échantillon initial (poudre ou extrait sec de la phase précédent (g).

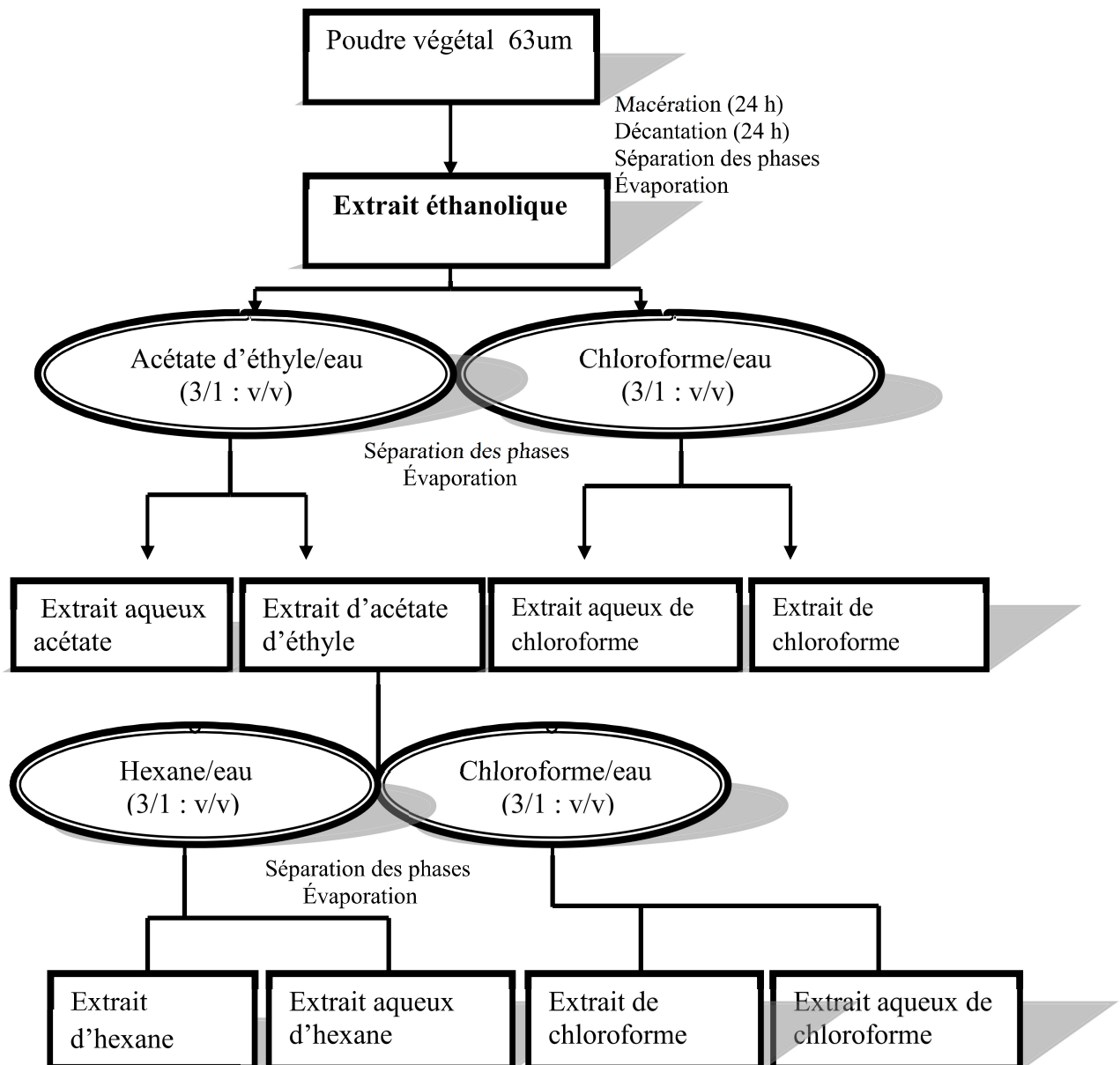


Figure N°19 : Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction (Chiang et al., 1994) in (Atmani et al., 2009).

II.2.2. Expérimentation animale

II.2.2.1. Choix des Animaux

Ce travail a été réalisé sur des souris adultes de variété albinos (Institut de Pasteur, Alger), dont le poids varie entre 22 et 30 g. Les animaux sont logés dans des cages pendant la période expérimentale, chaque cage regroupe des souris selon le sexe (pour éviter l'accouplement) , Elles ont un accès libre à l'eau et à la nourriture standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia, et sont maintenues dans une animalerie à température 20-25°C ambiante soumise à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h et d'humidité (45-70%).



Figure N°20 : Les souris de variété albinos (originale)

L'élevage des souris ainsi que les différents tests ont été réalisés au sein de l'animalerie au niveau de l'université de Bejaia (Faculté des Sciences de Département de Biologie).

II.2.2.2. Traitement des animaux

Dans notre étude, on a utilisé un totale de 20 souris qui sont réparties selon l'homogénéité de leurs poids en 04 lots de 5 souris chacun. Elles ont été traitées quotidiennement pendant 07 jours, par voie intragastrique

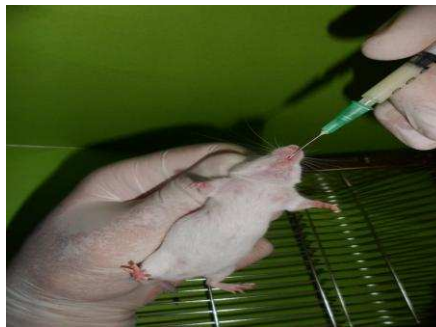


Figure N°21 : Le gavage intragastrique des souris (originale)

❖ 1ere administration

Groupe 1 (5 souris) Contrôle négatif ou témoin sain : Qui reçoivent quotidiennement par gavage gastrique 0,3 ml /g de l'eau physiologique.

Groupe II (5 souris) Contrôle positif: Ces souris reçoivent chaque jour par gavage gastrique 0,3 ml/g d'eau physiologique

Groupe III (5 souris) standard : Reçoivent quotidiennement par voie orale 0,3 ml de la vitamine E (α tocophorele) de concentration 50mg/kg.

Groupe IV (5 souris) : Ces souris reçoivent chaque jour par gavage gastrique 0,3ml/g de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles de *Fraxinus angustifolia* de concentration 50mg/kg.

❖ 2eme administration

Après 2heures de la première administration, les souris de groupe II, III et IV reçoivent une dose de 0,3ml de mélange CCl₄ : paraffine liquide avec un rapport de (1 : 2). Cette 2^{ème} administration a été répétée chaque 72h après la 1^{ère} administration.

Nous nous sommes assurés avant de commencer le traitement de l'homogénéisation et le contrôle des poids entre les souris du même lot et entre différents lots car il est impératif d'ajuster les doses de traitement pour les lots, selon le changement du poids afin de maintenir la même dose par gramme du poids corporel.

II.2.2.3. Prélèvement du sang et sacrifice des animaux

Au bout de 7 jours de traitement, les souris ont été privées de nourriture pendant toute une nuit, elles ont été pesées puis anesthésiées. Le sang de chaque souris a été prélevé au niveau du cou et recueilli dans des tubes contenant sans héparine afin de prévenir la coagulation puis centrifugé à 3000 tours/min pendant 10min à 4°C. Le plasma obtenu est conservé à une température de - 20°C jusqu'à son utilisation dans différents tests de dosages notamment le dosage des protéines et le dosage de la bilirubine. Les souris ont été, en suite, sacrifiées et leurs foies ont été extraits rapidement après la dissection et découpés en petits morceaux.

II.2.2.4. Dosage des protéines

Le dosage des protéines contenues dans le plasma de chaque souris a été réalisé par spectrophotométrie selon la méthode de Bradford (1976) en utilisant une protéine standard BSA (Bovine Sérum Albumine).

II.2.2.5. Dosage de la Bilirubine

Le dosage de bilirubine totale du plasma des différentes souris de chaque lot a été effectué en utilisant un kit commercial. Le changement de l'absorbance a été suivi par spectrophotométrie à 555 nm. La concentration de bilirubine totale est exprimée en mg/dl de plasma.

II.3. Evaluation *in vivo* de l'activité antioxydant de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

II.3.1. La peroxydation lipidique

II.3.1.1. Le principe de la méthode

La méthode TBARS (substances réactives de l'acide thiobarbiturique) a été proposée il y'a plus de 40ans, elle est l'une des méthode les plus utilisée pour la détermination du degré de la peroxydation lipidique par la mesuré spectrophotométrie de la malondialdéhyde (MDA) (Antolovich et al., 2001 ; Robards et al., 2002). Ce dernier est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés (AGPI) sous l'effet des radicaux libres libérés au cours du stress. Dans milieu acide (pH : 1 ou 2) et chaud (100°C), une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA) pour former un chromophore de couleur rose qui absorbe a 535nm (Figure N°23) (Antolovich et al., 2001).

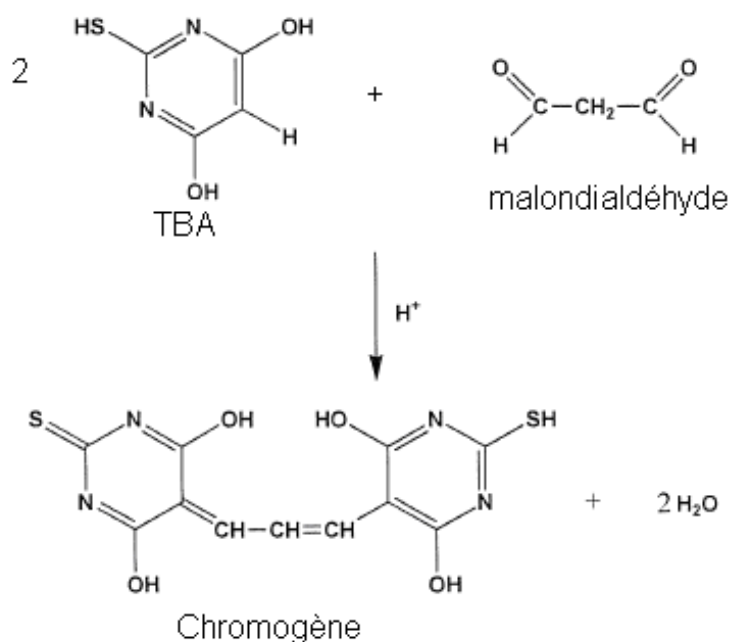


Figure N° 22: Formation du chromogène par condensation du TBA avec le MDA (Antolovich et al., 2002).

II.3.1.2. Procédure expérimentale

L'évaluation *in vivo* de l'inhibition de peroxydation lipidique par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle est réalisée selon la méthode développée par Harish et Shivanandappa (2006) avec quelques modifications. Les petits morceaux du foie de chaque souris ont été broyés à l'aide d'un homogénéisateur en verre avec un volume de tampon phosphate glacé (0,1M, pH=7,2). L'homogénat obtenu a été centrifugé. 1 ml du surnageant, prélevé délicatement, a été ajouté à un volume de 2ml de mélange TCA-TBA. Le mélange réactionnel a été chauffé pendant 15 minutes dans l'eau bouillante. En suite l'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre à 535 nm, ainsi le taux de MDA a été calculé en utilisant le coefficient d'extinction $1,56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ et exprimé par nmol MDA/mg de protéines (Figure N°24).

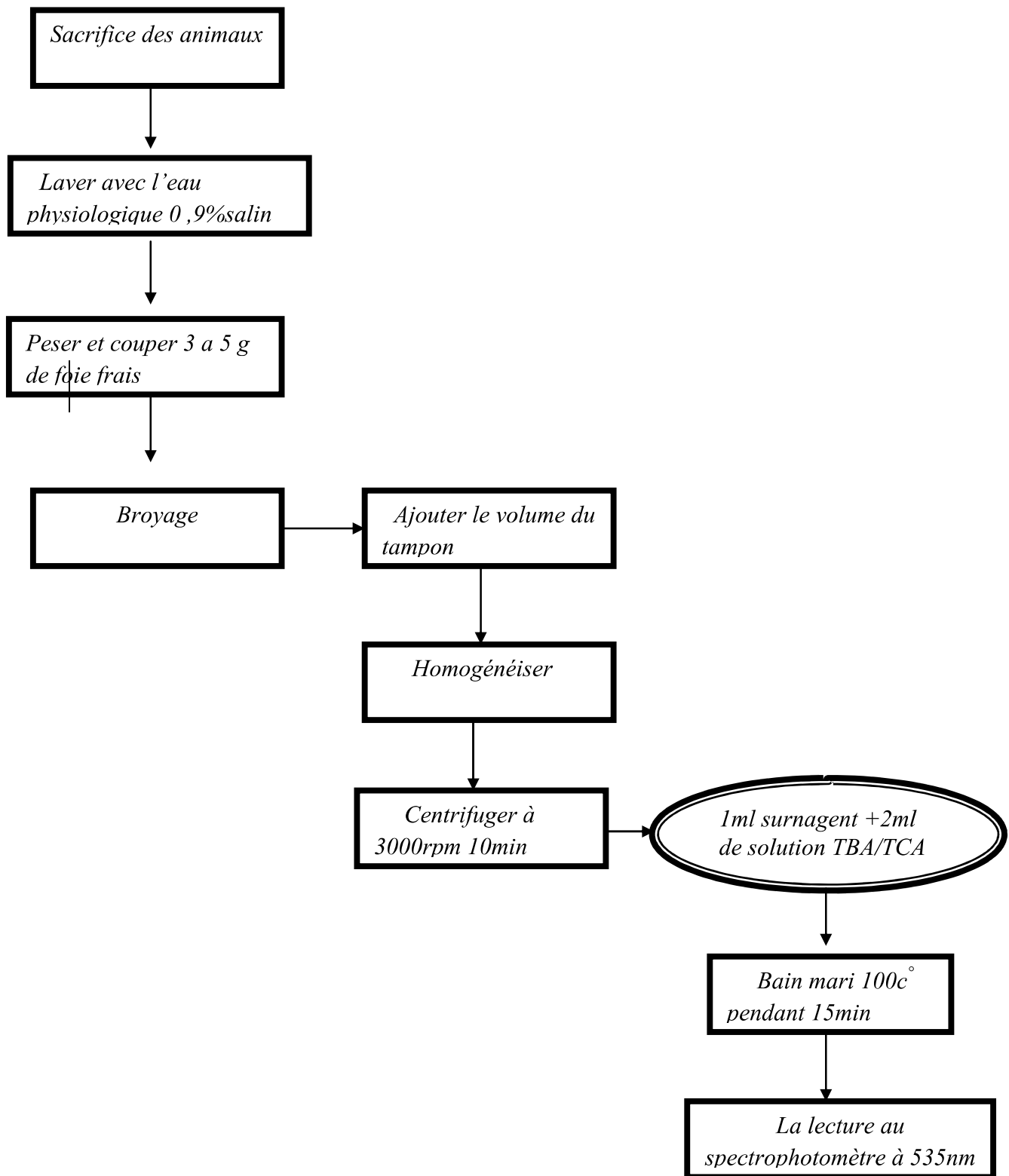


Figure N°23 : Protocole de la peroxydation lipidique (Harish et Shivanandappa , 2006)


II.4. Le poids relatif de foie

Afin de vérifier si la peroxydation lipidique n'a pas causé une inflammation ou une nécrose de foie, durant la période expérimentale, les souris ont été suivies et pesées avant chaque administration de la dose de CCl₄ (chaque 72h), Au temps de sacrifice, le foie de toutes les souris ont été pesées et les poids relatifs ont été calculés selon la formule suivante

$$\text{Poids relatif} = \text{moyenne de poids du foie} / \text{moyenne de poids la souris}$$

II.5. Evaluation statistique

Les résultats ont été exprimés en tant que moyenne \pm S.E.M. L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application «ANOVA» (STATISTICA) et la comparaison des données est considérée significative à la probabilité $P < 0,05$.



*Résultats et
Discussion*

III. Résultats et discussions

III.1. Extraction des composés phénoliques

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont été séchées à une température ambiante dans un milieu ombragé, afin d'assurer une meilleure élimination d'eau tout en préservant la composés phénoliques, sans provoquer leur dégradation ni leur détérioration. En effet, selon (Macheix et al.,2006), l'eau représente une source de dégradation des polyphénols par le phénomène d'oxydation. De ce fait, sa présence est un élément gênant pour le calcul de la teneur en polyphénols.

L'efficacité de l'extraction dépend de plusieurs paramètres: le diamètre de la poudre, le volume et le type de solvants utilisés et le nombre d'extractions (Escribano et al., 2003 ; Levizou et al., 2004). Le protocole d'extraction choisi est un protocole à plusieurs solvants de polarités différentes. Le premier solvant utilisé dans l'extraction des composés phénoliques a partir de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, est l'éthanol afin d'extraire le maximum de composés phénoliques (Cowan, 1999). Aussi, une macération de la poudre dans l'éthanol est couplée à une agitation pour établir un bon contact entre le solvant et les particules de la poudre suivie d'une décantation et centrifugation afin d'éliminer toutes les particules en suspension.

Au finale, les composés phénoliques du matériel végétale étudié, ont été fractionnés, d'une manière que les plus polaires sont concentrés dans les phases aqueuses, tandis que les composés apolaires sont concentrés au niveau des phases organiques. Donnant naissance à 5 extraits dont les taux d'extraction sont représentés dans le tableau N°V suivant

Tableau V : Taux d'extraction des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

Solvants	Taux d'extraction de feuilles de <i>F.angustifolia</i> (%)
Ethanol	7,0
Acétate d'éthyle	55,09
Aqueux acétate d'éthyle	13,66
Chloroforme	60,29
aqueux du chloroforme	8,08

% : chaque pourcentage est calculé par rapport à l'extrait dont il est issu précédemment

D'après les résultats obtenus, on remarque que les taux d'extraction sont différents d'un solvant à un autre, en effet, le taux d'extraction obtenu dans la première étape d'extraction en utilisant l'éthanol, est relativement faible (7,0 %). Des différences dans les taux d'extraction ont été enregistrées entre les résultats obtenus, concernant cette première étape d'extraction, et les données rapportées par Berboucha et al. (2010), ayant appliqué le même protocole d'extraction sur les feuilles du frêne. En effet, un taux de 12,72% a été exhibé par l'extrait éthanolique des feuilles, Cette différence peut être justifiée par les différences aux niveaux des dimensions des particules, l'origine des échantillons ainsi le changeant des saisons.

Par ailleurs, les taux les plus élevés ont été obtenus au niveau des phases les moins polaires, à savoir dans l'extrait acétate d'éthyle (55,09%) et l'extrait du chloroforme (60,29%), contrairement aux phases polaires qui ont enregistré les taux les plus faibles avec 13,66% et 8,08%, pour l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux de chloroforme, respectivement. Ce qui suggère la richesse des feuilles en composés phénoliques apolaires (organiques).

III.2. Poids corporel des souris

La variation du poids des souris est un paramètre très important, vu que c'est un des indicateurs de l'état de santé des animaux, au cours de l'expérimentation. A cet effet, un suivi régulier du poids des souris utilisées dans cette étude a été effectué. Le tableau N° VI représente les résultats de la variation de poids corporel des groupes de souris.

Tableau N° VI : La variation de poids corporel des souris de différents lots.

Le groupe	C-	C+	α tocophérol	L'extrait
Le poids initial (g)	19,90±3,11	25,04±0,43	22,23±0,27	27,65±1,20
Le poids final après l'injection de CCL₄ (g)	27,82±3,58	29,46±3,38	27,2±1,87	24,55±3,50

Les valeurs sont le moyen \pm S.E.M. ; $n=5$ dans chaque groupe. La période expérimentale est de 7 jours.

C⁻ : control négatif (groupe gavé par 0,3ml l'eau distillée). C⁺ : control positif (groupe gavé par 0,3ml CCL₄). Vit E : α tocophérol (groupe traité par 0,3ml de α tocophérol 50mg/kg). Ext : Extrait (groupe traité par 0,3ml d'extrait aqueux d'éthyle acétate de feuilles *Fraxinus angustifolia* 50 mg/kg).

Les résultats obtenus montrent une croissance normale de souris du lot du contrôle positif et celles de lot traitées avec la vitamine E par rapport à la croissance notée au niveau des souris du lot contrôle négatif.

Cela peut expliquer, d'une part, que l'administration orale d'une dose de 0,3ml de l'agent toxique, le tétrachlorure de carbone (CCl₄), chaque 72h, à des souris du lot du contrôle positif n'a pas affecté leur croissance, c'est-à-dire, l'augmentation du poids corporel, notant des valeurs de 25,04±0,43g le poids initial et 29,46±3,38g le poids à la fin de l'expérience. Le même profil de variation du poids corporel a été noté (22,23±0,27g à 27,2±1,87g) au niveau du lot traité par la vitamine E avec une légère différence. Cette dernière peut être expliquée par les effets bénéfiques de α tocophérol rapportés par divers études (**Al-Malaikaa, 2001 ; Cuvlier, 2003**).

Par ailleurs, le traitement par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de feuilles de *Fraxinus angustifolia* induit une diminution de poids corporel de 27,65± 1,20 g à 24,55±3,50g. Cette dernière peut être expliquée selon Annabi Berrahal et al, 2007 par la réduction de consommation de la nourriture sous l'effet de satiété sous l'effet de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle.

En outre, il est important de noter que seul le poids des souris traitées avec l'extrait aqueux acétate d'éthyle de feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été réduit, au cours de l'expérience comparativement, au poids corporel des autres parties de plantes testées (Ecores de *Fraxinus angustifolia*, les feuilles de *Pistacia lentiscus* et celles de *Clematis flammula*) dans les mêmes conditions.

III.3. Poids relatif des souris

Le tétrachlorure de carbone manifeste une toxicité sur l'organisme animal plus particulièrement sur le foie, provoquant des lésions de nécrose qui à long terme peuvent évoluer en cirrhoses hépatiques. Dès l'administration du CCl₄ à l'animal, la toxicité se manifeste par un ballonnement qui en certaines circonstances entraîne un ralentissement de la circulation sanguine intrahépatique, et une dégranulation du réticulum endoplasmique rugueux (**Martin et Feldmann, 1983**).

Tableau N° VII : Le poids relatif des souris

Le groupe	C-	C+	α tocophérol	L'extrait
Poids relatif	0,06	0,062	0,066	0,070

$n=5$ dans chaque groupe. La période expérimentale est de 7 jours. le poids relatif : le poids de foie sur le poids de la souris

C⁻ : control négatif (groupe gavé par 0,3ml l'eau distillée). C⁺ : control positif (groupe gavé par 0,3ml CCl₄). Vit E : α tocophérol (groupe traité par 0,3ml de α tocophérol 50mg/kg). Ext : Extrait (groupe traité par 0,3ml d'extrait aqueux d'éthyle acétate de feuilles *Fraxinus angustifolia* 50 mg/kg).

Selon les résultats représentés dans le tableau N° VII, on a constaté que les poids relative des trois lots (le controle négatif, le groupe traité par la vitamine E et le groupe traité par l'extrait) sont similaires à celui de lot traite avec CCl₄, suggérant de ce fait, que le tétrachlorure de carbone n'a pas eu le temps pour causé l'inflammation à raison de la courte durée du traitement qui est de 07 jours seulement (**Uzma Nazia et al., 2011**).

III.4. Dosage de la bilirubine

Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydant, en raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en hémoglobine. Ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs (**Arbos et al., 2008 ; Çimen, 2008**). L'exposition des érythrocytes à une attaque radicalaire conduit non seulement à la rupture de leurs membranes plasmiques avec libération de leur contenu, mais aussi à la formation de la bilirubine (**Bhabani, 1999**).

Des études, *in vitro*, et *in vivo*, ont démontré que la bilirubine présente des propriétés antioxydants efficaces, à des doses raisonnables, empêchant les dommages oxydants déclenchés par un éventail de stimulus oxydant (**Tomarao, 2002**). Cependant, à forte dose, cette molécule reflète la pathophysiologie du foie et représente l'un des indicateurs clinique le plus utile dans la mesure de la sévérité de la nécrose (**Vudaa et al., 2011**).

Tableau N° VIII : Les résultats de dosage de bilirubine dans le sérum des groupes de souris.

Test	C ⁻	C ⁺	α tocophérol	Extrait
Traitement	L'eau distillée	CCL ₄	CCL ₄ + vit E	Extrait + CCL ₄
Moyenne de bilirubine totale	0,095	0,467	0,846	0,353
Moyenne ± SEM		0,467±0.007	0,846±0.145	0,353 ± 0,047

Les valeurs sont la moyenne ± S.E.M. ; $n=5$ dans chaque groupe. La période expérimentale est de pendant 7 jours.

C⁻ : control⁻ (groupe gavé par 0,3ml l'eau distillée 1ml/kg).

C⁺ : control⁺ (groupe gavé par 0,3ml CCL₄ 1ml /kg).

Vit E : α tocophérol (groupe traité par 0,3ml de α tocophérol 50mg/kg).

Ext : Extrait (groupe traité par l'extrait aqueux d'éthyle acétate des feuilles *Fraxinus angustifolia* 50 mg/kg).

En analysant les résultats obtenus dans le tableau N°VII, on peut constater que le taux de la bilirubine totale a atteint une valeur très élevée de $0,467 \pm 0.007$ mg/dl au niveau de groupe contrôle positif (C⁺) traité par 0,3ml de CCL₄, en raison de (1ml/kg), comparativement à celui du contrôle négatif qui a exhibé juste un taux de 0.095 mg/dl.

En utilisant le même agent hépatotoxique (CCL₄), Gupta et ses collaborateurs (2011), ont enregistré une valeur de bilirubine plus élevée de 309,21% chez les rats traités avec cet agent par rapport à celle du contrôle sain.

Ces résultats sont en accord avec ceux enregistrés par Annabi Berrahal et son équipe (2007) sur l'effet des agents toxiques sur le taux des paramètres hématologiques dans le sang, ou ils ont montré que le plomb qu'est un agent hépatotoxique affecte considérablement le taux de la bilirubine dans les érythrocytes d'une manière dose-dépendante.

Cette accumulation et élévation accrue de la bilirubine au niveau du sérum des souris albinos traitées avec l'agent hépatotoxique, peuvent être expliquées, Selon Morinita et al., 2001, par l'inhibition de hème-oxygénase, l'enzyme responsable de la dégradation de la bilirubine dans le sang, sous l'action des radicaux libres issus des effets délétères sur globules rouges (Morinita et al., 2001).

Cependant, l'administration par gavage des souris par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, à une dose quotidienne de 50mg/kg, pendant 7 jours, a permis de réduire le taux de la bilirubine dans le plasma de souris exhibant une valeur de $0,353 \pm 0,047$ mg/dl plus faible que celle enregistrée chez le groupe traité uniquement par le CCl₄. Ce résultat peut être expliqué par l'effet hépato-protecteur des composés contenus dans cet extrait ayant la capacité de stabiliser le dysfonctionnement biliaire dans le foie de la souris pendant les dommages hépatiques provoqués par CCl₄ (**Merlin et al., 2011**). En effet des études récentes réalisées sur notre plante ont rapporté sa richesse et sa variété en composés phytochimiques connus pour leurs multiples activités biologiques (Atmani et al., 2009, Berboucha et al., 2010).

De même, Gupta et al., 2011, ont démontré que le traitement avec différentes doses de l'extrait aqueux du fruit de *Solanum xanthocarpum*, pendant 14 jours des rats ayant des dommages hépatiques du foie induit par 1ml/kg de CCl₄, provoque une réduction du taux de sérum de la bilirubine d'une manière dose dépendante.

Cependant, le taux de bilirubine totale obtenu au niveau de plasma de souris ayant administrées la vitamine E, est en contradiction avec l'effet hépato-protecteur de cette dernière rapporté dans la partie bibliographique.

En effet, un taux de la bilirubine totale deux fois plus grand ($0,846 \pm 0,145$ mg/dl) que celui de contrôle positif a été dosé dans le sérum de souris hépatotoxiques traitées par une dose journalière de la vitamine E, pendant une semaine.

Cette accumulation de la bilirubine totale dans le plasma, peut être liée soit par l'inhibition de l'enzyme à savoir, l'hème-oxygénase, responsable de la dégradation de la bilirubine dans le sang (**Morinita et al., 2001**), sous l'effet pro-oxydant de cette vitamine (**Rice-Evans, 1999 ; Cillard et Cillard, 2006**).

Soit par le temps de l'administration de α tocophérol au souris qui a été 24heures avant le sacrifice ; ce qui nous amène à supposer que l' α tocophérol n'a pas eu assez de temps pour agir contre les dommages causés par le tétrachlorure de carbone. Suggérant de ce fait que le paramètre du temps est nécessaire pour la réaction de la vitamine E. Une étude effectuée par Joshi et ses collaborateurs (1995), a démontré que l'effet de la vitamine E sur la réduction du taux de bilirubine totale, chez différents rats rendus hépatotoxiques, n'est obtenue qu'après 14 jours de traitement quotidien avec une dose de 110mg/kg.

III.5. Évaluation de fonction du foie

Le foie est un organe important impliqué dans de nombreuses fonctions métaboliques indispensables à la vie. Cependant beaucoup de facteurs à savoir, les agents infectieux et les produits chimiques peuvent induire son dysfonctionnement (Shahjahan et al., 2004). Pour remédier à ça, plusieurs plantes médicinales sont expérimentées pour leurs effets antioxydants et hepatoprotecteur possibles contre des dommages de foie induits par des produit hepatotoxiques chez les animaux, tel que le tétrachlorure de carbone (CCl₄) un déclencheur de la peroxydation lipidique (Merlin et al., 2011 ; Vudaa et al., 2011).

III.5.1. Evaluation du pouvoir antioxydant par la mesure de taux de MDA

Les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydant des feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur les homogénats hépatiques ayant subit une peroxydation lipidique, induite par le CCL₄, sont exprimés en terme d'MDA (nano mol par milligramme de protéines) (Figure N°25)

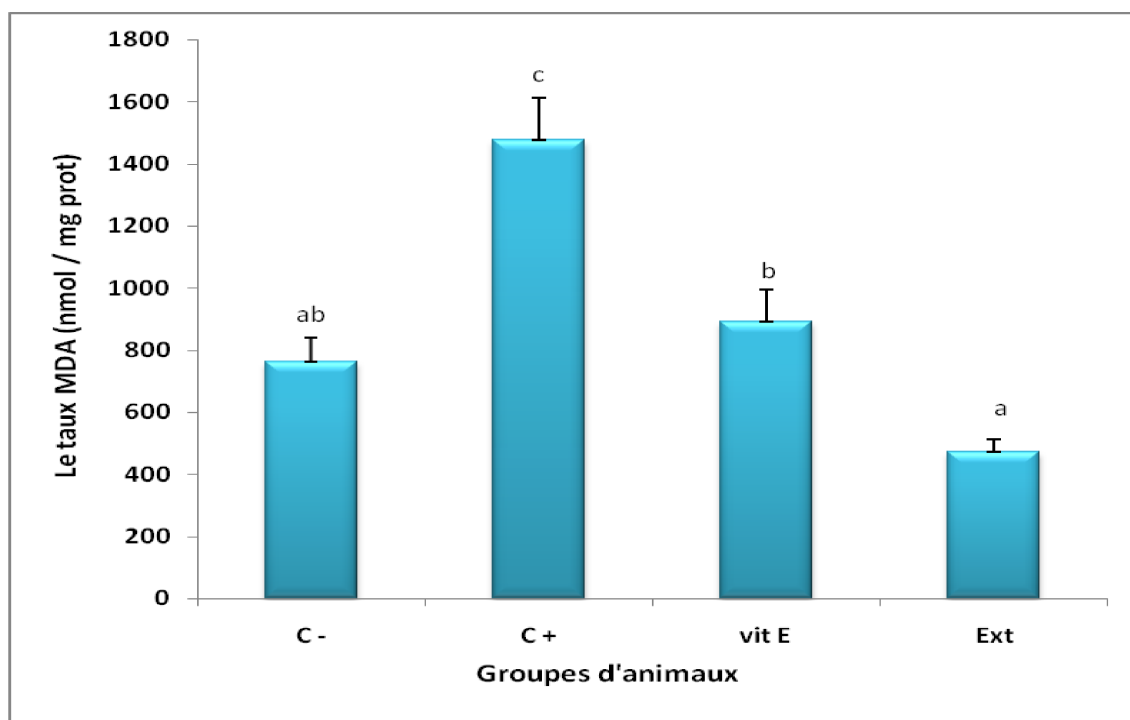


Figure N°24: Taux de peroxydation lipidique en terme de MDA.

C⁻ : Control négatif (groupe gavé par 0,3ml l'eau distillée 1ml/kg). C⁺ : Control positif (groupe gavé par 0,3ml CCL₄ 1ml /kg). Vit E : α tocophérol (groupe traité par 0,3ml de α tocophérol 50mg/kg). Ext : Extrait (groupe traité par 0,3ml d'extrait aqueux d'éthyle acétate de feuilles de *Fraxinus angustifolia* 50 mg/kg).

Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 5). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe contrôle ; $p \leq 0.05$.

L'analyse statistique des résultats de la figure N°25 a montré clairement une différence significative ($p \leq 0.05$) entre les groupes de souris, contrôle positif (souris traitées gavées par CCL_4) et négatif (souris gavées par l'eau distillée), ou un taux très élevé en MDA, avec $1477,2 \pm 133,9$ nmol/mg de protéines, a été dosé au niveau des foies de souris de contrôle positif, par rapport au groupe témoin ($763,1 \pm 76,8$) nmol/mg, ayant reçu uniquement d'eau distillée par voie orale pendant 07 jours.

Les résultats de plusieurs études expérimentales réalisées sur les dommages hépatiques induits par le tétrachlorure de carbone (CCL_4) sont en accord avec nos résultats. En effet, Un taux élevé en MDA de $0,263$ Umol/mg a été enregistré au niveau des souris gavées avec $0,5$ ml/kg de CCL_4 , par rapport au groupe témoin ($0,216$ Umol/mg), ayant reçu l'eau distillée, pendant 7 jours (Leelaprakash et al., 2011).

Merlin et Parthasarathy (2010) ont étudié l'activité antioxydant et hepatoprotectrice de l'extrait de la plante de *Gmelina Linn asiatica*. (Verbenaceae), ils ont noté un niveau élevé en MDA (466 nmol/mg) chez le groupe d'animaux traité avec une dose de 1 ml/kg de CCL_4 par rapport à leur groupe témoin ($196,6$ nmol/mg) pendant 5 jours.

Cette élévation du taux de MDA, un produit stable de la peroxydation lipidique, dans le groupe C+, est expliquée par une augmentation de la lipo-péroxydation au niveau du foie de souris, et par conséquent, des dommages tissulaires dues à la production excessive des radicaux libres après administration de tétrachlorure de carbone (CCL_4). Ce dernier qui est un agent hépatotoxique efficace, lors de son passage hépatique, il subit une réaction de conversion métabolique catalysée par le système enzymatique de cytochrome P_{540} microsomiale, donnant naissance à des radicaux libres le CCL_3^- et $CCL_3O_2^-$ respectivement (Candelario, 2001 ; Gupta et al., 2011).

Ces radicaux libres ont la capacité de réagir avec les macromolécules hépatiques, induisant non seulement, des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique des membranes plasmiques, mais aussi des réactions d'inhibitions des activités des enzymes antioxydants (SOD, CAT et GSH) et l'élévation des taux de marqueurs biochimique telle que les transaminases, l'aspartate (AST), l'alanine(ALT) et de la bilirubine totale dans le sérum (Merlin, 2011).

Une étude récente réalisée par Leelaprakash et ces collègues (2011), en appliquant le même protocole expérimental, ont confirmé l'effet de CCL₄ sur l'inhibition des activités des enzymes antioxydants notamment la SOD, la CAT et la GSH et l'augmentation du taux élevé en transaminase aspartat (AST) et en transaminase alanine (ALT) dans le sérum des animaux traités par le CCl₄ comparativement aux résultats noté chez le groupe sain. La même constatation a été soulevée par Farhoudi et son équipe (2011) en dosant les mêmes paramètres biochimique et évaluant l'activité des mêmes enzymes antioxydants.

D'autre part l'analyse statistique des résultats de la figure N°25 a montré une différence significative entre le groupe de contrôle positif (souris gavées par CCL₄) et les groupes traitées par la vitamine E et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle.

Il est important de souligner que, l'extrait aqueux acétate d'éthyle de feuille de *Fraxinus angustifolia*, a exhibé, *in vitro*, un pourcentage d'inhibition très élevé de 93% comparable à celui du standard utilisé, par la méthode de peroxydation de l'acide linoléique, (Atmani et *al.*, 2009). Ce qui nous a encouragés à évaluer l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique, de cet extrait, *in vivo*.

En effet, nous avons noté une réduction remarquable significative de taux d'MDA (472,95±40,35 nmol/mg protéine), chez les souris qui ont reçu 0,3ml de CCL₄ et prétraitées par 0,3ml d'extrait d'aqueux d'acétate d'éthyle de feuille de *Fraxinus angustifolia* de concentration 50mg/Kg, par rapport au groupe de souris traité par 0,3 ml de CCL₄ (1477,2±133,9 nmol/mg protéine).

Cette diminution significative de taux d'MDA causée, après administration de l'extrait, est un indice de réduction de la peroxydation lipidique qui pourrait être expliquée par sa richesse, en composés antioxydants, responsables d'inhibition de la peroxydation lipidique qui selon Race-Evans (1999), nécessite la présence du groupement 3'- 4' catéchol sur le cycle B, la double liaison conjuguée avec la fonction 4-oxo mais aussi, les groupements 3, 5-OH entre les cycles A et C, sur la structure cyclique des flavonoïdes (**Rice-Evance, 1999**).

Par ailleurs, les résultats de l'étude *in vivo*, de Harich et son équipe (2006), ont prouvé que l'extrait aqueux de feuilles de *Nuri de Phyllanthus* est inhibiteurs plus efficace de la peroxydation microsomique de lipide induite par le CCL₄ par rapport à l'extrait méthanolique de la même plante.

D'autres résultats d'études sur l'effet hépato-protecteur des extraits aqueux ont révélé des bons résultats. Gupta et ses collaborateurs et en (2011), ont rapporté un taux de MDA de l'ordre de 0,44nmol/mg chez les rats gavés par l'extrait aqueux du fruit de *Solanum xanthocarpum*, à une concentration de 400mg/kg. D'autre part, Oyedemi et Afolayan, 2011 ont enregistré une diminution de taux de MDA proportionnel à la concentration d'extrait aqueux de feuilles de *Leonotis leonurus* administré, pendant une semaine.

En fin un taux de MDA ($891,9 \pm 103,0$ nmol/mg prot..) légèrement proche de la norme c'est-à-dire celui enregistré par le contrôle négatif mais deux fois plus grand que ce lui exhibé par le groupe de souris traité par l'extrait aqueux. Ce résultat a validé l'effets protecteur de la vitamine E contre les dommages provoqués par le CCL₄, grâce a son caractère hydrophobe qui lui permet de s'insérer au sein des membranes biologiques riches en AGPI, où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation des lipides (**Vamecq et al., 2004**). Cela se fait pas un piégeant les radicaux peroxydes (LOO°) en transposant leur fonction radicalaire pour former un radical tocophéroxyde (α -T°) moins actif (Figure N°17) (**Salvayre, 2005**).

De ce qui précèdent, il est important de souligner que l'effet hépatoprotecteur de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et la vitamine E est du à leur richesse en groupement fonctionnels, capables de piéger les ERO et rentrer en compétition avec des radicaux déjà existants contribuant de ce fait, au blocage de la phase de propagation soit :

- Par libération d'un atome d'hydrogène à l'espèce radicalaire.
- Par chélation des ions métalliques de transition (inhibition de la réaction de Fenton).
- Par l'inhibition des enzymes productrices des RL comme les lipo-oxygenases et les cyclo-oxygénases .
- Par augmentation de l'expression des enzymes antioxydants comme la SOD, la CAT et la GPX (**Huang et al., 2005 ; Halliwell, 2008**).

III.6. Corrélations

III.6.1. Corrélation entre le taux de MDA et le poids corporel des souris

Afin de déterminer l'éventuelle relation entre la peroxydation lipidique (MDA) et le poids corporel des souris, les coefficients de corrélations ont été déterminés à partir des courbes de corrélation (Annexe)

- **Corrélation entre le taux de MDA et le poids des souris de contrôle négatif (sain) (C⁻)**

D'après les résultats obtenus, une corrélation hautement significative inversement proportionnelle a été notée entre les taux de MDA et le poids corporel des souris du contrôle négatif, avec un coefficient de corrélation de $r = -0,96$, c'est à dire que la peroxydation lipidique est accrue chez les petites souris.

- **Corrélation entre le taux de MDA et le poids des souris de contrôle positif (C⁺)**

Un coefficient de corrélation positif presque nul ($r = 0,35$) a été enregistré au niveau du lot des souris du groupe traité par le CCL₄ (contrôle positif). Cela expliquerait que l'agent chimique hépatotoxique CCL₄ perturbe le métabolisme des souris et inverse la relation entre le taux de MDA et le poids corporel des souris notée dans le contrôle négatif.

- **Corrélation entre le taux de MDA et le poids des souris de groupe de standard (vitamine E) et le groupe traité avec l'extrait aqueux acétate d'éthyle de feuilles de *Fraxinus angustifolia***

Concernant le groupe des souris traité avec vitamine E et celui traité avec l'extrait aqueux de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, une bonne corrélation inversement proportionnelle a été notée ($r = -0,81$; $r = -0,99$, respectivement), entre les taux de MDA et le poids des souris. Ces résultats suggèrent que la vitamine E et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle ont rétabli l'équilibre métabolique chez les souris perturbé par le CCL₄.



Conclusion

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales sont considérées, depuis des siècles, comme une source majeure des produits utilisés en thérapeutique grâce à leur richesse en métabolites secondaires dont les polyphénols. Ces derniers suscitent actuellement beaucoup d'intérêts, en raison du bénéfice qu'ils pourraient avoir, en termes de prévention des maladies.

Dans cette présente étude, l'extraction des composés phénolique à partir de feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été réalisée selon un protocole basé sur l'utilisation de solvants de polarités variables. Les résultats d'extraction nous a permis d'obtenir cinq différents extraits organiques et polaires, à savoir, l'extrait ethanologique, extrait acétate d'éthyle, extrait chloroforme mais aussi l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux de chloroforme avec des taux d'extraction variables d'un extrait à un autre.

L'utilisation, *in vivo*, de tétrachlorure de carbone (CCL_4) a prouvé clairement l'action de cet agent toxique sur la provocation de la peroxydation lipidique et l'augmentation des marqueurs du stress oxydant tel que la bilirubine totale.

L'évaluation de l'activité antioxydant de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles de *F. angustifolia* a permis de montrer que l'administration de cet extrait pour les souris traitées par le tétrachlorure de carbone (CCL_4) provoque une nette amélioration du statut antioxydant hépatique comparativement au traitement avec la vitamine E. Cela en diminuant la concentration du MDA, produit final de la peroxydation lipidique. Mais aussi une forte réduction du taux de bilirubine totale présent dans le plasma des souris prétraitées avec le CCL_4

Les résultats obtenus nous laissent suggérer ainsi l'effet hepatoprotecteur des composés contenus dans l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de feuilles de *Fraxinus angustifolia* et renforcer l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle

Afin d'approfondir l'étude de l'activité antioxydant, *in vivo*, il serait intéressant d'évaluer au coté de la peroxydation lipidique d'autres status antioxydant des animaux traités par CCL_4 en mesurant les activités des enzymes antioxydant notamment la SOD, la CAT et GSH de l'extrait aqueux acétate d'éthyle mais aussi d'autres extraits en vérifiant l'absence d'effets cytotoxiques. Il est également nécessaire d'isoler et d'identifier les composés responsables de cette activité, par des techniques plus performantes (HPLC, RMN.... etc.).



Bibliographie

Références bibliographiques

- 📖 Afonso, V.; Champy, R.; Mitrovic, D.; Collin, P. et Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme*, 74 : 636–643.
- 📖 Al-Malaikaa, S.; Issenhutha, D. and Burdickb. (2001). The antioxidant role of vitamin E in polymers V: Separation of stereoisomers and characterisation of other oxidation products of dl-a-tocopherol formed in polyolefins during melt processing. *Polymer Degradation and Stability*, 73: 491–503.
- 📖 Ann, B. C. (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: *Aspects Analytiques*. 66 (6) : 605-620.
- 📖 Annabi Berrahal, A. ; Nehdi, A. ; Hajjaji, N. ; Gharbi, N. et El-Fazâa, S. (2007). Antioxidant enzymes activities and bilirubin level Pharmacology, toxicology .*Pharmacologie, toxicologie C. R. Biologies*, 330 : 581–588
- 📖 Arbos, K.A. ; Claro, L.M. ; Borges, L. ; Santos, C.A.M. and Weffort-Santos, A.M. (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28: 457–463.
- 📖 Armelle, J. (2004). Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ? *OCL VOL.11. 6* :414-418.
- 📖 Atmani, D. ; Chaher, N. ; Barboucha, M. ; Ayouni, K. ; Lounis, H. ; Boudaoud, H. ; Debbache, N. and Atmani, D. (2009). Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112: 303-309.
- 📖 Aourousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leur produit. *Productions Animales*, 15 (1) : 67-82.
- 📖 Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio*, 2 (1) : 43-52.

- 📖 **Beaudeau,J.L. ; Delattre.J. ; Therond.P. ; Bonnefont-Rousselot.B. ; Legrand.A .et Peynet.J. (2006).** Le stress oxydant composante physiopathologique de l'athérosclérose Oxidative stress in the atherosclerotic process. *Revue générale et analyse prospective*, **21** : 144–150 .
- 📖 **Bennick, A. (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral*,**13(2):184-196.**
- 📖 **Berger, M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant :état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20**: 48–53.
- 📖 **Bhabani, S. ; Das and Nalini, K. and Nanda India. (1999).** Evidence for erythrocyte lipid peroxidation in acute falciparum malaria. *ransactionsof the rolya society of tropical medicine and hygiene*, **93:58-62.**
- 📖 **Bonnefont-Rousselot,D. ; Peynet,J. ; Beaudeau,J-L . ; Thérond.P ; Legrand.A and Delattre, J. (2002) .**Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose Oxidative stress, vascular function and atherosclerosis. *Nutrition clinique et métabolisme*. **16** : 260–267.
- 📖 **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie .Plantes médicinales. Technique et documentation. *Edition : Lavoisier*, **3**: 286-347.
- 📖 **Çanakçı, C. F. ; Çiçek, Y. and Çanakçı, V. (2005).** Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Moscow)*, **70(6): 619-628.**
- 📖 **Candelario-Jalil, E. ; Mohammed-Al-Dalain, O. S. ; Leon Fernandez, S. ; Men´endez, G. Perez-Davison ; Merino, S. N. and Ajamieh. H. (2001).** Oxidative Preconditioning Affords Protection Against Carbon Tetrachloride-induced Glycogen Depletion and Oxidative Stress in Rats *journal of applied toxicology*, **21**: 297-301.
- 📖 **Chaing, H.S.; Juilo, Y. and Lu, F. J. (1994).** Xanthine oxidase inhibitors form the leaves of Alsophila Spinulosa (hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition*, **8 (1): 61-71.**
- 📖 **Cheyrier,V.V ; Souquet,J-M ; Fulcrand .H ; Sarni, P . and Moutounet, M.(1998).** Stabilisation tanins-anthocyanes données: Extrait de « Les composés phénoliques » *Journée Technique (compte-rendu) Biol. Med*, **13 (2):184-196.**
- 📖 **Cheyrier, V. (2005).** Polyphénols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Chimiurgie Nutrition*, **81**: 223-229.

📖 **Chira, K. ; Suh, J.H. et Teissédre, P.L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **6**: 75-82.

📖 **Çimen, M.Y.B. (2008)** .Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. **39**: 1-11.

📖 **Cillard,J. ; Cillard,C. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. *Laboratoire de biologie cellulaire et végétale UPRESS EA 3891 « Groupe de Recherche en Thérapeutique Anticancéreuse, GRETAC »Faculté de pharmacie, Rennes OCL VOL. 13, 1 :24-29.*

📖 **Deby-Dupont.G. ; Deby.C. et Lamy.M. (2002).** Données actuelles sur la toxicité de l’oxygène. *Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS*. **11** : 28-39.

📖 **Delattre, J . ; Durand G . and Jardillier J.C. (2003).** Biochimie pathologique ,Aspect moléculaire et cellulaire. *Médecine -sciences. Flammarion*, **59-81**.

📖 **Derbel,S. et Ghedira, K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, **1**: 28-34.

📖 **Escribano-Bailon, M.T and Santos-Buelga, C. (2003).** Polyphenol extraction from foods. In: “Method in polyphenol analysis”. *Journal of: Royal society of chemistry*, **1-16**.

📖 **Escribano-Bailon, M.T and Santos-Buelga, C. (2003).** Polyphenol extraction from foods. In: “Method in polyphenol analysis”. *Journal of: Royal society of chemistry*, **1-16**.

📖 **Eymard, S. (2003).**Mise en evidence et suivi de l’oxydation des lipides au cours de la conversation et de la transformation de chinchard (Trachurus Trachurus) choix des procédés.*Thèse de Doctorat en Génie des procédés :spécialité Biochimie.Nante,France.*

📖 **Faiyazuddin, C.V.R .(2011)** Hepatoprotective effect of *Solanum xanthocarpum* fruit extract against CCl4 induced acute liver toxicity in experimental animals. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **964-968**.

📖 **Farhoudi,M. Ghodratizadeh.S and Ghodratizadeh.S.(2011).** Effects of Salvia officinalis Extract on Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity *Global Veterinaria*, **7 (4): 353-357**.

- 📖 **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, **108-115**.
- 📖 **Garait, B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique ou par voie gazeuse et effet de la GliSODin. *Thèse doctorat, université Joseph Fourier*, **22-23**.
- 📖 **Genot ,C.1 ; Michalski, M.C.2. (2010).** Impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments. *Innovations Agronomiques*. **10 : 43-67**.
- 📖 **Ghedira,K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique .*Phytothérapie*, **4: 162-169** .
- 📖 **Goudable, J. et Favier, A. (1997).**Radicaux libres oxygénés et antioxydant. *Nutrition clinique et métabolisme*, **11: 115-120**.
- 📖 **Goussard, J.P. (1999).** Les radicaux libres et antioxydant. *Denis RICHE in Guide nutritionnel des sports d'endurance*, **1-11**.
- 📖 **Gupta,R.K. ; Hussain.T. ; Panigrahi.G. ; Das.A. ; Narayan Singh.G , KSweety1, Md Leelaprakash, S.; Mohan Dass. And V. Sivajothi. (2011).** Antioxydant and hepatoprotective activities of vernonia cinerea extract against ccl₄ induced hepatotoxicity in albino rats.
- 📖 **Gutteridge, J.M.C. ; Maitt, L. and Lee, P. (1990).** Superoxide dismutase and Fenton chemistry. *Biochemistry*, **269:169-174**.
- 📖 **Gutteridge, J. (1995).** Peroxydation et antioxydants de lipide comme Biomarkers des dommages de tissu. *Clinical Chemistry*, **41: 12**.
- 📖 **Halliwell, B. (2008).** Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **476: 107-112**.
- 📖 **Han, X. ; Shen, T. and Lou, H. (2007).** Dietary polyphénols and their biological significance.*International Journal of Molecular Sciences*, **8: 950-988**.
- 📖 **Harish et Shivanandappa . (2006).** Antioxydant activity and hepatoprotective Potential of Phyllanthus niruri. *Food Chemistry*, **95 :180–185**.
- 📖 **Hennebelle, T. ; Sahpaz, S. et Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1: 3-6**.

- 📖 **Joshi, M. ; Billing, H.B. and Hallinan.T.H. (1995);** Investigation of the role of reactive oxygen species in bilirubin metabolism in the Gunn rat, *Biochimica et Biophysica Acta* 1243, **244-250.**
- 📖 **Kandamir,A. ; Güray.H. ; Kutbay.and Kiliç .(1998).** Phytosociological and Ecological Structure of *Fraxinus Angustifolia* Subsp. *oxycarpa* Forests in the Central Black Sea Region *Tr. J. of Botan,y* **22 :157-162.**
- 📖 **Khanbabaee, K. and Van Tee, T. (2001).** Tannins: classification and definition. *Natural Product Report*, **18: (6) 641–649.**
- 📖 **Khan Masood,A. ; Faisala,S.E.M. Khan Mushahid,M.b, ; Nadeemc,A. M.U. Siddiqud ,and M. Owais .(2002).** Binding of bilirubin with albumin, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1564:219– 226.**
- 📖 **Kirkham, P. and Rahman, I. (2006).**Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics.*
- 📖 **Koechlin-Ramonatxo C. (2006).**Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et metabolisme*, **20: 165-177.**
- 📖 **Kohen,R .and Nyska, A. (2002)** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, **30: 620-650.**
- 📖 **Kostova, I.; and Iossifova, T. (2007).** Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia*, **78: 85-106.**
- 📖 **Kostova,I. and Iossifova, T. (2006).** Chemical components of *Fraxinus* species. *Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry,Bulgarian Academy of Sciences, Sofia1113, Bulgaria.*
- 📖 **Krishnaraju, A.V.; Rao,C.V.; Rao, T.V.N.; Reddy, K.N. and Trimurtulu, G. (2009).** Invitro and In vivo Antioxidant Activity of *Aphanamixis polystachya* Bark. *American Journal of Infectious Diseases*, **5 (2): 60-67.**

📖 **Laguerre, M ; Lecomte, J and Villeneuve, P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipidoxidation: Existing methods, new trends and challenges. *UMR1208 Inge ´ nerie des Agropolyme ` res et Technologies Emergentes, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro,*

Universite ´ Montpellier 2, F-34000 Montpellier, France *Researc*, **46 :244–282.**

📖 **Leelaprakash.; mohan dass,S. and Sivajothi.V. (2011).** antioxidant and hepatoprotective activities of vernonia cinerea extract against ccl4 induced hepatotoxicity in albino rats, **10: 638 503.**

📖 **Léger, C. L. (2006).** Anti-oxydants d’origine alimentaire: diversité, mode d’action anti-oxydante, interactions. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **13: 2-3.**

📖 **Levizou, E. ; Petroupoulu, Y. and Manetas, Y. (2004).** Total carotenoid amount in crude twig extracts may be overestimated due to interference by high contents of co-extracted phenolics. *Photosynthetica*, **42: 295-297.**

📖 **Macheix, J.J.; Fleuriet, A et Sarni-Manchado, P. (2006).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaire. Edition *Technologie et document*. Paris, **380-398**

📖 **Martin, E. et Feldmann, G.(1983).** Histopathologie du foie et des voies biliaires de l'adulte et de l'enfant. *Ed. Masson*, **357 .**

📖 **Martin, S. and Andriantristohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l’endothélium. *Annales de Cardiologie et d’Angéiologie*, **51: 304-315.**

📖 **Masella,T.R. ; Di Benedetto,R. ; Vari ,R.; Filesi,C.and Giovannini.C. (2005).** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes .*B Journal of Nutritional Biochemistry*, **16:577-586.**

📖 **Merlin, N.J and Parthasarathy.V. (2011) .** Antioxidant and hepatoprotective activity of chloroform and ethanol extracts of Gmelina asiatica aerial parts , *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(4): 533-538.*

- 📖 **Milane, H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres : étude et application thérapeutiques. *Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur*, **47- 49.**
- 📖 **Oyedemi,O. M. ; Yakubu.T ; and Afolayan,A.J. (2011)** Antidiabetic activities of aqueous leaves extract of *Leonotis leonurus* in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5(1):119-125.**
- 📖 **Pasquier, C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des laboratoires*, **276: 87-96.**
- 📖 **Pietta, P.G. (2000).** Flavonoids as antioxydants. *Journal of Natural Products*, **63: 1035-1042.**
- 📖 **Pincemail, J. ; Meurisse, M. ; Limet, R. et Defraigne, J.O. (1998).** Fumée de cigarette:une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. *Medi Sphere*, **78 :1-3.**
- 📖 **Pincemail, J. ; Lecomte, J. ; Collart, E. ; Castiaux, J.P. and Defraigne, J. O. (2001).** Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Medecine Interne*, **6(5) : 1-3.**
- 📖 **Pincemail, J. ; Bonjean, k. ; Cayeux, K. and Defraigne, G.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16: 233–239.**
- 📖 **Pokorny, I. ; Rzepa J. and Janicek G. (1976)** lipid oxidation. Part I. effect of carbonyl group on the decomposition of lipid hydroperoxide. *Nahrung*. **20 :1-14.**
- 📖 **Pokorny,J. ; Yanishlieva,N. et Gordon. (2001).** les antioxydants dans les aliments, *les applications pratiques , woodhead publishing limited , CRC press.Cambridge Angletterre.*
- 586.**
- 📖 **Ré, D.B.; Nafia, I. ; Nieoullon, A. ; Le Goff, L.K. ; et Had-Aissouni, L. (2005).** Stressoxydatif cérébral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulairesde glutamate ? *Implications sur la survie neuronale. Annales Françaises d'Anesthésie et deRéanimation*, **24 : 502-509.**
- 📖 **Rice-Evans, C. A. Miller, N. J. and Paganga, G. (1996).** Structure-antioxydant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, **20 (7):933-956.**

📖 **Richter, G. (1993).** Métabolisme des végétaux. In « Physiologie et biochimie ». Edition : Presses polytechniques et universitaires Romandes, **318 - 338.**

📖 **Rolland, Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. *OCL* **11: 419-424.**

📖 **Salvayre A.N. et Salvayre R. (2005).** Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. *OCL*. **12 (5) : 433-438.**

📖 **Skerget, M. ; Kotnik, P. ; Hadolin, M.; Hras, A.R.; Simonic, M and Knez, Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Food Chemistry*, **89: 191-198.**

📖 **Tomaro, U. et Alcira, M. (2002).** Bilirubine : is role in cytoprotection against oxidative stress . *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34 : 216–220.**

📖 **Uzma Nazia, ; Santhosh Kumar B and Anees. S. (2011).** Red wine ameliorates CCl4 induced acute liver injury in rats. *AJBS* **1(1) :1-7.**

📖 **Valko, M. ; Leibfritz, D. ; Moncol, J. ; Cronin, M.T.D. ; Mazur, M. and Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39: 44-84.**

📖 **Valko, M. ; Rhodes, C.J. ; Moncola, J. ; Izakovic. M. ; and Mazura, M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160: 1-40**

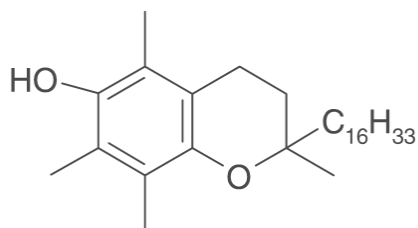
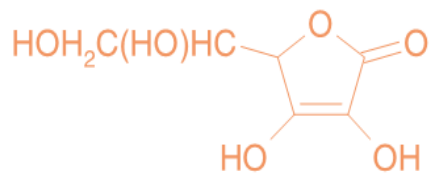
📖 **Vamecq, J.; Vallée, L.; Storme, L.; Gelé, P.; et Bordet, R. (2004).** Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*, **18 (1) :16-23.**

📖 **Vudaa, M. ; D'Souza, R. ; Upadhyay, S. ; Kumar, V. ; Raob, N. ; Kumara, V. ; Boillat, C. and Prakash. (2011).** Mungli Hepatoprotective and antioxidant activity of aqueous extract of *Hybanthus enneaspermus* against CCl4-induced liver injury in rats, *Experimental and Toxicologic Pathology*, **5.**



Annexe

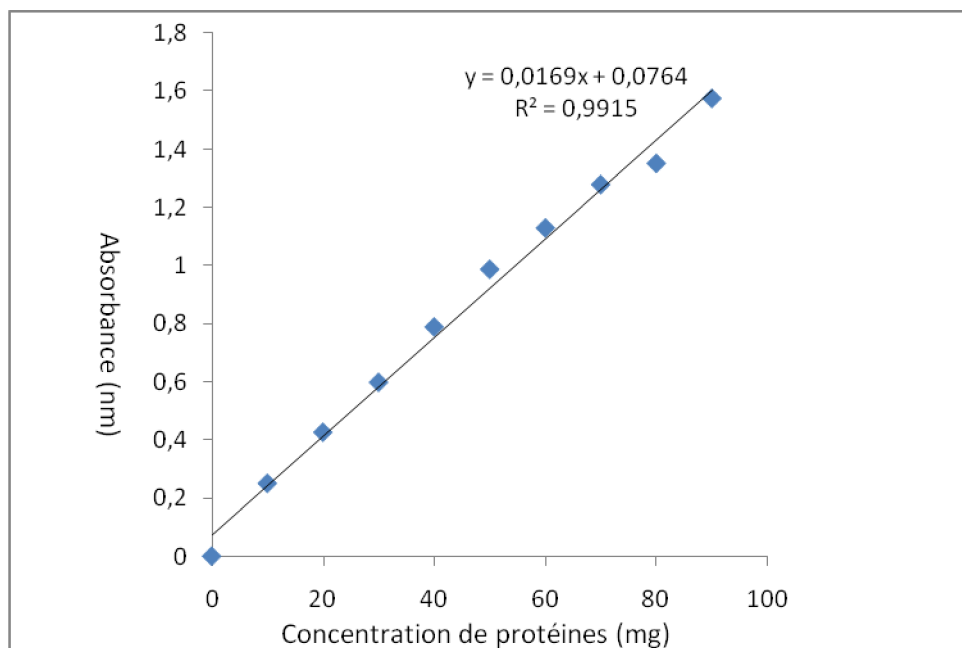
Annexe 01

 α -tocophérol

acide ascorbique

Figure N°1: structure chimique de quelques antioxydants non enzymatique.

Annexe 02

**Figure N°2 :** Courbe d'étalonnage de dosage des protéines de Bradford.

Annexe 03

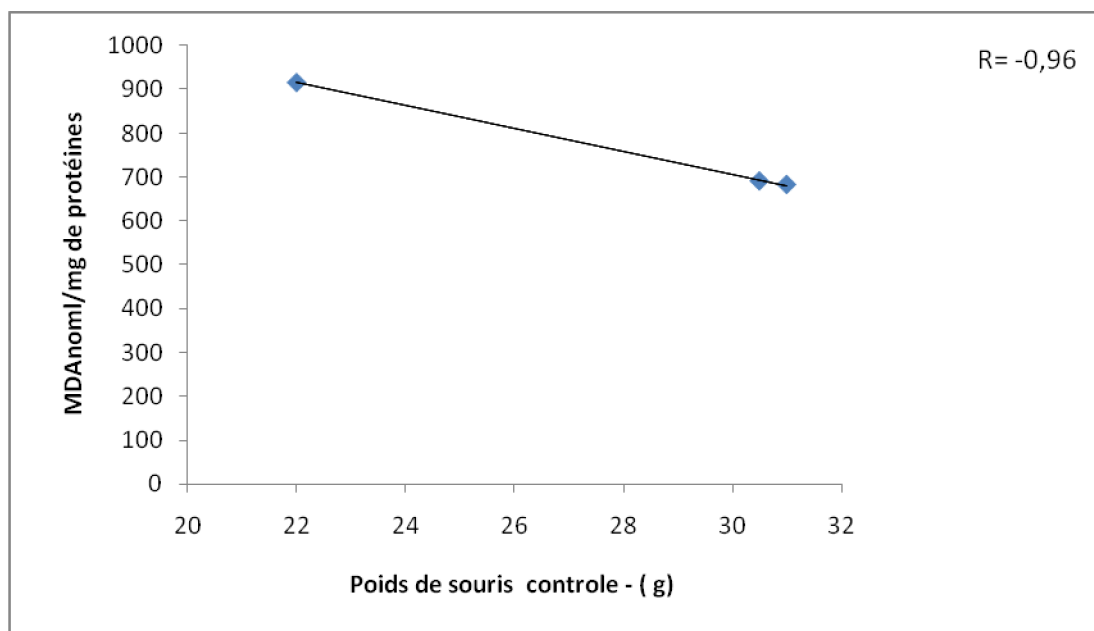


Figure N°2 : Corrélation entre le poids des souris du control négative et le taux de MDA.

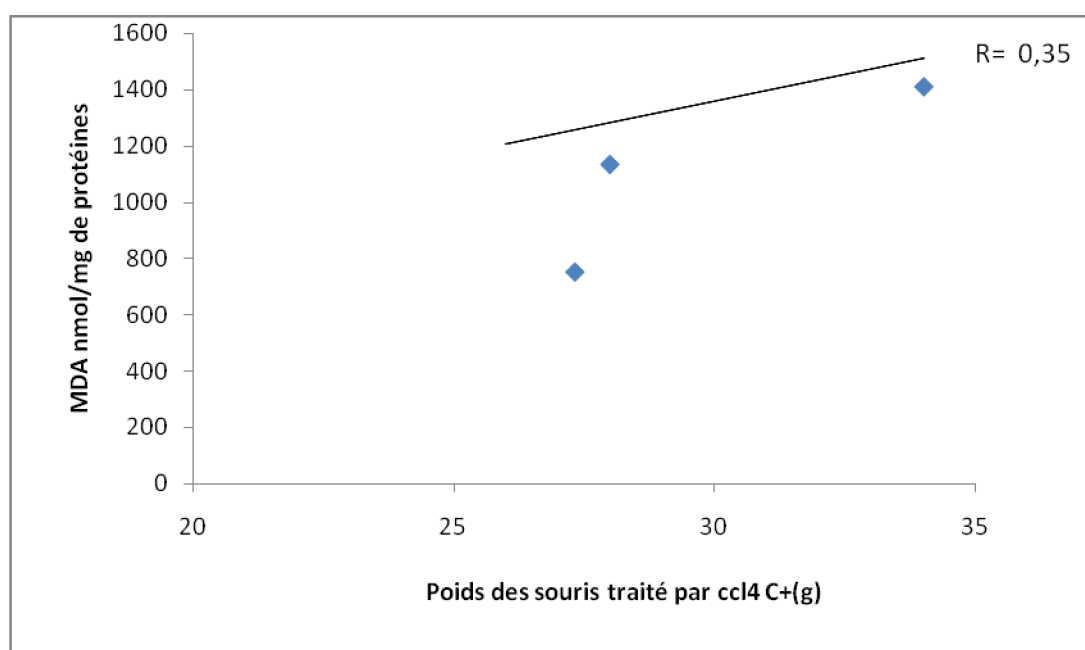


Figure N°3 : Corrélation entre le poids des souris du control positive et le taux de MDA.

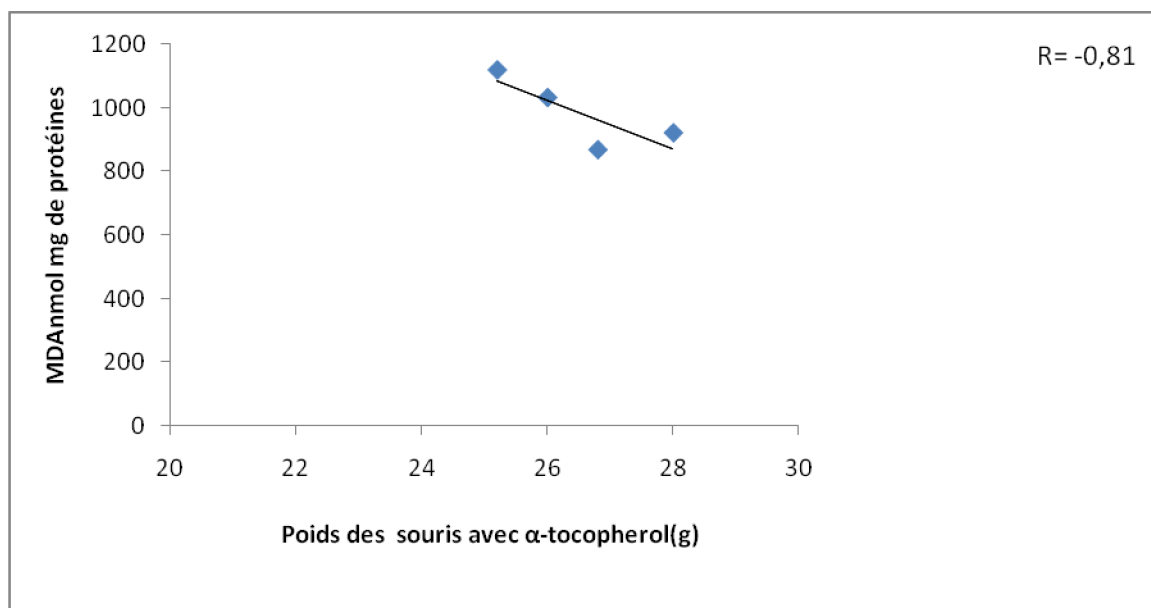


Figure N°3 : Corrélation entre le poids des souris reçu la α tocophérol et le taux de MDA.

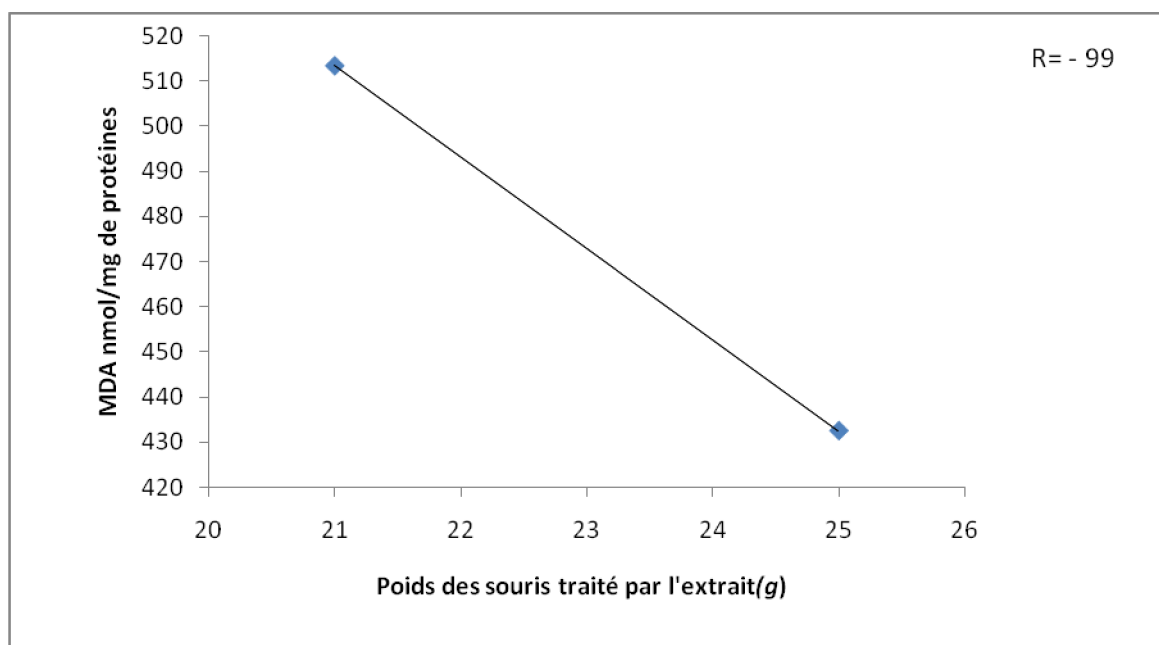


Figure N°4 : Corrélation entre le poids des souris reçu l'extrait et le taux de MDA.

Annexe 04

Tableau N°1 : Dosage des protéines

Test	X : concentration de protéines (mg)
Contrôle négatif 1	49,79
Contrôle négatif 2	52,92
Contrôle négatif 4	39,17
Contrôle négatif 5	38,69
Contrôle positif 1	70,35
Contrôle positif 2	61,41
Contrôle positif 3	50,85
Contrôle positif 4	56,65
Contrôle positif 5	28,37
Standard 2	54,34
Standard 3	41,65
Standard 4	45,53
Standard 5	38,99
Extrait 1	77,91
Extrait 2	69,65
Extrait 3	54,32
Extrait 4	60,21
Extrait 5	54,25

Résumé

Fraxinus angustifolia est une plante médicinale largement utilisée dans le traitement de diverses maladies. L'objectif de cette étude est d'évaluer les propriétés antioxydants *in vivo*, de l'extrait aqueux acétate d'éthyle de feuilles de *Fraxinus angustifolia* contre des dommages hépatiques de foie des souris albinos induits par le CCl₄. Les résultats montrent des effets protecteurs et antioxydants de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle à une dose de 50 mg/kg. Cela en réduisant le taux de MDA (472,95nmol/mg de protéine) d'une façon significative ($p \leq 0.05$) par rapport au contrôle positif (1477,2nmol/mg de protéine); le standard α -tocophérol (891,9nmol/mg). D'autre part, l'administration de cet extrait a induit une diminution accrue des niveaux de bilirubine totale chez les souris prétraitées avec le CCL₄ avec une de (0,353mg/dl). Ces résultats témoignent un excellent effet protecteur de cet extrait vis-à-vis les dommages hépatiques et approuvent l'utilisation thérapeutique de cette plante.

Mots – clés : *Fraxinus angustifolia*, effet Hépatoprotecteur, tétrachlorure de carbone, peroxydation lipidique.

Abstract

Fraxinus angustifolia is a medicinal plant largely used in the treatment of various diseases. The objective of this study is to evaluate the antioxydant properties *in vivo*, of aqueous extract of ethyl acetate of *Fraxinus angustifolia* leaves against hepatic damage of liver of the albino mice induced by CCL₄. The results show protective effects and antioxydants of aqueous extract of ethyl acetate at the concentration of 50 mg/kg. That by reducing the rate of MDA (472,95nmol/mg of protein) significantly ($p \leq 0.05$) compared to positive control (protein 1477,2nmol/mg of protein) and the standard α -tocopherol (891,9nmol/mg). In addition, the administration of this extract decreased the levels of bilirubin total in the mice serum with CCL₄ (353mg/dl). These results proved an excellent protective effect of this extract against the liver damage and approve the therapeutic use of this plant.

Keywords: *Fraxinus angustifolia*, Hepatoprotective effect, Carbon tetrachloride, lipid peroxidation.