

*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique*

*Université Abderrahmane MIRA de Bejaïa
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie physico-chimique*

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En biologie

Option : Biochimie Appliquée aux Substances Végétales Bioactives

Thème

**Activités anti-radicalaires des extraits
de *Fraxinus angustifolia* :
caractérisation des fractions actives**

Réalisé par : M^{elle} Laïb Yasmina

Membres du jury :

M^{me} Bedjou F.

Maître de conférences (UAMB), Présidente.

M^r Atmani D.

Professeur (UAMB), Rapporteur.

M^{me} Benabdesselam F.

Maître de conférences (UAMB), Examinatrice.

M^r Belhamel K.

Maître de conférences (UAMB), Examineur.

Année 2009/2010



Remerciements

*Au terme de ce travail, je remercie **Dieu** le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour le réaliser.*

J'adresse mes plus sincères remerciements à mon promoteur Mr Atmani. D pour m'avoir guidé, pour ses conseils, sa disponibilité et surtout son sérieux dans le travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Mes sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury : Madame le Docteur Bedjou F, qui ma fait l'honneur par sa présence en qualité de présidente de jury. Madame le Docteur Benabdesselam F et Mr le Docteur Belhamel K pour avoir accepté d'examiner ce travail

Mes remerciements sont également exprimés à tous le personnel du laboratoire de biochimie appliquée pour leurs : encouragements, gentillesse, conseils précieux et leur disponibilité.

Enfin, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicaces



Ce travail est dédié à tous ceux que j'aime.

Mina.



Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
I	Les principales classes de flavonoïdes.	27
II	Taux d'extraction (%) de feuilles et d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	43
III	Les composés que pourraient contenir les extraits végétaux	44
IV	Teneur en phénols totaux des extraits de <i>F. angustifolia</i> .	46
V	Teneurs en flavonoïdes des extraits de <i>F. angustifolia</i>	48
VI	Teneurs en tannins des extraits de <i>F. angustifolia</i>	49
VII	Activité anti-radicalaire contre le OH• à 100µg/ml des extraits de <i>F. angustifolia</i> et les standards.	53
VIII	Les IC ₅₀ des extraits des feuilles et des écorces de <i>F. angustifolia</i> et standards (effet anti- OH•)	57
IX	Exemples de travaux intéressés à l'étude de l'inhibition du radical hydroxyle	57
X	Activité anti-radicalaire contre le DPPH à 100µg/ml des extraits de <i>F. angustifolia</i> . et les standards.	60
XI	Les IC ₅₀ des extraits des feuilles et des écorces de <i>F. angustifolia</i> et les standards (effet anti-DPPH)	63
XII	Activité anti-radicalaire contre le H ₂ O ₂ à 100µg/ml des extraits de <i>F.angustifolia</i> et les standards.	65
XIII	Les IC ₅₀ des extraits des feuilles, des écorces de <i>F. angustifolia</i> et les standards (effet anti- H ₂ O ₂).	67
XIV	Effet scavenger contre le OH• des fractions des extraits des feuilles de <i>F. angustifolia</i> et le standard à 100µg /ml	69
XV	Effet scavenger contre le OH• des fractions des extraits d'écorce de <i>F. angustifolia</i> et le standard à 100 µg /ml	69
XVI	Effet scavenger contre le DPPH des fractions des extraits des feuilles de <i>F. angustifolia</i> et le standard à 100µg /ml	71
XVII	Effet scavenger contre le DPPH des fractions des extraits d'écorce de <i>F. angustifolia</i> et le standard à 100µg /ml	71
XVIII	Effet scavenger contre le H ₂ O ₂ des fractions des extraits des feuilles de <i>F. angustifolia</i> et le standard à 100µg /ml	72
XIX	Effet scavenger contre le H ₂ O ₂ des fractions des extraits d'écorce de <i>F. angustifolia</i> et le standard à 100µg /ml	72

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Principales sources des radicaux libres	5
2	Principales espèces réactives de l'oxygène	9
3	Principales classes de dommages de l'ADN	11
4	Effet de l'attaque du radical hydroxyle (OH [•]) sur la guanine	11
5	Photographie de <i>Fraxinus angustifolia</i>	18
6	Voies de biosynthèse des composés phénoliques	23
7	Les principales structures des phénols simples	25
8	Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique	25
9	Exemple de tannins hydrolysables	28
10	Exemple de structure d'un tannin condensé	29
11	Photographies de <i>F. angustifolia</i> . A) L'écorce. B) Les feuilles.	33
12	Schéma récapitulatif des étapes suivies pour la préparation des extraits	34
13	Photographies de la poudre végétale de <i>F. angustifolia</i> . A) L'écorce. B) Les feuilles	42
14	Histogramme des teneurs en phénols totaux des extraits de feuilles et de l'écorce de <i>F. angustifolia</i>	45
15	Histogramme des teneurs en flavonoïdes des extraits de feuilles et de l'écorce de <i>F. angustifolia</i>	47
16	Histogramme des teneurs en tannins des extraits de feuilles et de l'écorce de <i>F. angustifolia</i>	49
17	Principe de détection du radical OH [•] en utilisant le système H ₂ O ₂ -(Fe ⁺² – EDTA) acide ascorbique	51
18	Effet scavenger contre le radical OH [•] des extraits des feuilles et d'écorce de <i>F. angustifolia</i> et les standards à 100µg/ml.	52
19	Effet scavenger contre le radical hydroxyle des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> et les standards à différentes concentrations	56
20	Effet scavenger contre le radical hydroxyle des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et les standards à différentes concentrations	56
21	Réduction du radical DPPH par un antioxydant	58
22	Effet scavenger contre le DPPH des extraits des feuilles et d'écorce de <i>F. angustifolia</i> et les standards à 100µg/ml.	59
23	Effet scavenger contre le DPPH des extraits d'écorce de <i>F. angustifolia</i> et les standards à différentes concentrations	62
24	Effet scavenger contre le DPPH des extraits des feuilles de <i>F. angustifolia</i> et les standards à différentes concentrations	62
25	Effet scavenger contre le H ₂ O ₂ des extraits des feuilles et d'écorce de <i>F. angustifolia</i> et les standards à 100µg/ml	64

Suite :

26	Effet scavenger contre le H ₂ O ₂ des extraits des feuilles de <i>F. angustifolia</i> et les standards à différentes concentrations	66
27	Effet scavenger contre le H ₂ O ₂ des extraits des écorces de <i>F. angustifolia</i> et les standards à différentes concentrations.	66
28	Effet scavenger des fractions contre le OH [•]	69
29	Effet scavenger des fractions contre le DPPH	70
30	Effet scavenger des fractions contre le H ₂ O ₂	72
31	Chromatogrammes des fractions anti-DPPH de feuilles de <i>F. angustifolia</i> à la lumière du jour	76
32	Chromatogrammes des fractions anti-DPPH de <i>F. angustifolia</i> pulvérisés par la solution DPPH	76
33	Chromatogrammes de toutes les fractions actives de feuilles de <i>F. angustifolia</i> révélées par la vanilline sulfurique	77
34	Chromatogrammes des fractions anti-DPPH de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> pulvérisés par la solution DPPH	78
35	Chromatogrammes des fractions mixtes de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> révélées par la vanilline sulfurique	79
36	Chromatogrammes des fractions chloroformiques de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> révélées par la vanilline sulfurique	79



Sommaire

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

Partie théorique

I- Synthèse bibliographique

I-1 Espèces réactives de l'oxygène

I-1-1. Généralités.....	03
I-1-2. Sources et biogenèse	04
I-1-2-1. Sources non métaboliques.....	04
I-1-2-2. Sources métaboliques.....	04
I-1-2-2-1. L'anion superoxyde	05
I-1-2-2-2. Le peroxyde d'hydrogène	06
I-1-2-2-3. Le radical hydroxyle	07
I-1-3. Le stress oxydant.....	09
I-1-4. Cibles biologiques du radical hydroxyle (OH [•]).....	10
I-1-4-1. Les protéines	10
I-1-4-2. L'ADN	10
I-1-4-3. Les glucides.....	11
I-1-4-4. Les lipides	11
I-1-5. Défense physiologique contre les espèces oxydantes.....	12
I-1-5-1. Antioxydants enzymatiques	12
I-1-5-2. Antioxydants de faible poids moléculaire.....	13

I-2 Les plantes médicinales

I-2- 1. Historique des plantes médicinales.....	14
I-2- 2. La Phytothérapie.....	14
I-2-2-1. Parties utiles des plantes médicinales dans le domaine de la phytothérapie.....	15
I-2-2-2. Formes d'application et modes d'emploi des plantes médicinales	15
I-2-3. Intérêts d'utilisation des plantes médicinales	16
I-2-4. Risques d'utilisation des plantes médicinales	17
I-2-5. Actualité d'exploitation des plantes médicinales en Algérie	17
I-2-6. Exemple de plante médicinale : le Frêne (<i>Fraxinus angustifolia</i>)	17
I-2-6-1. Nomination et classification de la plante étudiée.....	18
I-2-6-2. Données phytochimiques sur la plante étudiée	19

I-3 Les principes actifs des plantes médicinales

I-3-1. Définition des métabolites secondaires	19
I-3-2. Classes de métabolites secondaires	20
I-3-2-1. Les alcaloïdes	20
I-3-2-1-1. Définition	20
I-3-2-1-2. Biosynthèse	20
I-3-2-1-3. Activités biologiques des alcaloïdes	21
I-3-2-2. Les huiles essentielles	21
I-3-2-2-1. Définition	21
I-3-2-2-2. Biosynthèse et classification	21
I-3-2-2-3. Activités biologiques des huiles essentielles	22
I-3-2-3. Les composés phénoliques	22
I-3-2-3-1. Définition	22
I-3-2-3-2. Biosynthèse	22
I-3-2-3-3. Classification	24
I-3-2-3-4. Activités antioxydants des composés phénoliques	29
I-3-2-3-5. Propriétés physico-chimiques des composés phénoliques	31

Partie expérimentale

II- Matériel et méthodes

II-1. Préparation des extraits	33
II-1-1. Récolte du matériel végétal	33
II-1-2. Séchage, broyage et tamisage	33
II-1-3. Extraction	33
II-2. Quantification des composés phénoliques	35
II-2-1. Quantification des phénols totaux	35
II-2-2. Quantification des flavonoïdes	36
II-2-3. Quantification des tannins	37
II-3. Evaluation de l'effet anti-radicalaire des extraits	37
II-3-1. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le radical hydroxyle	37
II-3-2. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le radical DPPH	38
II-3-3. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le peroxyde d'hydrogène	39
II-4. Etude chromatographique des fractions	40

II-4-1. Fractionnement des extraits par la chromatographie sur colonne.....	40
II-4-2. Evaluation des activités anti-radicalaires des fractions.....	40
II-5. Chromatographie sur couches minces.....	41

III- Résultats et discussion

III-1. Préparation des extraits.....	42
III-2. Quantification des composés phénoliques.....	45
III-2-1. Quantification des phénols totaux.....	45
III-2-2. Quantification des flavonoïdes.....	47
III-2-3. Quantification des tannins.....	48
III-3. Evaluation de l'effet anti-radicalaire des extraits.....	50
III-3-1. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le radical hydroxyle (OH [·]).....	50
III-3-2. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le radical DPPH.....	58
III-3-3. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	63
III-4. Etude chromatographique des fractions.....	68
III-4-1. Activité scavenging des fractions sur le radical hydroxyle.....	68
III-4-2. Activité scavenging des fractions sur le radical DPPH.....	70
III-4-3. Activité scavenging des fractions sur le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	71
III-5. Chromatographie sur couches minces.....	74
III-5-1. Caractérisation des fractions des extraits de feuilles.....	75
III-5-2. Caractérisation des fractions des extraits d'écorce.....	78
IV-Conclusion.....	80
V-Références bibliographiques.....	82
Annexes	



Introduction

Depuis des milliers d'années, l'Homme a su exploiter les richesses naturelles des plantes qui l'entouraient pour se soigner, ce qui a accumulé avec le temps une très ancienne discipline appelée médecine traditionnelle (Houdret, 2004). Cette pratique, transmise d'une génération en génération constitue aujourd'hui une base de donnée précieuse sur les plantes médicinales.

Auparavant, la recommandation d'usage d'une plante médicinale pour le traitement d'une pathologie quelconque est basée seulement sur la constatation de l'effet bénéfique que pourrait exercer cette plante, sans savoir à quoi serait-il dû cet effet. Avec les récentes avancées scientifiques de ce domaine, on s'est rendu compte que les plantes médicinales exercent leurs effets thérapeutiques grâce à des principes actifs, qui font partie de leurs métabolites secondaires et qui agissent d'une manière spécifique dans le traitement de ces pathologies. Selon des estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), elles représentent environ 70% des matériaux de base des produits pharmaceutiques modernes.

A cet effet, l'investigation des plantes représente un potentiel intéressant pour la découverte de nouvelles substances à effet thérapeutique contre plusieurs pathologies, si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ces derniers sont constitués, en grande partie, des composés phénoliques tels que les phénols simples, les flavonoïdes et les tannins.

Le stress oxydant est défini comme étant une oxydation intracellulaire excessive due à un déséquilibre entre les systèmes antioxydants et les systèmes pro-oxydants en faveur de ces derniers ; impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ces dernières, majoritairement représentées par les radicaux libres (Fontaine, 2007), sont à l'origine de nombreuses pathologies humaines allant de l'inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardio-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde, le diabète et le processus d'apoptose.. Afin de neutraliser leurs effets délétères, diverses stratégies antioxydantes ont été mises en évidence, incluant des systèmes enzymatiques et non enzymatiques (Berger, 2006).

La reconnaissance des composés phénoliques comme des antioxydants naturels est maintenant bien acquise et est pour une part à l'origine du regain d'intérêt que l'on porte à ces composés dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. De ce fait, la recherche de substances naturelles dotées d'activités biologiques et/ou pharmacologiques et leur valorisation présentent un intérêt socio-économique, peut être sans équivoque en biopharmacologie. Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail de recherche dont l'objectif

essentiel consiste à évaluer l'effet anti-radicalaire des extraits aqueux et organiques des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia*. Dans cette étude nous avons fixé les quatre objectifs suivants :

- Évaluation quantitative du contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins des différents extraits aqueux et organiques des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia*
- Evaluation du pouvoir piégeur (scavenger) des différents extraits de *F. angustifolia* sur le OH^\cdot , le DPPH et le H_2O_2 .
- Etude des effets anti-radicalaires des fractions issues des extraits qui ont donné les meilleurs taux d'inhibition via les trois radicaux cités précédemment.
- Caractérisation de ces fractions par l'utilisation de la CCM.



I- Synthèse bibliographique

I-1. Espèces réactives de l'oxygène

Plusieurs réactions biologiques impliquent l'oxydation de l'oxygène moléculaire (O_2) comme substrat où accepteur d'électrons. Ces types de réactions sont catalysées par un groupe d'enzymes métalloprotéines appelées "oxydases". Plus de 90% de l'oxygène consommé par les cellules des mammifères est catalytiquement réduit par quatre électrons pour produire deux molécules d'eau. Cependant, l' O_2 peut être réduit par moins de quatre électrons, par certaines oxydases, donnant ainsi naissance à des espèces oxygénées partiellement réduites et hautement réactives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou reactive oxygen species (ROS), selon la terminologie anglaise (Grisham et McCord, 1986). Les ERO sont des formes variées de l'oxygène activé, elles incluent les radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), et les espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Halliwell et Whiteman, 2004).

I-1-1. Généralités

Les physiciens et les biophysiciens s'intéressent depuis longtemps aux radicaux libres (RLs) dont la découverte a suscité un intérêt considérable. Un RL est toute espèce à existence indépendante, contenant un ou plusieurs électron (s) non apparié (s) sur l'orbitale externe (Gutteridge, 1995 ; Balin et Vilenchik, 2007). Ils apparaissent au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, ou au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radicalaire.

Vu leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable ; donc ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron, ou bien par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule et peuvent ainsi être oxydants ou réducteurs (Koechlin-Ramonatxo, 2006). La probabilité d'aller vers l'une ou l'autre de ces deux états dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre considéré. Si cette dernière est modérée, la probabilité d'accepter un second électron est grande et, dans ce cas, le radical libre ne représente qu'une étape transitoire dans une réaction d'oxydoréduction classique. Si, au contraire, cette instabilité est importante, l'électron libre est rapidement transféré sur une autre molécule (Fontaine, 2007). Ces espèces sont très réactives avec des constantes de vitesse très élevées pouvant aller de 10^5 à $10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ils sont peu spécifiques et peuvent réagir avec plusieurs molécules incluant

les protéines, les lipides, les glucides et l'ADN. Ainsi les RLs attaquent la molécule stable la plus proche enlevant son électron ; cette molécule devient un radical libre à son tour initiant ainsi la réaction en chaîne qui se caractérise par trois étapes : initiation, propagation et terminaison, provoquant enfin une perturbation dans la cellule (Martínez-Cayuela, 1995).

I-1-2. Sources et biogenèse

I-1-2-1. Sources non métaboliques

Les organismes vivants sont exposés à une large variété de RLs de sources non métaboliques (exogènes). Les rayonnements, qu'ils soient X ou γ , peuvent par différents mécanismes les faire apparaître en scindant la molécule d'eau en deux radicaux. Les rayonnements ultraviolets, quant à eux, sont capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation de photosensibilisants (Beani, 1995).

Les polluants de l'air, comme la fumée des cigarettes et les contaminants industriels, constituent une source importante des ERO, ils attaquent et causent des endommagements dans l'organisme que ce soit par interaction directe avec la peau ou après inhalation dans les poumons (Kirkhan et Rahman ; 2006).

Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides,... etc.) et médicaments (antibiotiques, anticancéreux...etc.) peuvent contribuer à la production des RLs qui se forment comme un des produits de leur métabolisme *in vivo* (Martínez-Cayuela, 1995).

Une grande partie des aliments consommés est oxydée et contient différents types d'oxydants tels que les peroxydes, les aldéhydes, les acides gras oxydés et les métaux de transition. Ces derniers génèrent des radicaux hydroxyles très actifs.

I-1-2-2. Sources métaboliques

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites non seulement sous l'influence d'agents exogènes de nature physique ou chimique, mais également, spontanément et de manière continue au sein de l'organisme, en particulier par fuite d'électrons à partir de la chaîne respiratoire et au cours de l'élimination des composés tissulaires peroxydés. Elles sont la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme (Koechlin-Ramonatsco, 2006).

La production des ERO dans les cellules est essentiellement d'origine enzymatique et résulte de plusieurs sources : la NAD(P)H oxydase membranaire et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire en sont les principales. D'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites cellulaires (figure 1), peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire : xanthine oxydase, enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipoxygénases, cyclo-oxygénases), enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450) et peroxysomes (Beaudeau et *al.*, 2006b).

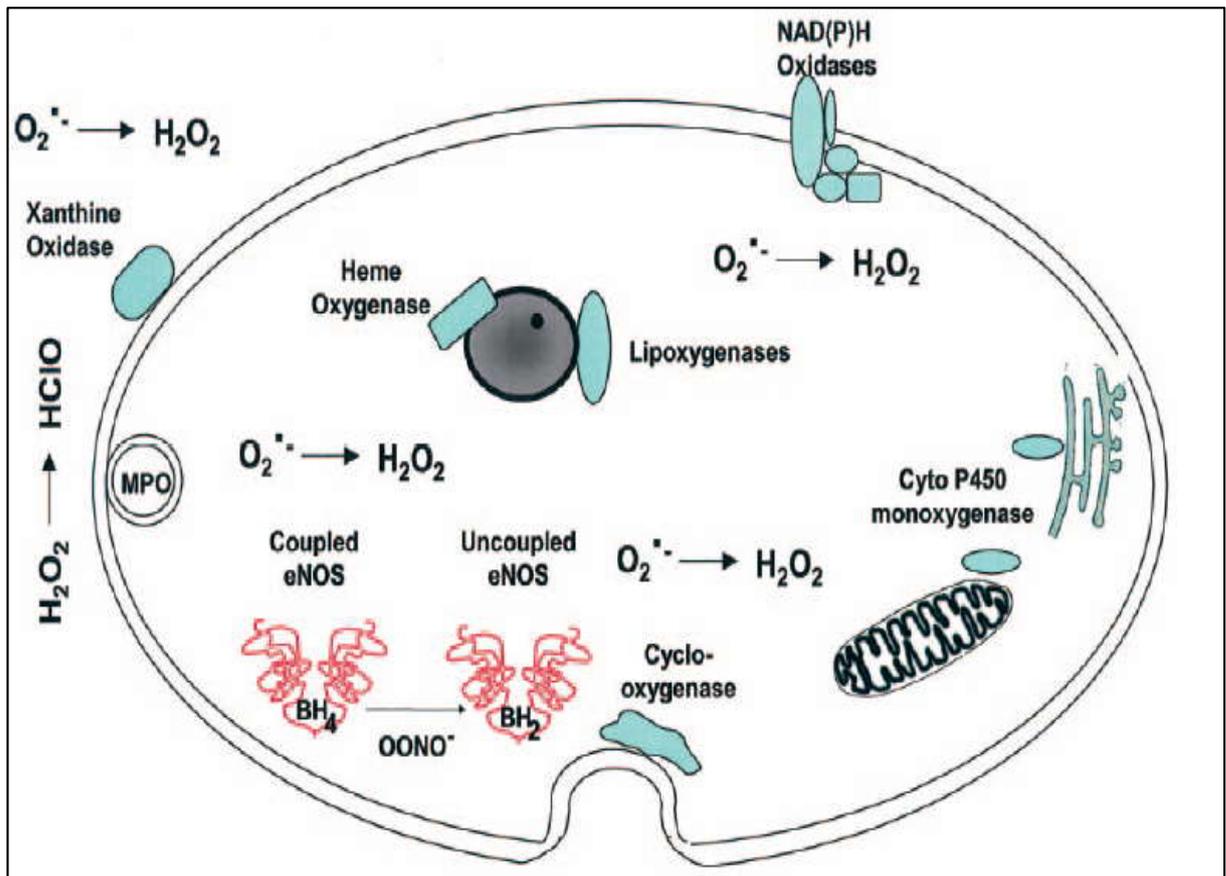
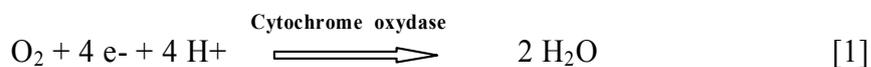


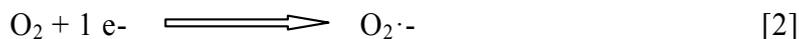
Figure 01 : Principales sources des radicaux libres (Griendling et Fitzgerald, 2003).

I-1-2-2-1. L'anion superoxyde

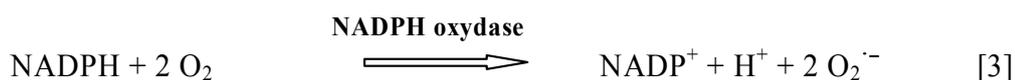
La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (réaction 1) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons, située dans la membrane interne mitochondriale.



Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser «fuir» une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 à 5% de l'oxygène subit une réduction mono électronique (réaction 2), conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2 \cdot^-$ (Beaudeau *et al.*, 2006b)



Les cellules phagocytaires polynucléaires et macrophages possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui produit le radical superoxyde $O_2 \cdot^-$ (Fontaine, 2007b). L'enzyme catalyse la réduction monoélectronique de l'oxygène en utilisant le NADPH, H^+ comme donneur d'électrons (réaction [3]) (Babior, 2004 ; Beaudeau *et al.*, 2006).



La réduction de l'oxygène par la xanthine oxydase (OX) permet également la formation de l'anion superoxyde $O_2 \cdot^-$, selon la réaction [4] (Beaudeau *et al.*, 2006b).



I-1-2-2-2. Le peroxyde d'hydrogène

Le radical superoxyde est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD), qui catalysent sa disparition par dismutation (réaction [5]) aboutissant à la formation du H_2O_2 (Baudin, 2006).



Sa production peut également résulter de la réduction biélectronique de l'oxygène moléculaire (réaction [6]) en présence d'oxydases qui se trouvent principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxysomes (Gardès-Albert *et al.*, 2003).



Le H_2O_2 est un produit plus stable que les radicaux superoxydes ; c'est pourquoi il diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires. Il est potentiellement toxique pour la cellule (Genestra, 2007).

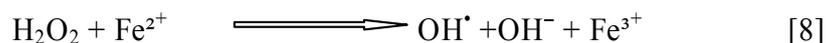
I-1-2-2-3. Le radical hydroxyle

La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle OH[•]. Ce dernier est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques ayant une durée de demi-vie très courte, il peut réagir pratiquement avec toutes les macromolécules. C'est une espèce qui ne diffuse quasiment pas au sein des milieux biologiques et qui réagit sur le lieu même de sa production. Il ne peut être mis en évidence dans les milieux biologiques que par ses produits d'oxydation (Gardès-Albert, 2006).

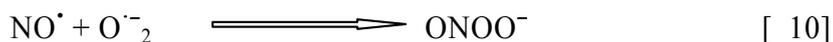
L'hydroxyle constitue le radical libre le plus toxique en biologie. Il est notamment à l'origine de la production des radicaux libres dit « secondaires », suite à sa réaction avec différents composés cellulaires (Rochette, 2008). Il peut être aussi, produit à partir de l'eau par les radiations ionisantes dans tous les organismes vivants, selon la réaction [7] (Lu et al., 2006).



En présence de certains métaux de transition, dont le plus important est le fer (Fe), l'O₂^{•-} et le H₂O₂ peuvent s'interagir pour produire le radical hydroxyle (OH[•]) par les réactions de Fenton [8] et Haber-Weiss [9] (De Leiris, 2003 ; Vamecq et al., 2004 ; Edreva et al., 2005).



Les deux radicaux NO[•] et O₂^{•-} peuvent interagir pour générer le peroxy-nitrite (selon la réaction (10)), qui est une espèce oxydante importante, car sa réactivité est assez proche de celle du radical hydroxyle (OH[•]) (Vamecq et al., 2004 ; Genestra, 2007).



Le peroxy-nitrite, peut se décomposer pour libérer le radical hydroxyle indépendamment de la catalyse par les métaux, selon la réaction [11] (Conner et Gricham, 1996).



Aussi le superoxyde réagit avec l'hypochlorite (HOCl) pour former le radical hydroxyle, selon la réaction [12] (Pou et *al.*, 1995).



Pour détecter l'OH[·] des méthodes dites indirectes sont utilisées et qui détectent les produits de sa réaction. Ces méthodes peuvent mesurer l'oxydation et/ou la décomposition de certains substrats cibles, tels que le désoxyribose, La conséquence de cette oxydation est la formation de nouveaux produits, tels que le malonate-dialdéhyde (MDA), qui seront détectés et quantifiés.

La génération du OH[·] peut être estimée en mesurant les niveaux extracellulaires de l'acide 2.3 et 2.5-dihydroxybenzoïque formé par hydroxylation de l'acide salicylique (Coudray et Favier, 2000 ; Hara et *al.*, 2009) ; les thiols liés aux protéines peuvent être quantifiés par les méthodes spectrophotométriques, par exemple, avec le 5,5'-dithiobis 2-nitro- acide benzoïque (DTNB) (Maki et *al.*, 2009).

Le radical OH[·] est capable d'attaquer le cycle benzène aromatique en produisant *in vivo* des composés hydroxylés qui peuvent être mesurés directement (Coudray et Favier, 2000 ; Chen et *al.*, 2002). Dans les liquides biologiques, les diènes conjugués, l'hydroperoxyde et surtout les aldéhydes peuvent être mesurés par réaction avec l'acide thiobarbiturique sous le nom de dosage des TBARs (*thiobarbituric acid reactant substances*) (Bonfont-Rousselot, 2004). Le MDA, molécule fortement réactive est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés par les radicaux libres (Lahouel et *al.*, 2004). D'autres marqueurs du stress oxydant de nature lipidique comme le 4-hydroxy-nonéanal et ou nucléotidique comme le 8-hydroxy-désoxyguanosine peuvent être mesurés (Baudin, 2006).

Les ERO ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance (Gardès 2003). La figure 2 résume toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans ses cellules.

I-1-4. Cibles biologiques du radical hydroxyle (OH[•])

I-1-4-1. Les protéines

Les protéines sont sensibles à l'action du radical hydroxyle, ce dernier peut réagir avec différents acides aminés des chaînes protéiques (Koechlin-Ramonatxo, 2006), les plus sensibles à son action sont en particulier les acides aminés soufrés (la cystéine par exemple s'oxyde en cystine ou en acide cystéique et la méthionine en sulfoxyde ou sulfone), les acides aminés basiques (histidine, lysine, arginine en dérivés carbonyles ou hydroxydes semi-aldéhydes) et les acides aminés aromatiques (la phénylalanine en ortho-tyrosine, le tryptophane en cynurénine, la tyrosine en dopamine) (Baudin, 2006). Ainsi l'oxydation des acides aminés constituant les protéines conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique. Les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant ainsi la signalisation cellulaire. Le radical OH[•] est aussi capable de couper les liaisons peptidiques et de former des fragments protéiques. Par ailleurs, il s'attaque également aux protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif (Pasquier, 1995 ; Gardès-Albert, 2006).

I-1-4-2. L'ADN

L'ADN qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des radicaux hydroxyles. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec le désoxyribose en lui arrachant un atome d'hydrogène aboutissant à la formation d'une cassure simple brin et d'un aldéhyde, mais aussi peuvent s'additionner sur les carbones : C₅ et C₆ des pyrimidines, C₄, C₅ et C₈ des purines provoquant des lésions graves (Therond, 2006). Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont pas réparées, entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les principaux dommages oxydatifs qui résultent de l'action du OH[•] sur le patrimoine génétique des cellules sont essentiellement : des bases oxydées, des sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (figure 3) (Favier, 2003). L'une des mutations les plus fréquentes est due à la réactivité de l'hydroxyle (OH[•]) envers la guanine qui s'oxyde en 8-hydroxy-guanosine (figure 4). Au cours de la réplication de l'ADN, la guanine s'associe normalement avec la cytosine, or que, la guanine

oxydée (8-hydroxy-guanosine) se fixe avec une autre base purique, en l'occurrence l'adénine, ce qui provoque une mutation G (guanine)-T (thymine) dans le brin néosynthétisé de l'ADN (Pincemail et *al.*, 1999), cette mutation est souvent observée dans les cellules cancéreuses (Favier, 2003).

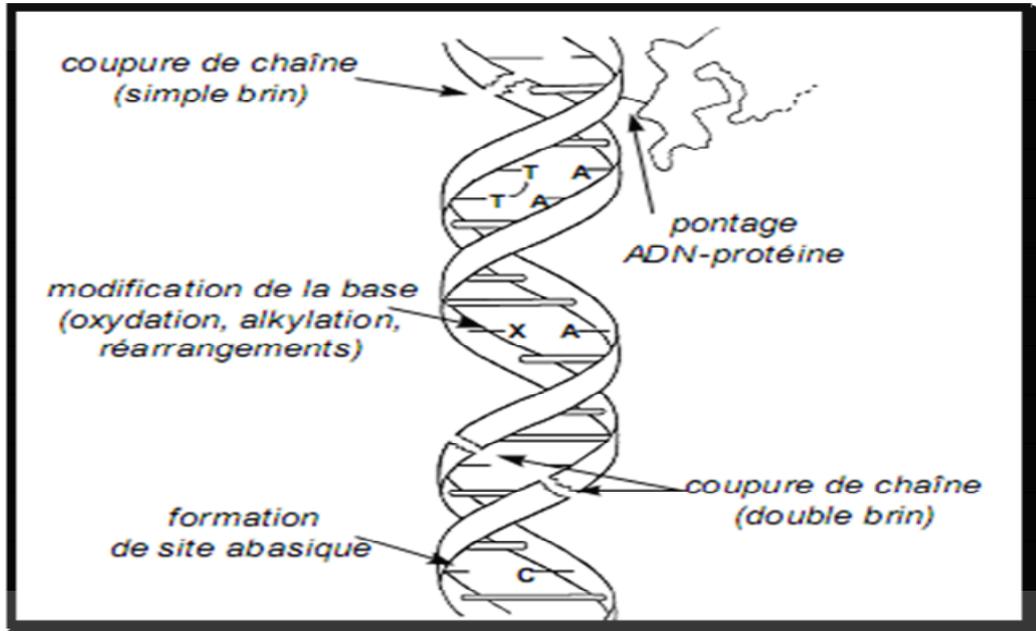


Figure 03 : Principales classes de dommages de l'ADN (Favier, 2003).

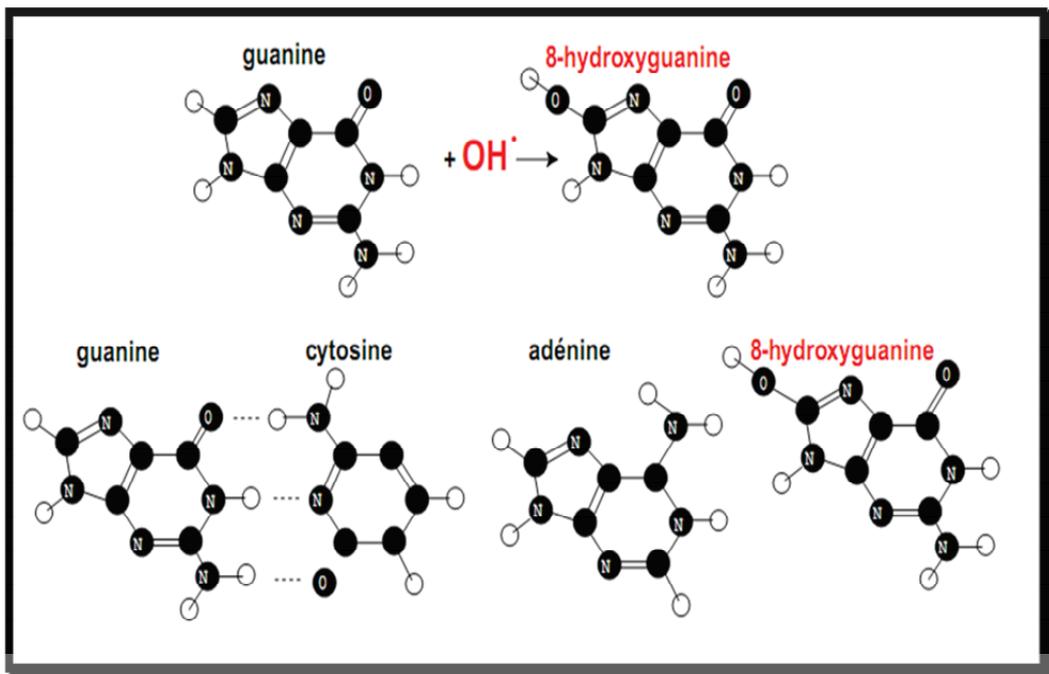


Figure 04 : Effet de l'attaque du radical hydroxyle (OH^\bullet) sur la guanine (Pincemail et *al.*, 1999).

I-1-4-3. Les glucides :

Le radical OH[•] est capable de cliver les molécules de sucres (désoxyribose, mannose, glucose) et de susciter ainsi des liaisons entre sucres et protéines provoquant ainsi des épaisissements membranaires. La cataracte diabétique serait une conséquence de cette liaison (Pasquier, 1995).

I-1-4-4. Les lipides :

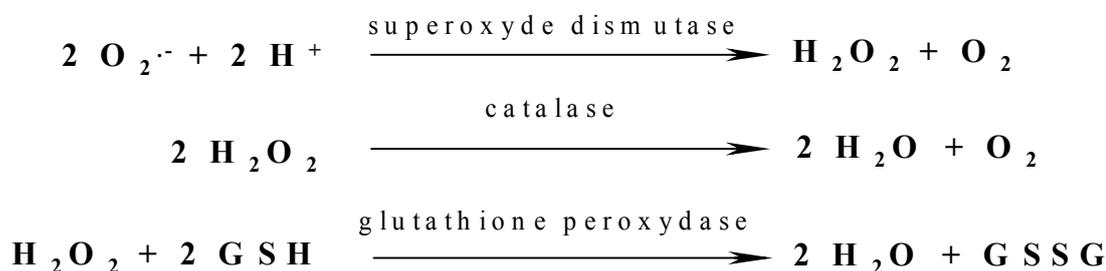
Les acides gras polyinsaturés sont également sensibles aux attaques radicalaires notamment celle de l'hydroxyle. La position d'un ou plusieurs groupements méthylène entre deux doubles liaisons les rend particulièrement sensibles à l'oxydation (Therond, 2006). L'oxydation des lipides par l'hydroxyle est un phénomène permanent, siégeant dans une grande variété de tissus. Il a pour conséquence une diminution de la fluidité membranaire, une augmentation de la perméabilité aux substances qui ne doivent normalement pas la traverser et une inactivation des enzymes membranaires structurales. Parmi les produits de l'oxydation des lipides : les MDA qui a leur tour peuvent endommager les protéines et les acides nucléiques (Ré et *al.*, 2005).

I-1-5. Défense physiologique contre les espèces oxydantes

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des ERO est particulièrement fragile ; leur production est strictement régulée par l'organisme qui dispose de moyens de défense antioxydants. Ce système de protection est constitué de deux groupes :

I-1-5-1. Antioxydants enzymatiques

Le système antioxydant enzymatique est représenté principalement par trois enzymes; la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire selon les réactions suivantes (Lehucher-Michel *et al.*, 2001) :



I-1-5-2. Antioxydants de faible poids moléculaire

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO. Le mécanisme indirect implique la chélation des métaux de transition les empêchant ainsi de produire le radical hydroxyle, hautement toxique, suite aux réactions de Fenton et Haber-Weiss. Les antioxydants à action directe peuvent agir comme agents réducteurs capables de passer leurs électrons au RL afin qu'ils puissent le piéger, l'empêchant ainsi d'attaquer les structures biologiques (Kohen et Nyska, 2002).

Les antioxydants de faible poids moléculaire possèdent plusieurs avantages par rapport aux antioxydants enzymatiques, en particulier par leur petite taille qui leur permet de traverser la membrane cellulaire et d'atteindre facilement leurs cibles. Ces molécules proviennent soit de sources endogènes [produits de synthèse (glutathion), ou issus du métabolisme cellulaire (acide urique)], soit exogènes apportés par l'alimentation (tocophérols, caroténoïdes, acide ascorbique et flavonoïdes) (Pietta, 2000).

En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ERO. Un stress surviendra lorsqu'il y aura un déséquilibre dans cette balance pro-oxydants/antioxydants en faveur des ERO. Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie (le tabagisme), ses caractéristiques génétiques et l'environnement dans lequel il vit. Déterminer le statut de stress oxydant d'un individu devient donc un sujet de priorité en termes de prévention de maladies. Ceci se justifie sur la base de très nombreuses études montrant que les personnes ayant des concentrations sanguines faibles en antioxydants (vitamines A, C ou E) ou des concentrations élevées en marqueurs d'oxydation des lipides ou de l'ADN, ont plus de risques de développer des maladies cardiovasculaires ou un cancer que les personnes ayant un bilan antioxydant normal résultant d'une alimentation équilibrée en fruits et légumes. Sur base de bilans sanguins perturbés, prendre des compléments en antioxydants à des doses physiologiques pourra donc se justifier à condition que ceci soit réalisé sous un contrôle médical strict (Joël et coll, 2002).

I-2. Les plantes médicinales

Il y a environ 500 000 plantes sur terre parmi lesquelles environ 20 000 possèdent des propriétés médicinales. La plupart de ces plantes sont bien connues et traditionnellement utilisées à travers le monde. La majorité fait l'objet de recherches et agit efficacement sur la santé (Small et Catling, 2000).

Une plante médicinale est une plante considérée comme ayant des propriétés médicamenteuses et il est généralement admis que leurs effets bénéfiques peuvent être obtenus auprès de principes actifs présents dans : l'ensemble de la plante, parties de la plante (comme les fleurs, les fruits, les racines ou les feuilles) (Fragoso *et al.*, 2008).

I-2-1. Historique des plantes médicinales

Depuis des milliers d'années, l'Homme a su exploiter les richesses naturelles qui l'entouraient pour se nourrir et se soigner. C'est en consommant les baies, les feuilles et les racines des végétaux qui poussaient autour de lui et en observant les effets qu'ils avaient sur le bétail et sur lui-même qu'il a progressivement identifié les propriétés curatives des plantes. Sur chaque continent, se sont ainsi développées différentes traditions, basées sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil des générations (Houdret, 2004).

Déjà 40000 ans avant notre ère, les thérapeutes aborigènes d'Australie utilisaient des plantes notamment les feuilles de *Melaleuca alternifolia* (arbre à thé). Ce sont surtout les thérapeutes chinois, égyptiens, grecs, romains et arabes qui ont progressivement orienté l'utilisation des plantes à des fins médicales et cosmétologiques. En Afrique, en Europe, en Chine ou en Inde, la médecine traditionnelle s'appuie toujours sur les vertus de ces plantes (Houdret, 2004).

I-2-2. La Phytothérapie

La phytothérapie; du grec, *phytos*, plante, et *therapia*, soins, c'est-à-dire le traitement des maladies par les plantes ou par leurs extraits, a intégré cette connaissance multiséculaire ainsi que des découvertes médicales plus récentes pour proposer soit seule soit en complément, différents traitements (Houdret, 2004).

La phytothérapie, étymologiquement le traitement par les plantes, est une méthode thérapeutique qui utilise l'action des plantes médicinales. On peut distinguer deux types de phytothérapie :

a) Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne, basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Selon l'OMS, cette médecine traditionnelle est encore massivement employée, notamment dans les pays en voie de développement. C'est une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.

b) Une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherche des extraits actifs des plantes, ces derniers une fois identifiés sont standardisés. On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique.

Les médicaments à base de plantes contiennent des matières végétales pharmacologiquement actives. Pour certains d'entre eux, les composants responsables de leur activité, sont mal caractérisés. La plupart des préparations à base de plantes sont commercialisées comme des extraits secs ou fluides, qui sont fabriqués à partir de parties de plantes séchées par macération ou percolation (Pribitkin et Boger, 2001).

I-2-1-1. Parties utiles des plantes médicinales dans le domaine de la phytothérapie

Les principes actifs qui sont derrière l'effet thérapeutique des plantes se trouvent répartis d'une manière non équitable entre les différentes parties de ces dernières, dont quelles que unes en contiennent dans les feuilles par exemple et d'autres dans les racines, d'où la nécessité de préciser la partie de la plante à appliquer. Dans le recours à leur utilisation, les feuilles sont les plus utilisées (26,3%), suivies par les fruits (11,32%), la plante entière (9,74%), les racines (8,68%), les graines (6,58%), la floraison des sommités (4,74%), les parties aériennes (4,21%) et les fleurs (4%) (El Beyrouthy *et al.*, 2008).

I-2-2-2. Formes d'application et modes d'emploi des plantes médicinales

Les principales formes d'application des plantes médicinales se présentent par: décoction (40,23%), infusion (15,1%), macération (11,9%), poudre (8,50%) et jus (5,41%) (El Beyrouthy *et al.*, 2008). Il peut s'agir de gélules, de comprimés, de teintures, d'extraits, de plantes brutes ou de différentes formes, telles que l'application sous forme de cataplasme (Larrey, 2005).

Les plantes médicinales sont principalement utilisées pour des applications externes sur la région affectée, mais plusieurs sont également utilisées par voie orale (El Beyrouthy *et al.*, 2008). D'autre part, leurs modes d'emplois sont variés, parmi eux on peut citer : le bain de vapeur, le cataplasme, la compression, l'application locale et l'inhalation.

Sur le total de la préparation trouvée, l'usage externe (78%) a été de loin supérieur à l'usage interne (22%). Les plantes fraîches ou séchées sont broyées et mélangées avec parfois de l'huile d'olive ou d'amande, le vinaigre, l'alcool ou de miel (El Beyrouthy *et al.*, 2008).

Traditionnellement, les principes actifs des plantes sont extraits par infusion, par décoction ou bien par macération. Aujourd'hui, il existe la poudre de plante totale cryobroyée, plus pratique et plus concentrée, proposée sous forme de gélules. La technique du cryobroyage permet de sauvegarder l'intégralité des constituants de la plante, alors que dans un broyage classique, les vitamines, les enzymes, les substances volatiles et de nombreux autres constituants sont en partie détériorés. Une autre technique permet seulement de récupérer les substances solubles dans le solvant utilisé pour fabriquer les extraits secs.

I-2-3. Intérêts d'utilisation des plantes médicinales

Les scientifiques font d'innombrables recherches et d'investigation sans cesse dans le but de trouver de nouveaux principes actifs pour le traitement de plusieurs pathologies. Ainsi, les humains bénéficient de beaucoup de composés dérivés de plantes qui sont utilisés comme médicaments (Sirikantaramas *et al.*, 2008).

En Afrique, 80% de la population utilise les ressources de la médecine traditionnelle pour les soins primaires (Diallo, 2004). Beaucoup de végétaux et certains compléments alimentaires sont une bonne source d'agents antioxydants et anti-inflammatoires. Ces derniers, peuvent être utilisés dans la prévention de complications de côlon et de cancer du sein (Wargovich *et al.*, 2001). Les composés chimiques dans les fruits, les légumes, les épices et les herbes médicinales jouent un rôle de protection contre des nombreuses maladies chroniques chez l'Homme, telles que les maladies cardiovasculaires (Tsao *et al.*, 2004).

L'importance économique des plantes médicinales occupe une place importante dans les marchés nationaux des pays en développement. Ainsi, l'Allemagne importe chaque année plus de 75 millions d'euros de plantes médicinales, provenant majoritairement de pays en développement et en transition. La vente durable de matériel végétal peut donc considérablement améliorer la balance commerciale des pays exportateurs et représente un facteur important de développement (Kasperek et al-Janabi, 2008).

I-2-4. Risques d'utilisation des plantes médicinales

La médecine par les plantes a beaucoup d'avantages mais elle n'est pas dépourvue de risques. Cette médecine dite douce et malgré son prix abordable par rapport aux autres médicaments chimiques, peut être source de danger, car ce qui se vend n'est pas forcément autorisé, et parfois ne répond pas aux normes. En effet, l'utilisation des plantes médicinales doit répondre à des normes et à des doses appropriées, vu que certaines peuvent être toxiques et d'autres peuvent être nocives en interaction avec des plantes, des médicaments ou des suppléments (Fragoso *et al.*, 2008).

Quelques plantes médicinales telles que l'ail et le gingembre (*Zingiber officinale*), peuvent augmenter le risque d'hémorragie au cours des interventions chirurgicales (Pribitkin et Boger, 2001). Dorénavant, il est plus facile de déterminer les remèdes à base de plantes qui risquent d'induire une toxicité directe, car les composés chimiques des plantes médicinales sont de plus en plus connues (Fragoso *et al.*, 2008).

I-2-5. Actualité d'exploitation des plantes médicinales en Algérie

En Algérie, depuis quelques années, de nombreux laboratoires proposent ces phyto-médicaments. Ces derniers se vendent en pharmacie et sont de plus en plus utilisés par les thérapeutes vu leurs vertus reconnues. Le groupe pharmaceutique SAIDAL a déposé durant l'année 2007, dix dossiers de brevets d'invention, dont quatre médicaments à base de plantes et six autres extraits de plantes médicinales. Ils portent sur les adjuvants aux traitements du diabète, de l'hypertension artérielle, de la réduction du cholestérol ainsi qu'une crème veinoprotectrice et un stimulant sexuel. Trois autres produits pharmaceutiques concernent des anti-inflammatoires, anti-émétiques et antipsychotiques. En plus, une gamme de 16 produits pharmaceutiques à base de plantes médicinales a été également lancée au cours de l'année 2008 (le journal Les Afriques, 2008)

I-2 -6. Exemple de plante médicinale : le Frêne (*Fraxinus angustifolia*)

Cette étude est focalisée sur l'investigation préliminaire, d'une plante locale appelée *Fraxinus angustifolia*. Les feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont appliquées dans la médecine traditionnelle locale contre l'arthrose. Les autres espèces du même genre, telles que *F. americana*, *F. bungeana* et *F. excelsior*, sont aussi utilisées en médecine traditionnelle chinoise dans le traitement de différentes pathologies (Kostova et Iossifova, 2007).

Cependant, son utilisation est limitée à un usage traditionnel, pour cela nous avons tenté d'établir des bases scientifiques pour son exploitation dans le domaine pharmaceutique

L'écorce du frêne est fortifiante, astringente et anti-inflammatoire, le frêne est utilisé dans le traitement des rhumatismes, plusieurs de ses espèces produisent une sève nourrissante utilisée comme laxatif pour les enfants,

I-2-6-1. Nomination et classification de la plante étudiée (Gausсен et *al.*, 1982)

Règne : végétal

Embranchement: Spermaphytes

Sous embranchement: Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe: Astéridae

Ordre : Oléale

Famille: Oléaceae

Genre: Fraxinus

Espèce : *Fraxinus angustifolia*

Nom arabe: Dardar

Nom berbère: Asléne



Figure 05 : Photographie de *Fraxinus angustifolia*.

I-2-6-2. Données Phytochimiques sur la plante étudiée

Le genre *Fraxinus* (Oleaceae), est distribué principalement dans les régions tempérées et subtropicales de l'hémisphère Nord. Knoblauch, Taylor et Johnson ont placé l'espèce *Fraxinus* dans la tribu *Fraxinea*, sous-famille des Oleoideae, famille des Oleaceae. Knoblauch décrit 39 *Fraxinus* spp, divisées en deux sections: Ornus et Fraxinaster. Lingelsheim reconnaît 63 spp, regroupées dans les même deux sections. Dans un récent classement, la famille est divisée en 5 tribus et le genre *Fraxinus* est classé dans les sous tribu des Fraxininaes. La taxonomie de certaines espèces est encore à l'étude. Un nouveau classement de l'ensemble du genre *Fraxinus* en classe et sous-classe basée sur la phylogénie du genre devrait bientôt apparaître dans la littérature (Kostova et Iossifova, 2007).

La présence des coumarines, secoiridoïdes, et phenylethanoides est une caractéristique des espèces *Fraxinus*. Le secoiridoïde se produit principalement sous forme de glucosides hydroxyphenylethyl et esters de l'alcool. Les lignanes, flavonoïdes et des composés phénoliques simples sont également communs, mais ils semblent avoir plus d'une distribution limitée. La quantité des coumarines chez le genre *Fraxinus* est importante par rapport aux autres genres d'Oléacées. Traditionnellement, les genres ont toujours été associés à des enquêtes sur des coumarines. Ces dernières années, l'intérêt accru pour la phytochimie de *Fraxinus* est motivé par la découverte de la secoiridoïde glucosidiques, qui constituent les principaux métabolites de la famille des Oléacées (Kostova et Iossifova, 2007).

I-3. Les principes actifs des plantes médicinales

Les plantes produisent un vaste groupe de composés organiques appartenant aux métabolites secondaires, ce qui fait l'une des originalités majeures des végétaux (Croteau *et al.*, 2000). En effet, en plus des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'Homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Macheix *et al.*, 2005).

Parallèlement au développement des utilisations des métabolites secondaires à usage thérapeutique, le domaine du cosmétique est aussi très demandeur de substances végétales, par exemple les flavonoïdes sont utilisés à la fois en thérapeutique et en cosmétique (Minh *et al.*, 2004). En raison, de leur diversité moléculaire (environ 12 000 molécules) et de

leurs propriétés biologiques importantes tels que anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antivirales...etc, ces métabolites constituent une source inépuisable d'agents thérapeutiques pour lutter contre diverses pathologies (Samy et Gopalakrishnakone, 2008).

I-3-1. Définition des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires se présentent par des groupes chimiques variés, parmi eux on trouve les polyphénols, les huiles essentielles et les alcaloïdes. Ces groupes de composés sont très inégalement repartis chez les végétaux (Macheix *et al.*, 2005).

I-3-2. Classes de métabolites secondaires

Sur la base de leurs origines biosynthétiques, les métabolites secondaires des plantes peuvent être divisés en trois grands groupes: Les huiles essentielles, les alcaloïdes et les composés phénoliques (Croteau *et al.*, 2000).

I-3-2-1. Les alcaloïdes

I-3-2-1-1. Définition

Les alcaloïdes sont très importants en médecine en raison de leur haute activité biologique. Ils sont de faible poids moléculaire et sont retrouvés dans 20% des espèces végétales (Minami *et al.*, 2008). Ce sont des composés azotés hétérocycliques, largement distribués dans les différents groupes de plantes. Ils sont présents dans la vacuole des cellules sous forme de sels et peuvent en être extraits par de l'eau acidifiée, de l'éthanol, ou par d'autres solvants organiques (Cseke *et al.*, 2006).

I-3-2-1-2. Biosynthèse

La plupart des alcaloïdes dérivent de la décarboxylation des acides aminés, tels que l'histidine, le tryptophane et la tyrosine par des voies de biosynthèse longues et complexes (Minami *et al.*, 2008). Le site de synthèse de ces composés est difficilement identifiable car il n'est pas forcément le site de stockage. L'identification de gènes spécifiant certaines enzymes de la voie de synthèse des alcaloïdes a permis dans certains cas de suivre leur expression et de déterminer le site de cette biosynthèse. Par exemple, l'enzyme hyocyamine 6-hydroxylase qui catalyse deux étapes de la synthèse de la scopolamine (hyoscine) est exprimée dans la région du péricycle des racines de solanaceae *Atropa* et *Hyoscamus* (Woolley, 2001). Cette classe comprend plus de 10 000 composés dont le premier à avoir été découvert, en 1803 par

Derosne, est la narcotine (noscapine) de l'opium. Selon leurs hétérocycles, il existe plusieurs sous-classes d'alcaloïdes (Louis, 2004 ; Cseke *et al.*, 2006).

I-3-2-1-3. Activité biologique des alcaloïdes

Les alcaloïdes présentent diverses activités biologiques, témoins de leur production par les végétaux. Certains sont des poisons pour l'Homme et le bétail (héroïne), d'autres sont des drogues (cocaïne des feuilles d'*Erythroxylon coca*) et certains ont des vertus thérapeutiques (morphine des Papaveraceae) et d'autres présentent des activités antimicrobiennes (antivirales et antibactériennes) (Louis, 2004).

I-3-2-2. Les huiles essentielles

I-3-2-2-1. Définition

Les huiles essentielles sont des substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes, des épices,...etc. Elles sont concentrées, volatiles et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur (Turgeon, 2001).

I-3-2-2-2. Biosynthèse et classification

La majorité des huiles essentielles appelées aussi terpénoïdes sont synthétisées à partir d'isopentenyl diphosphate (IPP), et à partir du diméthylallyl diphosphate, qui est formé par isomérisation de l'IPP sous l'effet de "IPP isomérase" (Lamarti *et al.*, 1994 ; Croteau *et al.*, 2000). La composition chimique d'une huile essentielle est assez complexe : on y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques: les composés terpéniques et les composés aromatiques, dérivés du phénylpropane.

a) Les composés terpéniques sont formés par condensation d'unités isopréniques (en C5) et comprennent : les monoterpènes (C10), les sesquiterpènes (C15), les diterpènes (C20) et les triterpènes (C30).

b) Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane ont une biogenèse différente de celle des terpènes. On peut citer l'acide et l'aldéhyde cinnamique (huile essentielle de cannelle), l'eugénol (huile essentielle de girofle), le carvacrol (huile essentielle d'origan), qui sont les principaux membres de cette famille (Chami, 2005).

I-3-2-2-3. Activités biologiques des huiles essentielles

A titre d'exemple, la composition de ces huiles essentielles et, en particulier, la nature de leurs composés majoritaires sont responsables de l'activité antimicrobienne. En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles se classe dans l'ordre décroissant selon la nature de leurs composés majoritaires: phénols > alcools > aldéhydes > cétones > oxydes > hydrocarbures > esters (Chami, 2005). En outre, quelques huiles essentielles de conifères entrent dans la fabrication de produits pharmaceutiques, en raison de leurs propriétés thérapeutiques et dans celle des parfums, des produits de toilette, des cosmétiques, des savons et des détergents, en raison de leurs propriétés aromatiques (Turgeon, 2001).

I-3-2-3. Les composés phénoliques

I-3-2-3-1. Définition

Les polyphénols, groupe de molécules de structures variées, trouvent d'ores et déjà une large utilisation en phytothérapie (Hennebelle et *al.*, 2004). Ce sont des métabolites secondaires qui se trouvent dans toutes les plantes et dont les vertus thérapeutiques de ces dernières leur sont attribuées (Balasundram et *al.*, 2006). Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés chez les végétaux. Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles libres ou engagées dans une autre fonction chimique (ester, osidique). Leur poids moléculaire varie de 500 à 3000 Dalton (Macheix et *al.*, 2005). Les différentes propriétés, notamment antioxydantes des plantes médicinales sont essentiellement dues à leurs composés phénoliques. Ils sont étudiés dans le but de trouver de nouvelles structures modèles pour le développement de médicaments thérapeutiques ou protecteurs (Bossokpi, 2003).

I-3-2-3-2. Biosynthèse

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies de biosynthèse : la voie la plus courante est la voie shikimate (l'acide shikimique). La première réaction est la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate pour former un composé en C₇, qui conduit aux acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés (acide benzoïque, acétophénones, lignines et lignanes, coumarines...etc.) (Bruneton, 1999)

L'autre voie commence de l'acétate et conduit à des poly β -cétolés (polyacétates) qui engendrent, par cyclisation différentes formes de composés phénoliques (Bruneton, 1999). La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique (Figure 6) est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origines mixtes des deux voies (Bruneton, 1999).

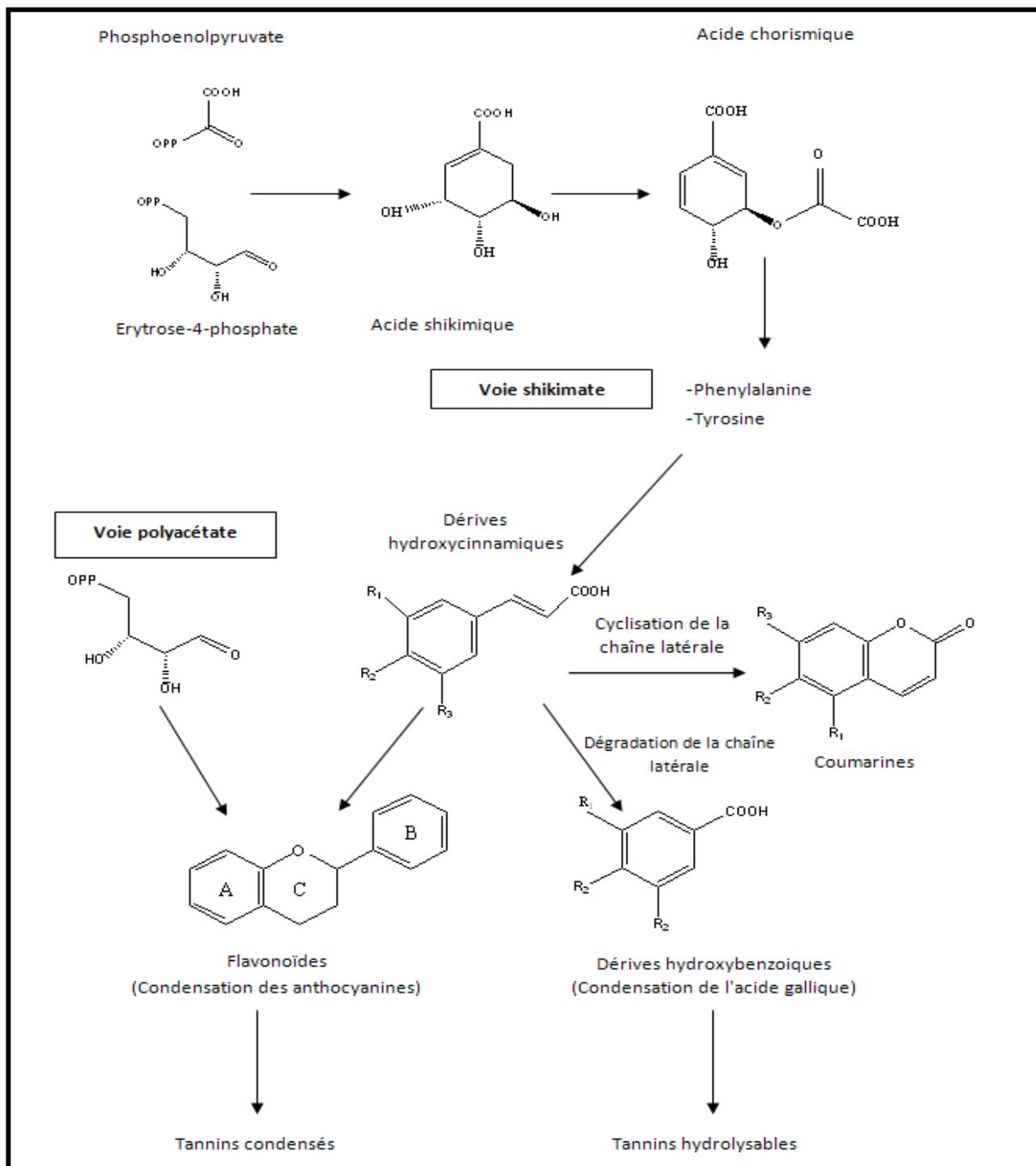


Figure 06: Voies de biosynthèse des composés phénoliques (Bruneton, 1999).

I-3-2-3-3. Classification

Selon leur structure de base, les composés phénoliques peuvent être regroupés en différentes classes, les plus importantes sont : les phénols simples, les flavonoïdes et les tanins (Bennick, 2002).

A- Les phénols simples

Ce sont les formes phénoliques les plus simples qui présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 aux acides hydroxycinnamiques (C6-C3) et à des molécules proches (Macheix *et al.*, 2005).

Les dérivés hydroxycinnamiques (figure 7) représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérive de l'acide cinnamique, l'ensemble de ce groupe est souvent rapporté sous la dénomination commune de phénylpropanoïdes. Ils sont les plus abondants des composés phénoliques simples, et leur présence dans le règne végétal est, généralement à l'état d'ester avec d'autres molécules organiques tels que les glucides (Macheix *et al.*, 2005).

Les dérivés hydroxybenzoïques (figure 7) sont des dérivés de l'acide benzoïque avec une formule de base C6-C1. Ces composés peuvent provenir directement de l'acide 3-déshydroshikimique (cas de l'acide gallique) ou de l'acide chorismique (cas de l'acide salicylique) ; mais en règle générale, ils résultent de la dégradation de la chaîne latérale des acides cinnamiques. Ils sont moins abondants par rapport à leurs précurseurs et peuvent exister sous forme d'esters ou de glucosides qui représentent des formes de stockage et de circulation dans les plantes (Macheix *et al.*, 2005).

Les coumarines sont des composés qui dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de leur chaîne latérale. Ils sont les moins répandus des deux premiers et leur répartition dans la nature est assez limitée. Le composé le plus fréquent est l'ombelliférone (Bruneton, 1999).

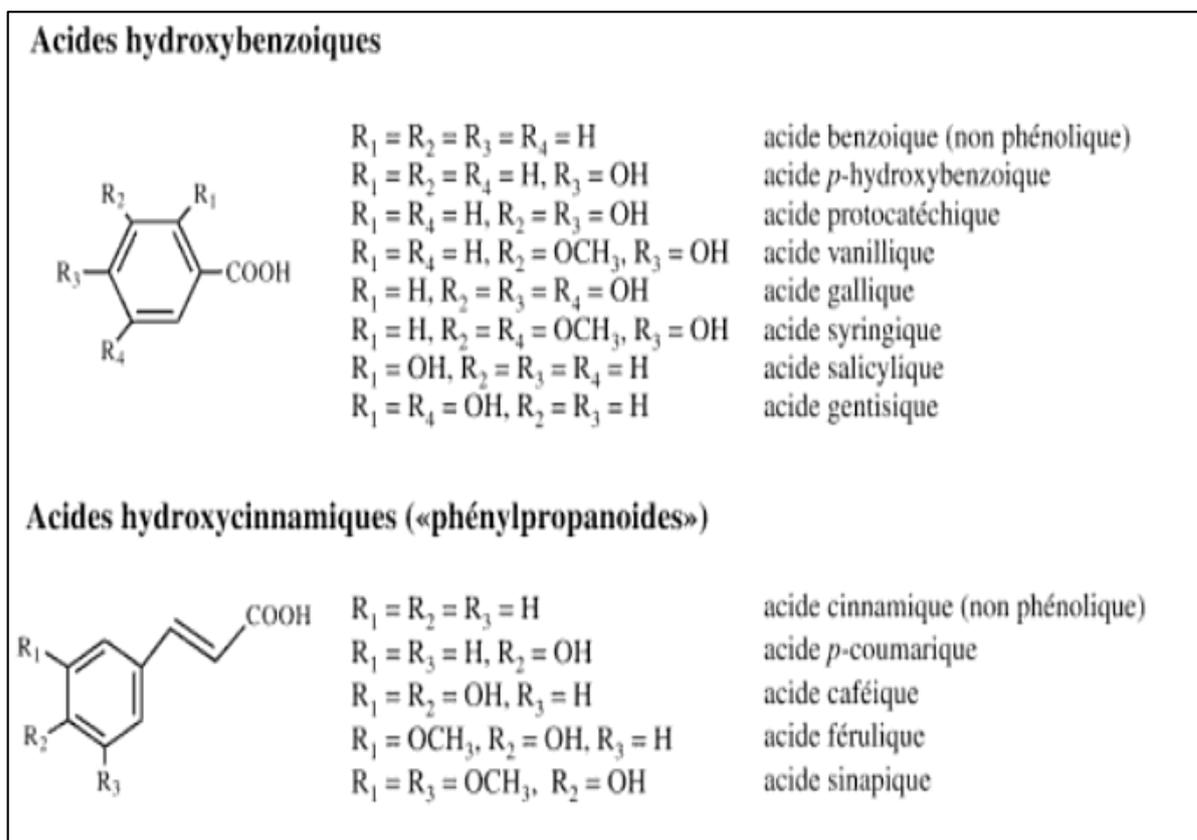


Figure 07 : Les principales structures des phénols simples (Macheix *et al.*, 2005).

B- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 8 000 composés naturels, qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent les pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005). Ils sont formés à partir de la phénylalanine et de la tyrosine. La structure de base du flavonoïde est le noyau flavane, qui est composé de 15 atomes de carbone arrangés dans trois noyaux (C6-C3-C6) (figure 8), qui se présentent par A, B, et C (Pietta, 2000).

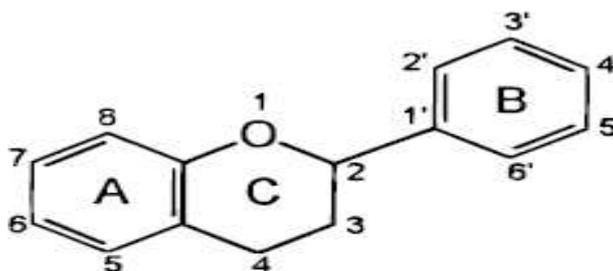


Figure 08 : Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique (Pietta, 2000).

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés (Havsteen, 2002). La structure de l'hétérocycle central « C » et son degré d'oxydation, ainsi que les positions des groupements hydroxyles sur les noyaux « A » et « B », permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes (Pietta, 2000 ; Macheix *et al.*, 2005). On distingue :

- Flavones : Le cycle A des flavones est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7 ; ils sont caractérisés par la présence de la double liaison entre C2-C3 (Havsteen, 2002).

- Flavonols : Ils possèdent deux hydroxyles phénoliques en C5-C7 et un groupement en plus sur le C3 de l'hétérocycle C (Chira *et al.*, 2008).

- Les flavanones : Ils sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence d'un centre de chiralité en C2. La structure des flavanones est très réactive et donne lieu à des réactions d'hydroxylations, d'O-méthylations et de glycosylations (Chira *et al.*, 2008) .

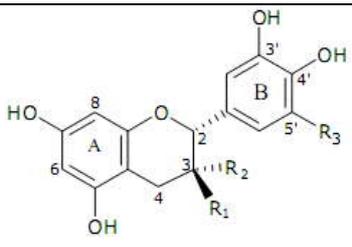
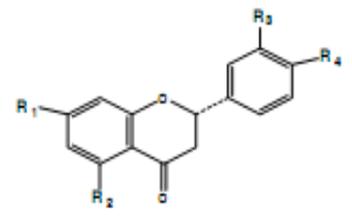
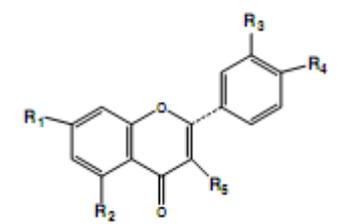
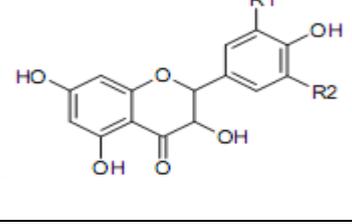
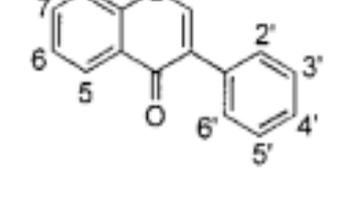
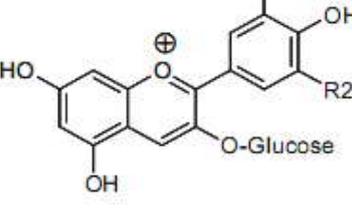
- Flavan-3-ols, flavan-3, 4-diols : Ces deux groupes sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4 ; cette position peut être libre (flavan-3-ols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols). Ces derniers sont à l'origine des polymères flavaniques appelés tanins condensés (William *et al.*, 2004 ; Macheix *et al.*, 2005).

- Les chalcones : Ils sont différents des autres types de flavonoïdes de par l'ouverture du noyau pyranique central, le noyau B est assez souvent non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes (Bruneton, 1999).

- Les aurones : Ils sont caractérisés par une structure de 2-benzylidène coumaranone, dont l'hétérocycle comprend deux atomes de carbone.

- Les anthocyanidines : Ils sont largement présents dans le règne végétal, principalement sous forme de glycosides, caractérisés par la présence d'un ion pyrylium sur le noyau C, les plus courants sont la pelargonidine, la cyanidine, la delphinidine, la péonidine (William *et al.*, 2004 ; Macheix *et al.*, 2005 ; Chira *et al.*, 2008). Des structures et des exemples de ces différentes classes sont regroupés dans le tableau I.

Tableau I : Les principales classes de flavonoïdes

Classes	structures	exemples	substitutions	références
Flavanols		Catéchine	R2=R3=H R1=OH	Cheynier, 2005
		Epicatéchine	R1=R3=H R2=OH	Rasmussen et al., 2005
Flavanones		Naringénine	R1=R2=R4=O H R3=H	Rietjens et al., 2002
		Hespéridine	R1=R2=R3=O H R4=OCH ₃	Tripoli et al., 2007
Flavones		Lutéoline	R1=R2=R3=R4=OH R5=H	Skerget et al., 2005
		Quercétine	R1=R2=R3=R4=R5=OH	Tripoli et al., 2007
Flavonols		Kampférol	R1=R2=H	Suzuki et al., 2008
		Myricétine	R1=R2=OH	Ghidouche et al., 2008
Isoflavone		Génistine	5,4'=OH 7=glucose	Cook et Samman, 1996
		génisteine	5, 7,4'=OH	Heim et al., 2002 Devi et al., 2009
anthocyanidines		Malvidine-3-O-glucoside	R1=R2=OCH ₃	Lu et Foo, 2002
		Delphinidine-3-O-glucoside	R1=R2=OH	Chira et al., 2008

C- Les tannins

Les tannins sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et les précipiter (Macheix *et al.*, 2005). On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tannins différents par leurs structures aussi bien que par leurs propriétés physicochimiques: les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Bruneton, 1999).

➤ Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont facilement hydrolysés en milieu alcalin (Bennick, 2002). Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit l'acide gallique (gallotannins), soit un dimère de ce même composé qui est l'acide éllagique (éllagitannins). Une forme simple des tannins hydrolysables est le pentagalloylglucose, molécule très réactive qui est à l'origine de la plupart des formes complexes (figure 9), par exemple la castalagine chez le châtaignier ou le chêne (Macheix *et al.*, 2005).

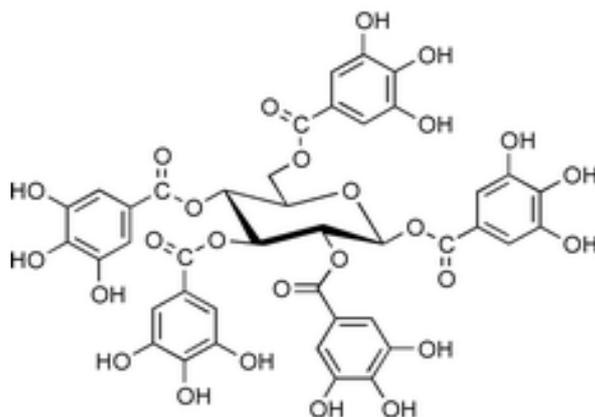


Figure 09: Exemple de structure d'un tannin hydrolysable (Macheix *et al.*, 2005).

➤ Les tannins condensés

Les tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols (éventuellement de flavane-3,4-diols) dérivés de la (+)-catéchine ou de ses nombreux isomères (Macheix *et al.*, 2005). Bien que de petites molécules de tannins condensés sont solubles dans les solvants aqueux ou organiques, les grands polymères sont insolubles (Bennick, 2002).

Contrairement aux tannins hydrolysables, les tannins condensés sont résistants à l'hydrolyse, et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et, pour cette raison, les formes dimères et oligomères sont dénommées « proanthocyanidines ». L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit de manière linéaire grâce à des liaisons C-C (figure 10), ou par ramification grâce à des liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes (Macheix *et al.*, 2005).

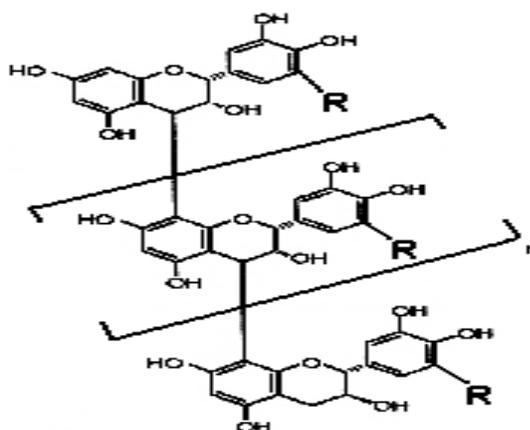


Figure 10 : Exemple de structure d'un tannin condensé (Macheix *et al.*, 2005).

I-3-2-3-4. Activité antioxydant des composés phénoliques

Un antioxydant est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle est présente en concentration très faible dans le milieu où elle intervient. L'organisme humain est équipé de tout un système complexe de défense antioxydant, enzymatique et non enzymatique, localisé dans les compartiments intra et extracellulaire (Berger, 2006). Les antioxydants d'origine naturelle sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et sont en générale des composés phénoliques. Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le piégeage de l'oxygène singulet, la réduction de radicaux libres, la chélation des ions et de métaux de transition. Parmi eux, les acides phénoliques, qui sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires (Diallo, 2004).

a) Chélation des métaux

Les métaux de transition Fe^{++} et Cu^{++} , qui sont essentiels pour le déroulement de différentes fonctions physiologiques, peuvent être aussi une source du radical $OH\cdot$ lors de la réaction de Fenton par réduction de H_2O_2 . Cette réaction peut être empêchée par les composés phénoliques, notamment les flavonoides, en chélatant ces métaux grâce à leurs fonctions

catéchol 3'-hydroxyl, 4'-hydroxyl sur le cycle B, les fonctions 3-hydroxy, 4-oxo de l'hétérocycle C et les fonctions 4-oxo, 5-hydroxy de l'hétérocycle C et le cycle B, respectivement (Pietta, 2000 ; Heim *et al.*, 2002).

b) Effet scavenger

L'effet scavenger des composés phénoliques consiste à piéger et à neutraliser les formes toxiques de l'oxygène, en les réduisant par transfert direct d'un électron sur leur dernière couche électronique (Ghedira, 2005). De ce fait, les composés phénoliques interfèrent et bloquent la propagation de la réaction radicalaire en chaîne grâce à leur caractère réducteur en devenant, eux-mêmes, des radicaux phénoxyls assez stables grâce au phénomène de résonance (délocalisation des doublets électroniques) (Pietta, 2000 ; Macheix *et al.*, 2005).

Ce mécanisme semble être le plus important sur le plan biologique via la protection des LDL de la peroxydation lipidique et la régénération des formes réduites du tocophérol et la vitamine C (Narayana, *et al.*, 2001). L'activité des flavonoïdes comme piègeurs de radicaux libres étant bien établie ; des études récentes suggèrent qu'ils seraient également de puissants piègeurs du radical NO \cdot et ONOO \cdot (Ha *et al.*, 2008). Cette activité est étroitement liée aux propriétés structurales des composés phénoliques, à savoir le nombre et la position des groupements hydroxyles et le degré de méthylation, de glycosylation et de polymérisation (Heim *et al.*, 2002).

Prenant l'exemple des flavonoïdes, la présence des groupements hydroxyles et leur configuration spatiale ainsi que la présence des doubles liaisons sur l'hétérocycle C sont déterminantes de l'efficacité antioxydante de ces composés (Rietjens *et al.*, 2002 ; William *et al.*, 2004). L'effet augmente également avec le degré de polymérisation, en effet, l'epigallocatechine gallate (EGCG), une molécule oligomérique des tannins, est plus active que la catéchine, cela est expliqué par la présence de la forme galloyl en position C3 avec trois groupements hydroxyles de plus par rapport à la catéchine. En fin, les tannins hydrolysables et les procyanidines présentent des propriétés antioxydantes significatives, ils agissent comme donneurs de protons face aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation (Soobrattee *et al.*, 2005).

En revanche, la méthylation et la glycosylation des flavonoïdes au niveau des groupements hydroxyles diminuent considérablement leur effet anti-radicalaire. La différence de l'effet anti-radicalaire des flavonoïdes polyhydroxylés et les flavonoïdes polyméthylés est due essentiellement à l'hydrophobicité et la planarité de ces molécules (Soobrattee *et al.*,

2005). Par ailleurs, les formes glycosidiques sont peu actives par rapport à leurs formes aglycones correspondantes. Il a été rapporté que le potentiel antioxydant des flavonoïdes glycosylés de thé diminue à mesure que la partie osidique augmente (Robards *et al.*, 1999).

c) Inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est une autre stratégie de l'effet antioxydant des composés phénoliques. Il a été rapporté par plusieurs études que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet (Nagao *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2002). La quercétine, par exemple, est l'un des flavonoïdes les plus connus pour son activité inhibitrice sur la xanthine oxydase (Middleton *et al.*, 2000).

d) Induction de synthèse des enzymes antioxydantes

A la lumière des études récentes de biologie moléculaire dans le domaine de la signalisation cellulaire et le rôle probable des composés phénoliques dans ce processus, un nouveau mécanisme de défense antioxydante a été avancé. Ce mécanisme indique l'implication des composés phénoliques, notamment la catéchine et ses dérivés dans l'induction de l'expression des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) (Mattie et Freedman, 2004 ; Masella *et al.*, 2005).

I-3-2-3-5. Propriétés physico-chimiques des composés phénoliques

La présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir de matériel végétal. Les polyphénols sont généralement extraits, selon leur solubilité, par les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'eau. Cependant cette solubilité varie d'une classe de composés à une autre, dépendant des substitutions (méthylation ou glycosylation) sur les groupements hydroxyles (Macheix *et al.*, 2005 ; Naczki et Shahidi, 2006).

La plupart des phénols simples peuvent aisément être extraits avec des mélanges méthanol/eau. Les anthocyanines, qui sont des composés très polaires, sont extraits par des mélanges méthanol/HCl (Buelga et Williamson, 2003) et les flavonoïdes glycones sont connus comme étant des composés hydrosolubles vu la présence de la partie osidique. A l'opposé, certains flavonoïdes apolaires, comme ceux liés aux stérols, doivent être extraits avec des

solvants plus apolaires, comme le chloroforme et l'hexane. Les formes condensées, comme les tannins sont de préférence extraites par l'acétone (Bruneton, 1999 Macheix et *al.*, 2005).

Tous les composés phénoliques des végétaux absorbent dans l'UV et certains d'entre eux comme les anthocyanes, flavonols, chalcones et aurones absorbent dans le visible et participent alors à la coloration des organes végétaux (fleurs, fruits...). Leurs spectres d'absorption résultent en général de la présence combinée des cycles benzéniques, des groupements hydroxyles et les différentes doubles liaisons portées par ces molécules. Les acides phénols absorbent généralement entre 220 et 280nm, le spectre d'absorption des flavonoïdes est caractérisé par deux gammes d'absorption, une de 320 à 385nm correspondant au cycle B, et une autre comprise entre 250-285nm correspondant au cycle A (Macheix et *al.*, 2005 ; Naczk et Shahidi, 2006).

II- Matériels et méthodes

II-1. Préparation des extraits

II -1-1. Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette présente étude est une espèce locale de frêne, dont le nom scientifique est : *Fraxinus angustifolia*. La récolte des feuilles et de l'écorce (figure11) a été réalisée durant l'été 2008, dans la forêt d'Azru n Bechar à Amizour, dans la wilaya de Bejaia.



Figure 11: Photographies du matériel végétal de *F. angustifolia*. A) L'écorce. B) Les feuilles.

II -1.2. Séchage, broyage et tamisage

Après la récolte, le matériel végétal a été séché à l'air libre et à l'abri de la lumière. La matière sèche obtenue a été réduite, à l'aide d'un moulin électrique, en poudre fine. Par la suite, cette dernière a été tamisée à l'aide d'un tamis de granulométrie permettant l'obtention d'une poudre fine de 63 μ m de diamètre, afin d'optimiser l'extraction des composés phytochimiques.

II -1-3. Extraction

Dans cette étude, une extraction sélective à plusieurs solvants a été faite selon le protocole de Chiang et ses collaborateurs (1994), avec quelques modifications. Le but de cette extraction est de pouvoir séparer les composés phénoliques en diverses phases, selon leurs polarités en fonction de la nature du solvant utilisé. L'extraction débute par l'éthanol afin d'extraire un maximum de composés phénoliques, le protocole d'extraction est schématisé dans la figure 12.

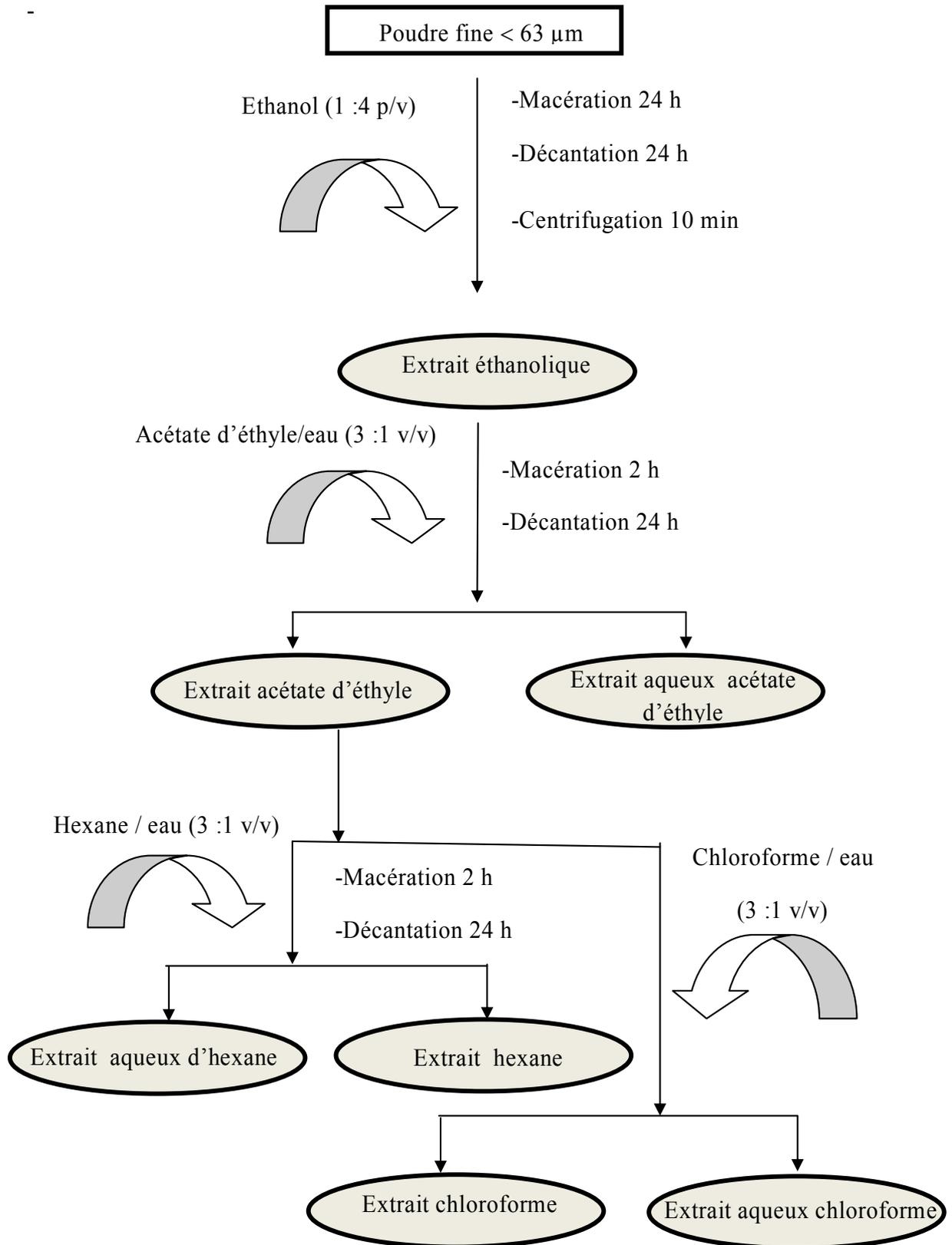


Figure 12 : Schéma récapitulatif des étapes suivies pour la préparation des extraits

La première étape de l'extraction est la macération de la poudre fine dans de l'éthanol 95% avec un rapport masse /volume de 1 : 4 (P : V) pendant 24 h. Par la suite, une décantation de 24h, suivie d'une centrifugation de 1500rpm ont été effectuée, donnant naissance à deux phases bien distinctes dont le surnageant représente l'extrait éthanolique. Ce dernier est versé dans des cristallisoirs et soumis à un séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière, jusqu'à 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'acétate d'éthyle /eau avec un rapport volumique de 3:1 (V:V). Après 24 h 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 et laissées sécher dans les mêmes conditions précédemment citées.

La troisième et dernière étape de l'extraction est la macération d'une partie de l'extrait organique d'acétate d'éthyle, qui est divisé en deux parties : l'une est transférée dans un mélange hexane/eau et l'autre dans un mélange chloroforme/eau, avec un rapport volumique de 3:1 (V:V). Après 24h de macération, suivie d'une décantation, les quatre phases résultantes ont été séparées et laissées sécher jusqu'à stabilisation complète de leurs poids sec. Le pourcentage d'extraction de chaque étape est calculé par la formule suivante :

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

P_1 : Poids de l'extrait après évaporation.

P_0 : Poids initial du cristallisoir ou de la boîte de Pétri.

E : Poids de l'échantillon initial (Poudre ou extrait sec de la phase précédente «g»)

II -2. Quantification des composés phénoliques

II -2-1. Quantification des phénols totaux

-Principe de la méthode

Le dosage des phénols totaux repose sur la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 765nm est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques oxydés présents dans les extraits végétaux.

-Mode opératoire

Le protocole que nous avons suivi dans cette étude pour le dosage des phénols totaux des extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* est celui de Kähkönen et al (1999). Nous avons introduit dans chaque tube un volume de 200 µl de la solution d'extrait à une concentration de 100 µg/ml, par la suite, nous avons rajouté 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 800 µl de carbonate de sodium (7,5 %). le mélange est laissé réagir à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. Enfin, la lecture des absorbances est faite à une longueur d'onde de 760nm contre un blanc contenant tous les réactifs sauf l'extrait (Vermerris et Nicholson, 2006).

Une courbe d'étalonnage a été préalablement préparée dans les mêmes conditions, en utilisant la catéchine comme référence. Les résultats seront exprimés en mg Equivalent Catéchine/g d'extrait (Annexe 1).

II -2-2. Quantification des flavonoïdes

-Principe de la méthode

Le principe des méthodes de dosage des flavonoïdes repose sur la capacité de ces composés à former des complexes par addition du chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) au mélange réactionnel. L'intensité de la couleur dont l'absorbance maximale est de 430nm est proportionnelle à la quantité de complexes formés.

-Mode opératoire

La méthode du chlorure d'aluminium rapportée par Maksimović et ses collaborateurs (2004) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits de *F.angustifolia*. 2 ml de l'extrait dissout dans de l'éthanol (100µg/ml) ont été rajoutés à 1 ml de réactif de chlorure d'aluminium (133mg du chlorure d'aluminium et 400 mg d'acétate de sodium cristalline dans 100 ml d'eau distillée). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 430nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir des gammes d'étalonnage établies avec la rutine et sont exprimées en milligramme d'équivalent rutine par gramme d'extrait (mg Equivalent Rutine/g d'extrait) (Annexe 2).

II -2-3. Quantification des tannins

-Principe de la méthode

Les meilleures méthodes pour doser les tannins sont celles qui évaluent leur capacité à précipiter la protéine sérique bovine (BSA) ; la méthode d'Hagerman et Butler (1978) que nous avons utilisé est l'une de ces méthodes. Celle-ci consiste à précipiter la BSA dans une solution tampon par les tannins de l'extrait à doser. La teneur du précipité en complexes tannins-protéines est déterminée par spectrophotométrie à 510nm, après hydrolyse alcaline et réaction de l'hydrolysate avec le réactif de chlorure ferrique (FeCl_3).

- Mode opératoire

La BSA est solubilisée dans le tampon A à raison d'une concentration de 1mg/ml. Un volume de 2,5ml de cette suspension protéique est ensuite mélangé avec 1ml d'extrait à 100 $\mu\text{g/ml}$ pour former, après 24 h d'incubation à 4°C, un précipité de complexe tannins-BSA au fond des tubes. Afin de séparer ce précipité du surnageant, les solutions ont été centrifugées à 3000g pendant 15min. Le précipité débarrassé du surnageant est ensuite solubilisé et hydrolysé avec 4ml de SDS/TEA et le mélange est agité vigoureusement, suivi de l'addition de 1ml de FeCl_3 . Après 15min de contact, les absorbances ont été prises à une longueur d'onde de 510nm, puis traduites en milligramme équivalent acide tannique par gramme d'extrait (mg EAT/g d'extrait) à partir de la courbe d'étalonnage (Annexe3), préalablement préparée, dans les mêmes conditions, en utilisant l'acide tannique comme standard

- Tampon A : le tampon A est préparé par une solution de 0,2M d'acide acétique avec 0,17M de NaCl, ajusté à pH 4,9.

- SDS/TEA : 5% (v/v) triéthanolamine avec 1% (p/v) SDS (50ml triéthanolamine, 10g de SDS ajusté à 1,0 litre d'eau distillée).

- FeCl_3 : 1,62g est dissout dans 0,01M de HCl. La solution est filtrée.

II -3. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits

II -3-1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$)

-Principe de la méthode

L'activité des extraits de *Fraxinus angustifolia* contre le radical hydroxyle a été évaluée par le test de désoxyribose suivant le protocole de Halliwell et al (1987), avec

quelques modifications. Cette méthode est basée sur la compétition entre le désoxyribose et les extraits de plante pour le radical hydroxyle généré par le système suivant : Fe^{3+} - acide ascorbique –EDTA- H_2O_2 (Réaction de Fenton). Les radicaux hydroxyles produits attaquent le désoxyribose pour former des substances réactives, qui en présence de TBA donnent un chromogène de couleur rose ayant une absorbance à 532nm.

- Mode opératoire

Dans un volume final de 2ml, on mélange 200ul de chaque extrait (dissous dans la solution tampon), 50 μl de 2-desoxy-2-ribose (80mM, dissous dans la solution de tampon phosphate à 20mM d'un pH de 7,4.), 50 μl de EDTA (4mM), 50 μl de FeCl_3 (4mM), 50 μl de la solution H_2O_2 (20mM) et enfin 50 μl d'acide ascorbique à 4mM. Après incubation à 37° pendant 1heure, 1ml d'acide trichloracétique (TCA) de 2% et 1ml de l'acide thiobarbituque (TBA) à 1% ont été ajoutés. Les tubes sont ensuite mis au bain-marie à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 532nm contre un témoin qui contient du tampon à la place de l'extrait. Pour une comparaison, trois standards : l'acide ascorbique, la catéchine et le Mannitol ont été testés en parallèle. L'activité scavenging du radical $\text{OH}\cdot$ pour chaque extrait est calculée par la formule suivante :

$$\% \text{ scavenger du radical hydroxyle} = [(A_T - A_C) / A_T] \times 100$$

A_T : l'absorbance de la solution témoin

A_C : l'absorbance de l'extrait.

II -3-2. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le radical DPPH

- Principe de la méthode

La méthode utilisée dans ce travail pour l'évaluation de l'effet scavenger des extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* contre le DPPH est celle de Maisuthisakul et ses collaborateurs (2007). Cette méthode tire profit de la décoloration de la solution méthanolique du radical DPPH lors de sa réduction par les antioxydants. La différence de la densité optique entre la solution de radical DPPH en absence et en présence de l'extrait reflète le potentiel des composés responsables de cette activité à réduire le radical DPPH, le taux réduit du radical DPPH par ces molécules est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\% \text{ scavenger de radical DPPH} = [(A_T - (A_E - A_B)) / A_T] \times 100$$

A_T : absorbance de témoin (2,45 ml méthanol + 50,0 μ l DPPH).

A_E : absorbance de l'échantillon (2,45 ml extrait + 50,0 μ l DPPH).

A_B : absorbance du blanc de l'échantillon. (2,45 ml extrait+50 μ l méthanol).

-Mode opératoire

Chaque 2,45ml des solutions méthanoliques des extraits (100 μ g/ml) a été additionnée de 50 μ l de la solution DPPH préparée à 5mM dans du méthanol (95%). Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesuré à 517nm. À titre d'indication, trois standards : l'acide tannique, la rutine et la catéchine connus pour leur effet anti-radicalaire contre le DPPH ont été testés en parallèle.

II -3-3. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

- Principe de la méthode

La capacité des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène est déterminée suivant la méthode rapportée par Atmani et ses collaborateurs (2009). Le principe de la réaction est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène par un antioxydant qui va faciliter sa décomposition en molécule d'eau. Le pourcentage d'inhibition du H₂O₂ est calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenger du H}_2\text{O}_2 = [(A_T - A_C) / A_T] \times 100$$

A_T : absorbance du témoin.

A_E : absorbance de l'échantillon.

-Mode opératoire

Un volume de 2 ml d'extrait est mélangé avec 1,2 ml de la solution de H₂O₂ (40mM) qui est préparé dans un tampon phosphate (pH 7,4). L'absorbance de H₂O₂ est mesurée à 230nm après 10min de réaction. Trois standards : l'acide tannique, l'acide caféique, et l'acide coumarique ont été testés en parallèle.

-Détermination des concentrations inhibitrices (IC₅₀)

Au départ, tous les extraits ont été testés à la concentration de 100 μ g/ml pour chaque activité anti-radicalaire, ensuite les extraits qui ont donné les trois meilleurs taux d'inhibition (pour chaque activité) ont été testés à des concentrations allant de 25 à 125 μ g/ml pour le test anti-OH \cdot et de 10 à 100 μ g/ml pour les deux activités anti-DPPH et anti-H₂O₂. Les

concentrations inhibitrices (IC₅₀) ont été calculées par le logiciel «Origine», à partir des courbes à régression linéaire pour certains et des courbes sigmoïdales pour d'autres. Les IC₅₀ des standards ont été déterminées de la même procédure. 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.

II -4. Etude chromatographique des fractions

II -4-1. Fractionnement des extraits par la chromatographie sur colonne

- Principe de la méthode

La chromatographie sur colonne est une méthode importante pour la séparation d'un produit contenant des impuretés. Cette technique sert également à séparer des produits organiques d'un mélange. Il existe deux types de chromatographie : la première est celle avec l'oxyde d'aluminium, tandis que la deuxième est celle avec le gel de silice (c'est la plus moderne des deux). Les deux ont le même principe d'utilisation, cependant cette dernière se fait avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire; avec cette méthode le rendement final est en général assez bon. Les diverses substances introduites au sommet de la colonne de gel de silice sont plus ou moins retenues à la surface du support, suivant leur polarité. Elles sont donc plus ou moins facilement entraînées par le solvant qui migre dans la colonne. Le plus apolaire passera en premier et ainsi de suite (Gramegna, 2004).

-Mode opératoire

La silice de la chromatographie sur colonne (0.063mm-0.2mm) a été préparée dans un solvant apolaire (chloroforme). L'échantillon à fractionner (20mg/ml préparé dans le méthanol) est déposé soigneusement en haut de la phase stationnaire et la progression de la phase mobile (sous pression atmosphérique) entraîne avec elle les différentes fractions. Des fractions ont été recueillies progressivement avec une élution de polarité croissante : chloroforme, méthanol/acétate d'éthyle (50/50 : v/v), méthanol et enfin méthanol/acide acétique

II -4-2. Evaluation des activités anti-radicalaires des fractions

Le système d'élution utilisé pour la chromatographie sur colonne a permis de récupérer quatre fractions pour chaque extrait ; ces dernières une fois bien séchées, ont fait l'objet d'une évaluation de leurs activités anti-OH·, anti-DPPH et anti-H₂O₂ à la concentration de 100µg/ml en suivant les protocoles expérimentaux utilisés précédemment.

II -5. Chromatographie sur couches minces

-Principe

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique simple utilisée dans le but de séparer différents constituants d'un mélange complexe, en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage: la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de la solubilité des composés dans la phase mobile.

- Mode opératoire

Des plaques de gel de silice sont utilisées pour l'analyse. Chaque fraction est déposée sous forme de spots de volume de 10µl sur la ligne de base de migration de la plaque ; cette dernière est déposée verticalement dans la chambre de chromatographie contenant le mélange de solvants conçu pour la séparation. Le système de séparation employé comme éluant est: (éthyle acétate, acide acétique, acide formique, eau).

Une fois que la phase mobile a atteint la limite de migration, les plaques ont été retirées, séchées puis observées en premier lieu à la lumière du jour et sous une lampe UV ensuite pulvérisées soigneusement avec la vanilline sulfurique, un révélateur à large spectre, préparée selon la méthode de Eloff et ses collègues (2005), dans le but de visualiser et de caractériser les sous-fractions invisibles sous UV et à la lumière du jour. L'analyse des chromatogrammes est accompagnée du calcul des rapports frontaux (RF), caractéristiques de chaque sous-fraction, puis comparés à ceux des témoins pour permettre d'identifier les constituants des différentes fractions. La détection des composés ayant une activité de capteurs de radicaux libres a été effectuée grâce à la pulvérisation d'une solution du radical DPPH (500µM préparée dans l'éthanol), selon la méthode de Sievers et ses collaborateurs (2002) sur les chromatogrammes. Les composés actifs manifestent des taches jaunes sur un fond violet, qui représentent la forme réduite du radical DPPH (DPPH-H).

III- Résultats et discussions

Le présent travail s'articule sur trois parties, on retrouvera ainsi les résultats concernant l'extraction et le dosage des composés phénoliques, ceux relatifs à l'activité antioxydant des extraits et enfin les résultats de l'activité anti-radicalaire des fractions et leur caractérisation sur CCM.

III-1. Préparation des extraits

La préparation des extraits à partir des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été effectuée selon la méthode de Chiang et ses collaborateurs (1994), légèrement modifiée. Les deux parties de la plante nettoyées et broyées ont été soumises à une extraction par l'éthanol (95%) pour obtenir initialement l'extrait brut. Ce dernier a subi un fractionnement par une série d'extractions successives avec des solvants à polarité décroissante (Acétate d'éthyle/Eau, Hexane/Eau et Chloroforme/Eau). La procédure suivie a permis d'obtenir six extraits pour chaque partie, à savoir : l'extrait éthanolique (brut), l'extrait acétate d'éthyle, l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, l'extrait d'hexane, l'extrait de chloroforme et l'extrait aqueux de chloroforme. Il est à noter que l'extrait aqueux d'hexane n'a pas été récupéré.

Le matériel végétal a été séché à une température ambiante dans un milieu ombragé et à l'abri de la lumière pour assurer une meilleure élimination d'eau, afin de préserver son contenu en composés phénoliques et d'éviter; une volatilisation (haute température), une dégradation (effet des hydrolases) ou une détérioration (De-Rijke et *al.*, 2006).

Dans le but d'optimiser l'extraction, le broyage et le tamisage ont été réalisés de façon à pouvoir récupérer la poudre la plus fine possible (figure 13) ayant un diamètre inférieur à 63 μ m. Selon Escribano et ses collaborateurs (2003), l'efficacité de l'extraction dépend de plusieurs paramètres ; entre autres, le diamètre des particules de la poudre, le volume et le type de solvants utilisés et le nombre d'extraction. D'après Lim et Murtijaya (2007), le taux d'extraction des principes actifs est inversement proportionnel avec la taille des particules obtenues après le broyage



Figure 13 : photographies de la poudre végétale de *F. angustifolia*. A) L'écorce. B) Les feuilles

L'extraction a été dirigée de sorte à utiliser l'éthanol comme premier solvant, d'une part, c'est pour obtenir le maximum de composés phénoliques dans la première étape, car ce solvant et en raison de sa polarité est reconnu pour être un bon solvant extracteur de principes actifs à partir des plantes médicinales (Shih *et al.*, 2009 ; Verma *et al.*, 2009) et d'autre part, il est moins altérant que le méthanol, qui peut exercer un effet de méthanolyse sur les tannins, pouvant perturber ainsi la teneur réelle des extraits en ces composés (Bruneton, 1999 ; Mueller-Harvey, 2001). La macération de la poudre dans l'éthanol a été suivie; d'une agitation pour établir un bon contact entre le solvant et les particules de la poudre, d'une décantation et puis d'une centrifugation, afin d'éliminer toutes celles qui y restent en suspension. Les taux d'extraction sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau II: Taux d'extraction (%) de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Solvants	Taux d'extraction de feuilles (%)	Taux d'extraction de l'écorce (%)
Ethanol	11.38	09,08
Acétate d'éthyle	50.66	16,46
Aqueux acétate d'éthyle	23.61	67,90
Chloroforme	36.95	21,58
Aqueux du Chloroforme	18.98	16,37
Hexane	48.13	23,45
Aqueux de l'hexane	ND	ND

-Chaque pourcentage est calculé par rapport à l'extrait dont il est issu précédemment.

-ND: non déterminé.

L'extrait éthanolique des feuilles de *F. angustifolia* a présenté un taux d'extraction légèrement plus élevé (11.38%) que celui de l'écorce (09.08%) (Tableau II). La deuxième étape d'extraction est beaucoup plus qualitative que quantitative, car elle est basée sur la répartition de l'ensemble des composés contenus dans l'extrait éthanolique entre une phase organique et une phase aqueuse, ce qui donne des teneurs appropriée pour chacune. L'utilisation de divers solvants à polarités différentes, permet de séparer ces composés selon

leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et tri-glycosylés) (Tableau III).

Tableau III : Les composés que pourraient contenir les extraits végétaux (D'après Newman et *al.*, 1997).

Extrait	Constituants probables
Brut	Flavonoïdes, aminoacides, terpènes, cires, tanins.
Hexane.	Cires, lipides, flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés.
Chloroforme.	Terpénoïdes, flavonoïdes aglycones.
Acétate d'éthyle	Flavonoïdes glycosylés, flavonoïdes sulfatés, coumarines.
Extraits aqueux	Flavonoïdes di et tri glycosylés, alcaloïdes, acides aminés, acides phénoliques et coumarines.

On remarque qu'à partir de la deuxième étape, la majeure partie des composés de l'extrait éthanolique de l'écorce est passée dans la phase aqueuse d'acétate d'éthyle dont le taux d'extraction atteint une moyenne de 67.90%, ce qui donne un signe de sa richesse en composés polaires. Pour les feuilles, c'est plutôt dans la phase organique d'acétate d'éthyle qu'un taux important a été enregistré (50.66%). Les taux d'extraction sont presque similaires pour les extraits hexane et chloroforme de l'écorce (21.58% et 23%, respectivement), alors que les extraits aqueux de chloroforme sont obtenus à des taux faibles. A partir des résultats obtenus, on déduit que les extraits de *F. angustifolia* contiennent des composés de polarité variables.

Cette méthode d'extraction menée à température ambiante, permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable, dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction. En effet, Cacace et Mazza (2001) ont rapporté que certains composés de structure sensible et instable comme la catéchine peuvent être réduits à des températures qui dépassent 35°C.

Le critère de taux d'extraction n'est pas suffisant pour préconiser la richesse d'un extrait en composés phénoliques car les extraits de plantes contiennent d'autres pigments. Cette évidence est montrée dans l'étude de quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins discutés ci-dessous.

III -2. Quantification des composés phénoliques

Dans le but d'évaluer les teneurs en molécules actives des extraits préparés à partir des feuilles et d'écorce de *F.angustifolia*, un dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins a été effectué. La principale raison pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

III -2-1. Quantification des phénols totaux

La méthode de Folin-Ciocalteu est très sensible mais malheureusement peu spécifique car beaucoup de composés réducteurs non phénoliques peuvent interférer tels que les caroténoïdes et la vitamine E (Kahkonen et al., 1999), cependant, elle reste la méthode la plus utilisée. Les teneurs des extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* (figure 14) ont été exprimées en équivalent catéchine à partir de la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions (Annexe1). A la première lecture des résultats, nous constatons que les teneurs des extraits varient de 35.67 mg Eq cat/g d'extrait pour l'extrait éthanolique de l'écorce à 249.07 mg Eq cat/g d'extrait pour l'extrait acétate d'éthyle des feuilles (Tableau IV) et que tous les extraits de ces dernières, mis à part celui d'aqueux d'acétate d'éthyle sont plus riches par rapport à ceux de l'écorce. En effet, il a été déjà prouvé que la répartition des composés phénoliques au sein de la même plante varie d'une partie à une autre (Machier et al., 2005).

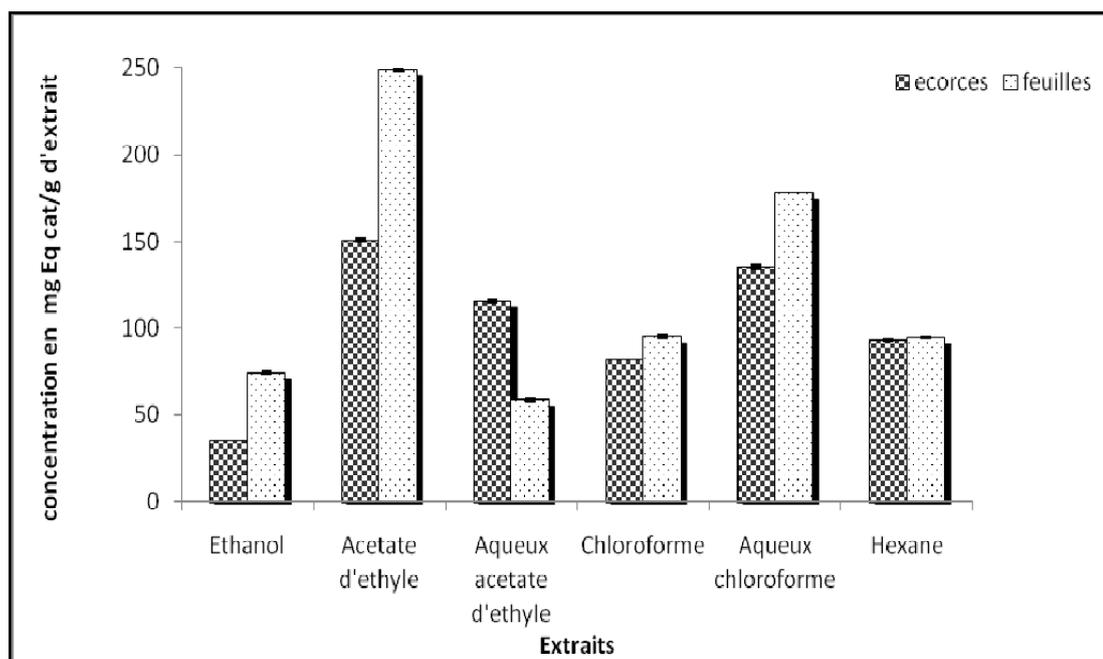


Figure 14: Histogramme des teneurs en phénols totaux des extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia*

Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et sont peu solubles dans les solvants organiques apolaires (Bruneton, 1999 ; Macheix et *al.*, 2005). Cette propriété est prouvée par nos résultats de dosage des phénols totaux dont l'évaluation globale des teneurs des extraits en ces composés indique qu'ils sont plus concentrés dans l'extrait organique polaire (acétate d'éthyle) et dans les phases aqueuses, que dans les extraits organiques apolaires (chloroforme et hexane) (figure 14). Au sein des extraits de feuilles, le contenu le plus élevé en phénols totaux est enregistré au niveau de l'extrait acétate d'éthyle (249 mg Eq cat/g d'extrait) suivi par l'extrait aqueux de chloroforme (178.16 mg Eq cat/g d'extrait). Les autres extraits présentent tous une faible teneur en phénols totaux. Quand aux extraits de l'écorce, trois valeurs importantes de 151.19, 135.46 et 115.19 mg Eq cat/g d'extrait ont été enregistré par les extraits acétate d'éthyle, aqueux de chloroforme et aqueux acétate d'éthyle, respectivement (Tableau IV). Les valeurs relativement faibles des deux extraits bruts peuvent être dues à l'encombrement qui empêche le contact entre le réactif et certains composés qui se trouvent liés.

Tableau IV: Teneur en phénols totaux des extraits de *F. angustifolia*

Extraits	Teneur en phénols totaux (mg Eq cat/g d'extrait)	
	Feuilles	Écorces
Éthanol	74.40	35.67
Acétate d'éthyle	249.01	151.19
Aqueux Acétate d'éthyle	58.87	116.06
Hexane	94.75	93.63
Chloroforme	95.43	82.14
Aqueux de Chloroforme	178.16	135.63

Le classement de 28 plantes médicinales largement utilisées par la population rurale d'Amérique du nord dans le traitement de la goutte a montré que la plus riche : *P. balsamifera* (Peuplier baumier) contient 258 mg Eq cat/g d'extrait (Owen et Johns, 1999). L'étude menée par kahkonen et ses collaborateurs (1999), montre, après classement de plusieurs plantes, que *Picea abies* (bourgeon de sapin) en est la plus riche avec un taux de 155.3 mg Eq cat/g d'extrait. Une autre étude menée par Katanilic et ses collaborateurs (2006) dans laquelle un classement de 70 plantes médicinales a été effectué selon leur richesse en phénols totaux, montre que les taux trouvés varient de 9 à 218 mg Eq cat/g d'extrait. En comparant nos résultats à ceux apportés par ces auteurs, on conclue que *F. angustifolia* est riche en ces composés tel qu'elle est déjà considérée par Li et ses collaborateurs (2008), en la classant

deuxième en terme de teneur en phénols totaux, parmi les 45 plantes médicinales qu'ils ont étudié. Il est important de souligner que l'utilisation de différentes méthodes d'extraction et de dosage, pourrait réduire la fiabilité d'une comparaison entre les diverses études.

III -2-2. Quantification des flavonoïdes

Pour la quantification des flavonoïdes on utilise souvent la méthode de chlorure d'aluminium basée sur la capacité de ces composés à former des complexes de couleur jaune avec l' $AlCl_3$ (Huang et al., 2004 ; Prasad, 2009). Dans notre étude, l'évaluation des teneurs des extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* en flavonoïdes a été déduite de la courbe d'étalonnage (Annexe 2) réalisée avec la rutine et les valeurs sont exprimées en mg Eq rut/g d'extrait. Les résultats sont représentés dans la figure suivante :

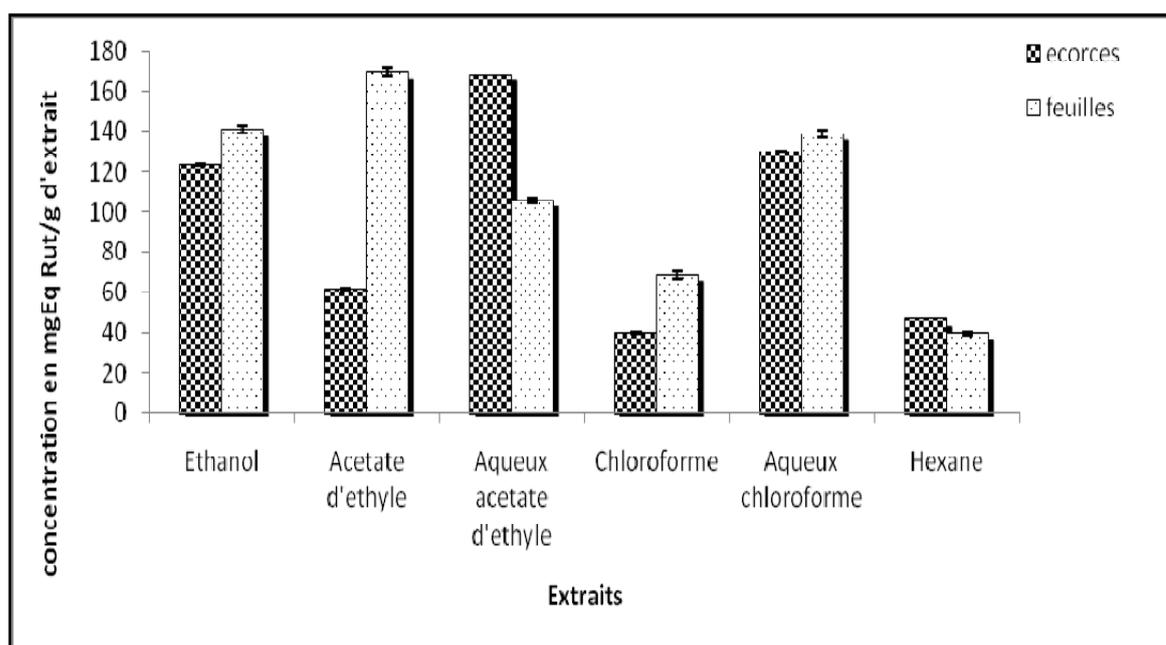


Figure 15: Histogramme des teneurs en flavonoïdes des extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia*

De la figure 15 ci-dessus, il ressort que la plupart des extraits possèdent un taux très important en flavonoïdes, particulièrement, les extraits polaires. Ainsi, au niveau de l'écorce, les extraits aqueux de chloroforme et aqueux d'acétate d'éthyle en sont les plus riches avec des teneurs de 130.2 et 168.3 mg Eq rut/g d'extrait, respectivement (Tableau V). Ceci est peut être dû à la présence d'une fraction osidique qui rend ces flavonoïdes solubles dans l'eau (Havsteen, 2002). Les taux les plus faibles sont observés au niveau des extraits apolaires (hexane et chloroforme) avec des taux de 46.6 et 39.7 mg Eq rut/g d'extrait, respectivement. Presque la même répartition est observée du côté des feuilles, en effet, le taux le plus élevé en flavonoïdes est enregistré au niveau de l'extrait acétate d'éthyle (169.53 mg Eq rut/g

d'extrait) suivi de près par les deux extraits éthanolique et aqueux de chloroforme. D'après les résultats obtenus, nous constatons qu'il y a une répartition hétérogène de ces composés entre les différents solvants d'extraction utilisés. Cela s'expliquerait d'une part, par la diversité moléculaire des flavonoïdes (Ghedira, 2005) et d'autre part, par le fait que ces composés ne se trouvent pas à l'état libre dans les tissus des végétaux ; par conséquent, leur complexations avec d'autres composés que se soit polaire ou apolaire peut influencer sur leur solubilité (Macheix, 2005). De cette présente analyse, on déduit que les extraits de *F. angustifolia* sont plutôt riches en flavonoïdes polaires.

Tableau V: Teneurs en flavonoïdes des extraits de *F. angustifolia*

Extraits	Teneur en flavonoïdes (mg Eq rut/g d'extrait)	
	Feuilles	Écorces
Éthanol	140.82	123.8
Acétate d'éthyle	169.53	61.6
Aqueux Acétate d'éthyle	106.02	168.3
Hexane	39.48	46.6
Chloroforme	68.58	39.7
Aqueux de Chloroforme	139.11	130.2

III -2-3. Quantification des tannins

Il existe plusieurs méthodes pour le dosage des tannins, mais la plus spécifique reste celle qui est basée sur leur capacité à faire précipiter les protéines, vu que cette propriété est étroitement liée aux tannins, sans qu'il y'ait d'autres interférents (Reed, 1995). Les teneurs des extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* en tannins ont été exprimées en équivalent acide tannique à partir de la courbe d'étalonnage réalisée préalablement (Annexe 3).

Contrairement aux résultats de dosage des phénols totaux et des flavonoïdes qui ont montré que ces deux classes de composés phénoliques se concentrent plus dans les phases aqueuses, les tannins des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* se condensent essentiellement dans les extraits organiques (figure 16). Les extraits de l'écorce ont affiché des taux très importants, qui dépassent 990 mg Eq A tan/g d'extrait au niveau de l'extrait éthanolique et qui avoisinent 600 mg Eq A tan/g d'extrait pour les extraits acétate d'éthyle et chloroforme. Dans le cas des feuilles, seuls les extraits organiques ont présenté des teneurs élevées : l'extrait hexane (838.5 mg Eq A tan/g d'extrait), acétate d'éthyle (639.6 mg Eq A

tan/g d'extrait) et éthanolique (266.3 mg Eq A tan/g d'extrait) (Tableau VI). Quand aux extraits aqueux, ils se sont révélés très pauvres en tannins, voir même dépourvus (aqueux de chloroforme) pour les deux parties de la plante étudiée. Cette répartition pourrait être expliquée par l'insolubilité des tannins, en particulier les tannins condensés à haut poids moléculaire, dans les solutions aqueuses (Cheynier, 2005). En comparant avec les résultats de dosage des tannins rapportés par Owen et Johns(1999), on constate que, par rapport aux 28 plantes étudiées et dont la plus riche présente un taux de 292 mg Eq A tan/g d'extrait, *F. angustifolia* est remarquablement riche en ces derniers.

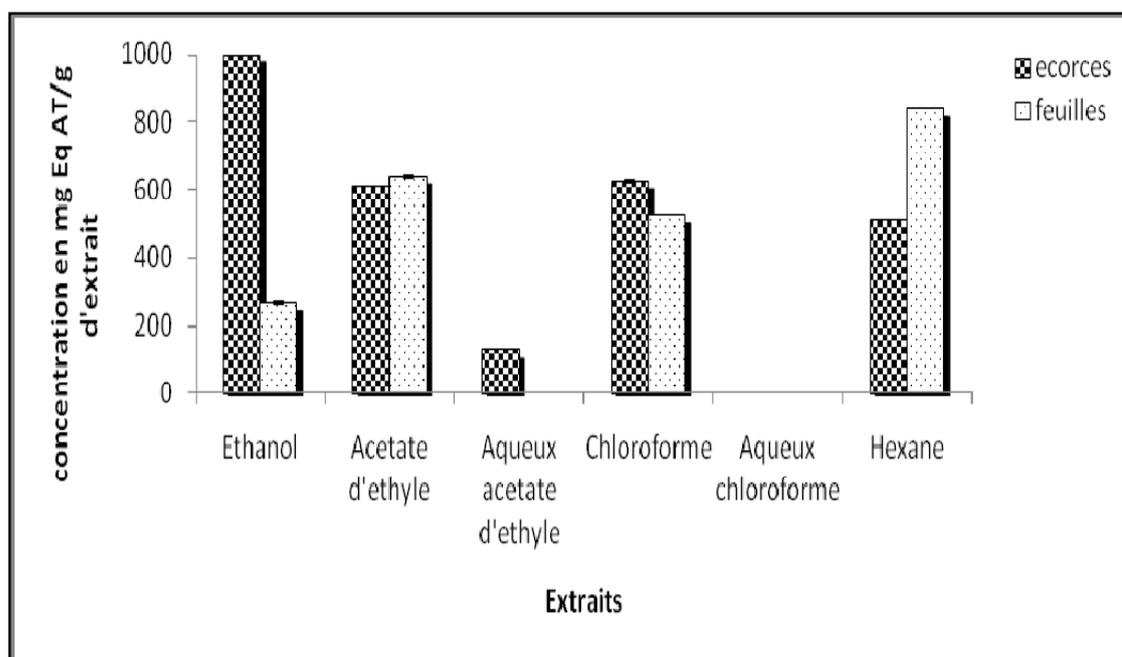


Figure 16: Histogramme des teneurs en tannins des extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia*

Tableau VI: Teneurs en tannins des extraits de *F. angustifolia*

Extraits	Teneur en tannins (mg Eq A tan/g d'extrait)	
	Feuilles	Écorces
Éthanol	266.3	990.4
Acétate d'éthyle	639.7	611.6
Aqueux Acétate d'éthyle	ND	126.1
Hexane	838	509.9
Chloroforme	526	625
Aqueux de Chloroforme	ND	ND

III -3. Evaluation de l'effet anti-radicalaire des extraits

Etant donné l'importance des agents antioxydants sur le plan clinique et leur rôle dans la prévention de plusieurs maladies dues au stress oxydant, plusieurs études sont menées dans le but de trouver de nouvelles molécules douées de cette propriété, les plantes médicinales en constituent une source inépuisable, vu la diversité de leur métabolites secondaires. En parallèle, sur le plan expérimental, plusieurs méthodes ont été développées pour l'évaluation de l'activité antioxydant ; parmi elles, certaines testent le pouvoir inhibiteur de ces molécules pour les enzymes productrices de radicaux libres qui sont à l'origine de stress oxydant, alors que, d'autres, tentent d'évaluer le pouvoir scavenger des radicaux libres. *In vitro*, ces méthodes se basent exclusivement sur la capacité de piégeage de radicaux libres, d'un composé comme étant un indicateur de son potentiel antioxydant (Marc et al., 2004)

Les activités anti-radicalaires des extraits ; éthanolique, acétate d'éthyle, aqueux de l'acétate d'éthyle, hexane, chloroforme et aqueux de chloroforme de *Fraxinus angustifolia* (feuilles et écorce) ont été étudiés à l'aide de méthodes spectro-photométriques *in vitro* en utilisant trois méthodes complémentaires : inhibition du radical hydroxyle, piégeage de son espèce précurseur ; le H₂O₂ et l'activité scavenger du radical DPPH, dans l'objectif de refléter et de mettre en valeur l'application de cette plante en médecine traditionnelle dans le traitement des pathologies d'origine inflammatoire telles que le rhumatisme. Les extraits ont été testés à différentes concentrations afin d'exprimer les résultats en terme des IC₅₀.

Comme il n'y a pas de consensus scientifique pour une méthode de référence pour l'évaluation de l'activité antioxydant d'un échantillon, ainsi la combinaison de différents tests est un indicateur de la capacité antioxydant de cet échantillon (Amic et al., 2003).

III -3-1. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le radical hydroxyle (OH[•])

Le radical hydroxyle possède une très grande réactivité vis-à-vis des biomolécules (ADN, protéines, lipides...), c'est une espèce qui ne diffuse quasiment pas au sein des milieux biologiques et qui réagit sur le lieu même de sa production, ce qui lui confère une toxicité remarquable. C'est un oxydant extrêmement puissant, constituant certainement le radical libre le plus nuisible en biologie (Gardès-Albert, 2006).

La mise en évidence de la formation du radical hydroxyle est entièrement impossible, vu sa très courte durée de vie, donc des méthodes dites indirectes sont utilisées et qui elles, détectent les produits de sa réaction. La capacité scavenger du radical hydroxyle par les extraits de *Fraxinus angustifolia* a été mesurée en évaluant la compétition entre le

désoxyribose et les extraits testés pour le radical hydroxyle qui est produit par le système ascorbate-EDTA-FeCl₃ (figure 17). Ce système permet de générer le OH[•] par la décomposition catalytique du H₂O₂ en présence du fer (la réaction de Fenton). Le sucre pentose qui est le désoxyribose est attaqué par les radicaux OH[•], des produits de dégradation sont ainsi générés, qui, une fois chauffés avec le TBA à faible pH, réagissent pour former un complexe chromogène (TBA-MDA [acide thiobarbiturique-malondialdéhyde]) qui peut être quantifié par la mesure de l'absorbance à 532nm. Les résultats de l'activité anti-radicalaire des extraits et des standards à 100µg/ml, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical OH[•] sont illustrés dans la figure 18 et le tableau VII.

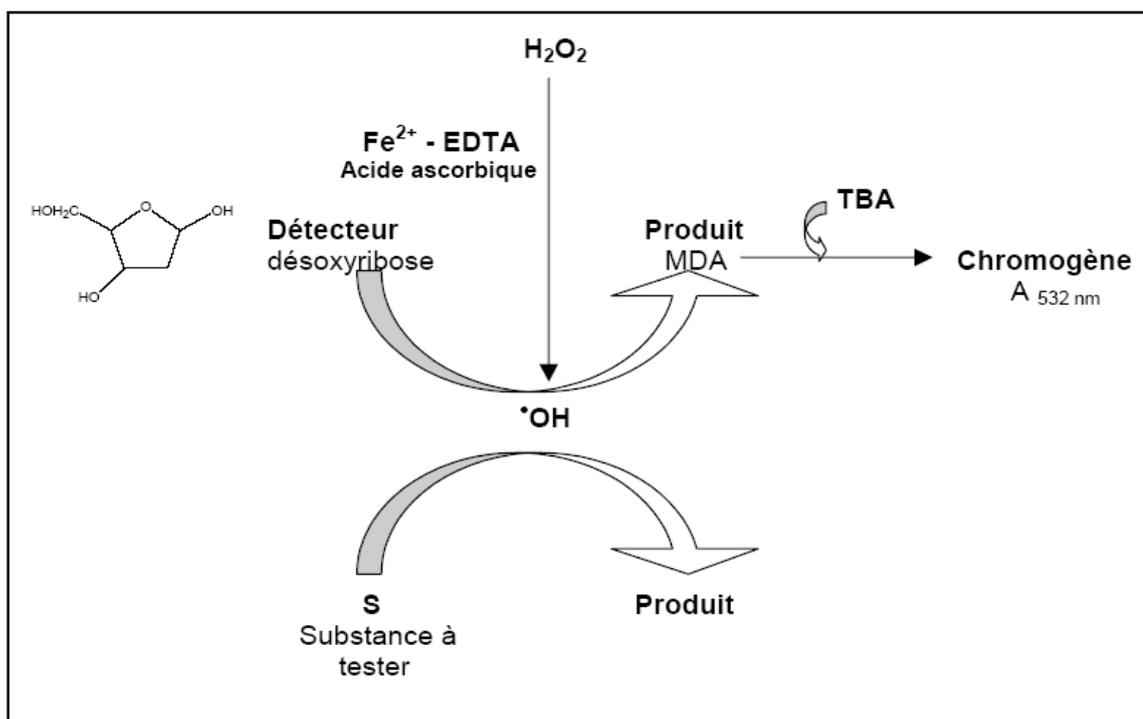


Figure 17: Principe de détection du radical OH[•] en utilisant le système H₂O₂-(Fe⁺²-EDTA) acide ascorbique (Soobrattee et al., 2005).

A la première lecture des résultats illustrés dans la figure suivante, on constate que l'activité anti-OH[•] diffère d'une partie de la plante à une autre et d'un extrait à un autre et que la plupart des extraits affichent des taux d'inhibition, allant de 29% à 65%, hautement supérieure à ceux des molécules de références. La raison de cette différence dans les activités peut être due à la quantité variable des composés phénoliques (nombre de cycle phénolique, substitution aromatique, glycosylation, conjugaison avec d'autres composés phénoliques ou acides organiques) contenue dans les extraits (Laughton et al., 1989).

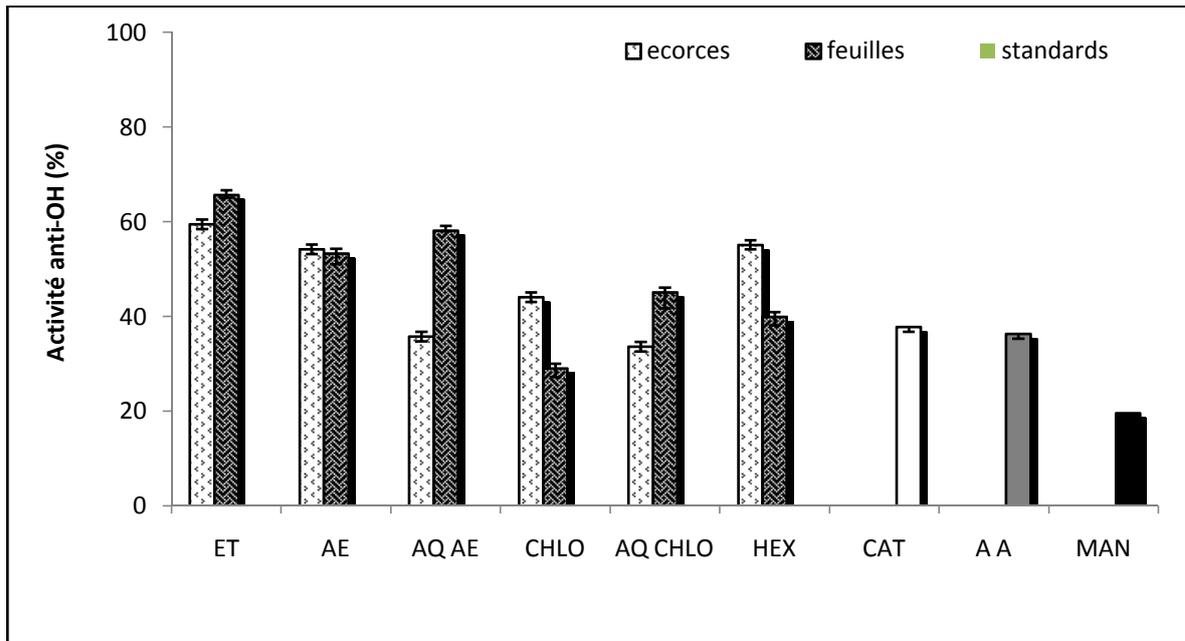


Figure 18: Effet scavenger contre le radical OH^\bullet des extraits des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* et les standards à $100\mu\text{g/ml}$. Eth=Ethanol ; AE=Acétate d'éthyle ; Aq AE=Aqueux d'acétate d'éthyle ; Chlo=Chloroforme ; AqCH=Aqueux du chloroforme ; Hex= Hexane ; Cat =Catéchine ; AA=Acide ascorbique ; Man=Mannitol
-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

En absence de travaux consacrés à l'étude de l'activité anti-hydroxyle (OH^\bullet) des plantes du genre *Fraxinus* et encore moins de l'espèce *F. angustifolia*, nous avons comparé nos résultats à ceux rapportés par des auteurs qui ont employé le même système de génération du radical OH^\bullet ($\text{EDTA-FeCl}_3+\text{H}_2\text{O}_2+\text{Désoxyribose}$), les mêmes solvants d'extraction et les mêmes parties de plantes, mais en utilisant des plantes d'espèces différentes.

Pour les feuilles de *Fraxinus angustifolia*, les résultats montrent que l'extrait éthanolique a donné la meilleure activité qui est de 65.68%, un très bon effet qui peut être dû à la présence de tous les composés dans cet extrait natif et qui agissent par synergie, suivi par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle avec un taux de 58.18%. Ce résultat est comparable à celui de Jung et ses collaborateurs (2008), qui ont rapporté que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles d'*Ulmus davidianex* a un effet anti-radicalaire contre le radical hydroxyle de 58,56%. Les extraits acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme ont affiché des activités scavenging de 53.38% et 45.19%, respectivement. Les activités les plus faibles mais qui restent satisfaisantes par rapport aux standards utilisés, ont été obtenues avec les extraits organiques apolaires ; hexane et chloroforme avec des taux de 33.99% et 29.11%, respectivement (Tableau VII).

On remarque que les phases aqueuses et les extraits organiques polaires (éthanol, acétate d'éthyle) ont enregistré des valeurs appréciables. Cela peut être expliqué par le fait

qu'ils contiennent des composés polaires riches en groupements hydroxyles (responsables de l'effet scavenger) tel que les flavonoïdes et les phénols simples (Tableau III). L'effet piègeur des flavonoïdes dépend de leur structure, ils sont connus pour leurs capacités de chélation des métaux et leur activité scavenging du radical OH[•] (Morel et al., 1994). Chen et ses collaborateurs (2002) ont rapporté que l'activité inhibitrice du radical OH[•] est bien liée à la composition chimique des composés. Ainsi, la rutine et la quercétine sont de très bons chélateurs de fer et de cuivre impliqués dans la génération des radicaux libres. Ils peuvent prévenir l'oxydation et empêchent la formation du radical OH[•]. Ces chélateurs forment des complexes avec les métaux; ils inhibent le cycle redox du métal en formant des complexes métalliques insolubles inhibant ainsi le développement de la réaction de Fenton (Wei et al., 2002 ; Lee et al., 2004; Cillard et Cillard, 2006). Enfin une bonne corrélation (r = 0.82) a été trouvé entre la teneur en flavonoïdes et l'activité anti-hydroxyle des extraits de *Fraxinus angustifolia* (Annexe 4), indiquant que l'effet anti-radicalaire contre le radical OH des extraits des feuilles est proportionnel à leurs teneurs en flavonoïdes, ce qui suggère leur implication dans cet effet.

Concernant l'écorce et contrairement aux feuilles, ce sont les extraits organiques ; éthanolique, acétate d'éthyle, hexane et chloroforme qui exhibent les activités les plus élevées avec des valeurs de 59.56%, 54.56% ,55.21% et 44,10%, respectivement (Tableau VII). Nos valeurs sont plus importantes que celles rapportées par Rajbir, et ses collaborateurs (2007), qui font état d'un effet scavenger contre le radical hydroxyle de 22,4% à 100 µg/ml pour l'extrait méthanolique de l'écorce de *Ficus racemos* (figuiers). Néanmoins, l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle a enregistré une valeur de 35.84% semblable à celle de l'acide ascorbique (P<0.05) et pas loin de celle de la catéchine (37.85%). L'extrait aqueux de chloroforme avait un effet de 33,64%, hautement supérieur à celui de mannitol.

Tableau VII: Activité anti-radicalaire contre le OH[•] à 100µg/ml des extraits de *F.angustifolia* et les standards.

Extraits	Effet scavenger du OH [•] (%)		
	Ecorce	Feuilles	standards
Ethanol	59.56	65.68	CAT : 37.85
Acétate d'éthyle	54.56	53.38	AA : 36.37a
Aqueux acétate d'éthyle	35.84a	58.18	MAN : 19.58
Hexane	55.21	33.99	
Chloroforme	44.1	29.11	
Aqueux chloroforme	33.64	45.19	

-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

Malgré la richesse des deux extraits ; aqueux d'acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme de l'écorce en flavonoïdes, comme il a été rapporté par les résultats de dosage (168.3mg eq rut/g d'extrait et 130.23mg eq rut/g d'extrait, respectivement) et malgré le puissant effet anti-radicalaire de cette classe de composés phénoliques, qui intervient en chélatant le fer comme expliqué précédemment, le rendement de ces deux derniers extraits reste modéré en les comparant à celui des extraits aqueux des feuilles. La catéchine, n'a affichée qu'un taux de 37.85%, une valeur de très loin inférieure à celle de l'extrait éthanolique des feuilles (65.68%). Notre résultat témoigne encore une fois, comme s'est fait par Chen et ses collaborateurs (2002) et Chung et son équipe (2006) que l'activité inhibitrice du radical OH[·] est fortement associée à la structure chimique des composés et pas uniquement à leur concentration. D'autre part, il laisse supposer, que la composition de cette classe de composés phénoliques (flavonoïdes) n'est pas la même au niveau des deux parties utilisées.

La distinction des extraits organiques de l'écorce dans l'activité anti-OH peut s'expliquer par leur richesse en tannins. En effet, les unités oligomériques des tannins condensés et hydrolysables, qui sont des composés polymériques (ils ont une structure polycyclique d'où leur tendance à s'accumuler dans les solvants organiques), sont doués d'un potentiel anti-radicalaire plus prononcé en comparaison à leurs éléments monomériques, tels que l'acide gallique et la catéchine. Cette propriété est expliquée par la présence des groupements hydroxyles supplémentaires sur les parties galloyls de ces oligoéléments (Soobrattee et *al.*, 2005 ; Cai et *al.*, 2006). La présence de la forme galloyle augmente significativement cette activité (Heim et *al.*, 2002) et jouit en général d'un potentiel scavenging élevé contre le OH (You et *al.*, 2008).

Par ailleurs une bonne corrélation ($r=0,72$) est trouvée (Annexe 5) entre l'activité anti-OH des extraits d'écorce et la teneur en tannins, suggérant que l'effet scavenger contre le radical hydroxyle de ces extraits est proportionnel à leurs teneurs en tannins, ce qui peut prouver leur implication dans cet effet et c'est en accord avec une étude menée par Lopes et ses collaborateurs(1999), qui a montré que les tannins sont de puissants agents antioxydants du radical hydroxyle.

D'après les résultats du dosage des tannins, les extraits hexane et chloroforme des feuilles en sont riches (838 et 526 mg eq AT /g d'extrait, respectivement) mais leur activité anti-OH est modeste, ce résultat peut s'expliquer de deux manières : soit par le fait que les tannins, à des concentrations élevées, peuvent interférer entre eux et diminuent par conséquent la disponibilité des fonctions hydroxyles des groupements galloyles impliqués

dans cette activité, ou bien par le fait que la richesse d'un extrait n'implique pas forcément un effet anti-radicalaire important; en suggérant que seules certaines catégories de composés phénoliques sont douées de cette activité.

- Activité anti-radicalaire contre le radical OH à différentes concentrations

Les extraits ayant exprimés des effets importants (>50%) ainsi que les standards ont été testés sur une gamme de concentrations (25, 50, 75, 100, 125µg/ml) selon leur efficacité anti-radicalaire, dans le but d'exprimer les résultats en terme d'IC₅₀.

L'IC₅₀ est la concentration qui correspond à 50% d'inhibition du radical hydroxyle, la valeur la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée et par conséquent une activité anti-radicalaire plus importante (Nakiboglu et *al.*, 2007). Les résultats de l'activité anti-OH des extraits et des standards à différentes concentrations et leur IC₅₀ sont illustrés dans les figures 19 et 20 et le tableau VIII.

D'après les figures ci-dessous, on constate que l'effet anti-OH des extraits et des standards dépend de leur concentration. En effet, une augmentation de la concentration est accompagnée d'un accroissement de l'effet anti-radicalaire et cela jusqu'à 100µg/ml, ce qui pourrait être expliqué par l'augmentation du nombre de composés qui jouent un rôle dans l'activité scavenger. Au dessus de cette concentration, mis à part la catéchine, une diminution de l'activité anti-radicalaire a été observée, notamment pour l'acide ascorbique où une baisse significative de l'effet scavenger (19,92%) a été observée par rapport à celle obtenue à 100µg/ml (36,37%). Cela peut être expliqué par le fait que l'acide ascorbique, à une concentration élevée, exerce un effet pro-oxydant (Garait, 2006) d'une part et par le phénomène de l'encombrement stérique entre les composés phénoliques dans les extraits, d'autre part (Hung et *al.*, 2004).

À partir des courbes de la figure 19 nous avons pu déterminer les IC₅₀ des extraits de l'écorce, dont la plus importante est celle de l'extrait éthanolique avec une valeur de 94.58 µg/ml. Quant aux extraits hexane et acétate d'éthyle, leurs IC₅₀ sont de 99.95 µg/ml et 109.72 µg/ml, respectivement (Tableau VIII). Dans une étude comparative de l'activité scavenging du radical hydroxyle entre les feuilles, l'écorce et les fleurs de *Soymida febrifuga*, l'extrait méthanolique de l'écorce a affiché une IC₅₀ de 125.05 µg/ml.

De même pour les feuilles, l'effet est dose-dépendant (figure 20). L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle a montré la plus faible IC₅₀ (P<0.05) par rapport aux autres extraits testés (74.71µg/ml), reflétant ainsi un potentiel anti-radicalaire important, suivi par l'extrait

éthanolique avec une IC_{50} de 79.76 $\mu\text{g/ml}$ puis l'extrait d'acétate d'éthyle avec une valeur de 79.76 $\mu\text{g/ml}$ (Tableau VIII).

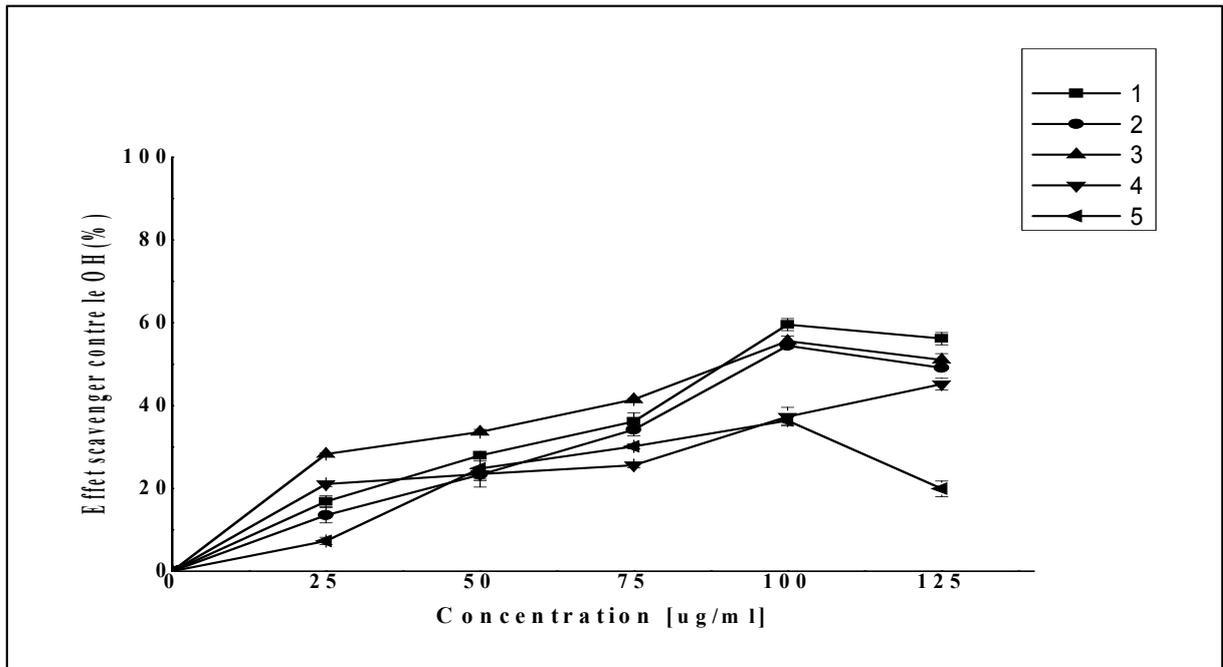


Figure 19: Effet scavenger contre le radical hydroxyle des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* et les standards à différentes concentrations (25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g/ml}$).

(1) Ethanol ; (2) Acétate d'éthyle ; (3) Hexane ; (4) Catéchine ; (5) Acide ascorbique

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

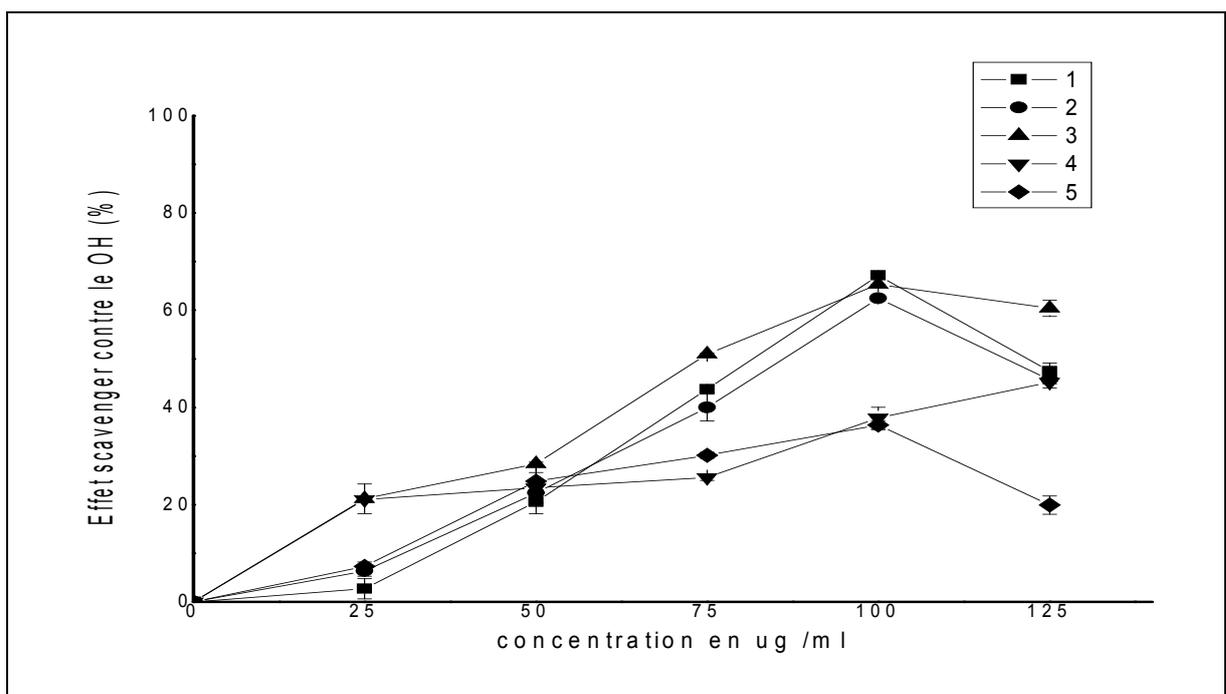


Figure 20 : Effet scavenger contre le radical hydroxyle des extraits de s feuilles de *F. angustifolia* et les standards à différentes concentrations (25, 50, 75, 100, 125 $\mu\text{g/ml}$).

(1) Ethanol ; (2) Acétate d'éthyle ; (3) Aqueux d'acétate d'éthyle ; (4) Catéchine ; (5) Acide ascorbique.

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

Tableau VIII: les IC₅₀ des extraits des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* et les standards

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Feuilles	Ecorce	standards
Ethanol	79.76	94.58	AA : 128.22
Acétate d'éthyle	90.56	106.72	Cat : 160.25
Aqueux acétate d'éthyle	74.71	/	Man : 281.15
Hexane	/	99.95	

Afin de situer les IC₅₀ retrouvées, on les a comparés à celles rapportées par des travaux qui se sont intéressés à l'étude de l'inhibition des radicaux hydroxyles par des extraits de plantes. D'après le tableau IX ci-dessous, il en ressort que la plupart des études ont rapportées des IC₅₀ élevées (>100µg/ml) qui reflètent des effets anti-radicalaires faibles. L'effet exprimé par les extraits de *F. angustifolia* est donc plus fort avec une moyenne qui dépasse 50%, une valeur supérieure même à celle des standards (acide ascorbique, catéchine et mannitol). D'autre part, en comparant entre les activités données par les extraits de *Fraxinus angustifolia*, on remarque que les extraits des feuilles ont manifesté des effets plus prononcés que ceux de l'écorce, qui sont eux même relativement importants. Cela peut être expliqué par la différence des parties végétales utilisées (feuilles et écorces) et que les feuilles sont probablement plus riches en polyphénols, vu qu'elles sont le siège de la photosynthèse.

Tableau IX : Exemples de travaux intéressés à l'étude de l'inhibition du radical hydroxyle

La plante	L'extrait	IC50	Références
<i>Achillea alexandri</i>	Acétate d'éthyle	50µg/ml	Kundakovic et al., 2005
<i>Lagerstroemia speciosa</i>	Ethanolique Acétate d'éthyle Méthanolique	49±4.0µg/ml 86±4.5µg/ml 159±7.1µg/ml	Priya et al., 2008
<i>Soymida febrifuga</i> racine écorce feuille	Méthanolique	267.01±10.22µg/ml 125.05±6.69µg/ml 181.44±3.99µg/ml	Reddy et al., 2008
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ethanolique	8mg/ml	Jayakumar et al., 2009
<i>Amaranthus lividus</i> L.	Aqueux Acétate d'éthyle Méthanolique	37.4±0.43mg/ml 3.58±0.13mg/ml 9.53±0.27mg/ml	Ozsoy et al., 2009
<i>Antler velvet</i>	Éthanolique Méthanolique	40mg/ml 30mg/ml	Zhou et Li, 2009

Pour conclure, ces résultats ne nous renseignent pas sur le mode d'action de ces extraits et une question se pose : ont-ils un effet inhibiteur sur la formation du radical hydroxyle ou agissent comme des piègeurs de ce dernier ? D'autant plus que la génération des radicaux hydroxyles induite par le complexe Fe^{3+} -ascorbate- H_2O_2 effectuée en l'absence du chélateur EDTA, permet aux ions de fer de se lier directement au sucre. Dans de telles conditions, les composés présents dans les extraits peuvent empêcher la dégradation du désoxyribose par chélation du métal plutôt que par un effet scavenging du OH (Yasunorio et al., 2001).

III -3-2. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le radical DPPH

Le radical DPPH (2,2 diphenyl 1-picryl hydrazyl) est largement utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydant des molécules biologiques, c'est un radical synthétique organique stable, qui peut être réduit en présence des antioxydants par transfert d'électron ou de protons (figure 21). Ainsi la coloration violette typique du DPPH se dissipe et l'intensité de la réaction dépendra du potentiel antioxydant des substances testées (Elmastas et al., 2006). Les résultats de l'activité anti-radicalaire des extraits et des standards à $100\mu\text{g/ml}$, exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés dans la figure 22 et le tableau X.

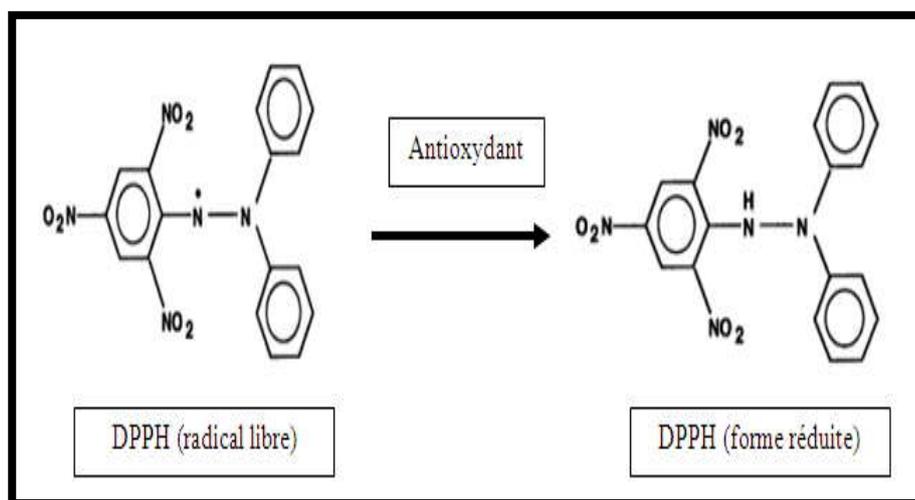


Figure 21 : La forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

Selon les résultats obtenus, les effets des extraits de feuilles et de l'écorce de *F.angustifolia* sont variables d'un extrait à un autre. Cela peut s'expliquer par la teneur et la nature des composés phénoliques extraits par chaque solvant utilisé lors du procédé d'extraction. Ce résultat, est déjà observé par Shyu et ses collègues (2009) ainsi que Simirgiotis et ses collègues (2009), en utilisant plusieurs solvants d'extraction.

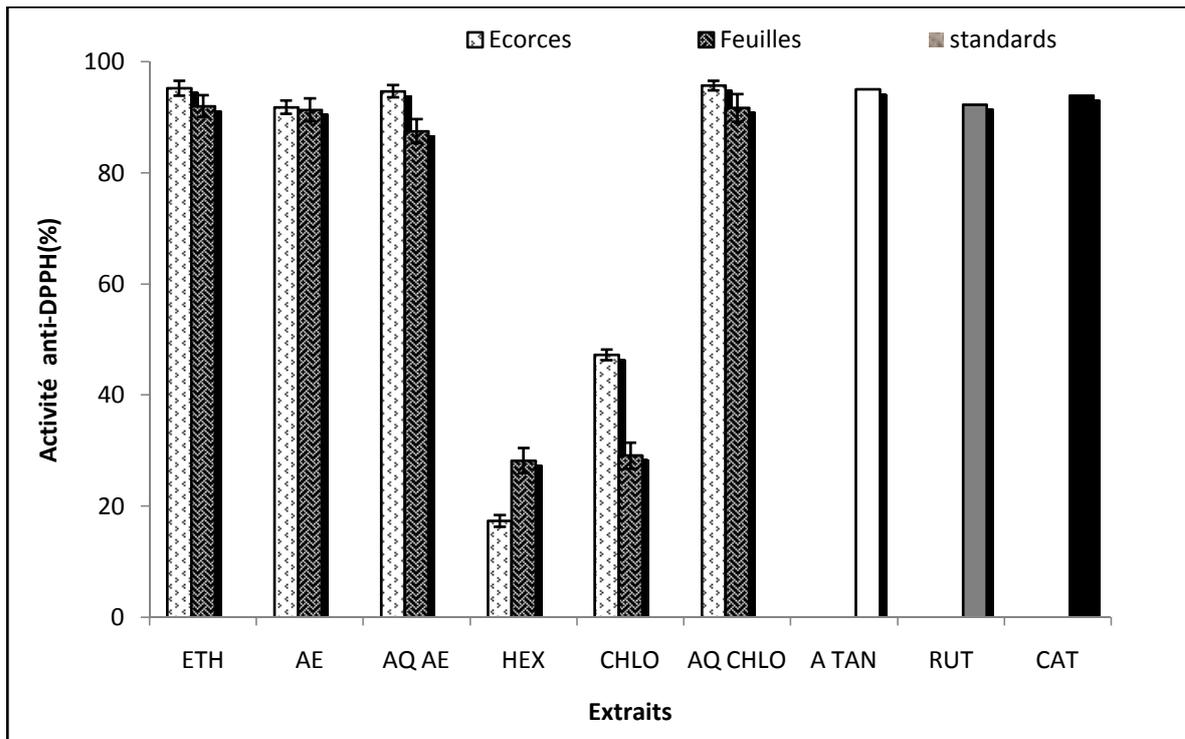


Figure 22: Effet scavenger contre le DPPH des extraits des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* et les standards à 100µg/ml.

Eth=Ethanol ; AE=Acétate d'éthyle ; AqAE=Aqueux d'acétate d'éthyle ; Chlo=Chloroforme ; AqCH=Aqueux du chloroforme ; Hex= Hexane ; A TAN=Acide tannique. RUT=Rutine ; CAT= Catéchine

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

Les extraits organiques polaires et les extraits aqueux de l'écorce ont exhibé de puissants effets svacengers contre le radical DPPH à 100µg/ml (figure 22). Les extraits aqueux du chloroforme et éthanolique présentent les meilleures activités avec des taux de 95,75% et 95,26%, respectivement, similaires à celle de l'acide tannique (95.05%) ($P < 0,05$), suivi par l'extrait aqueux acétate d'éthyle avec une activité de (94,73%) supérieure à celles des standards: la catéchine (93.94%) et la rutine (92.31%), l'extrait acétate d'éthyle a exhibé une activité de (91.84 %). Cependant, les extraits organiques apolaires (chloroforme et hexane) ont exhibé les plus faibles activités avec des taux de 43,17% et 17,42%, respectivement (Tableau X).

La même constatation est faite pour les feuilles où les extraits d'acétate d'éthyle et éthanoliques ont exhibé une activité moyennant 92%, similaire à celle de la rutine ($P < 0,05$), suivi par les extraits aqueux du chloroforme (91.75%) et aqueux d'acétate d'éthyle (87.58%). Le reste des extraits a exhibé des activités faibles (Tableau X), significativement inférieures à celles des standards utilisés ($P < 0,05$).

Tableau X : Activité anti-radicalaire contre le DPPH à 100µg/ml des extraits de *F. angustifolia*.et les standards.

Extraits	Effet scavenger du DPPH (%)		
	Ecorce	Feuilles	standards
Ethanol	95.26 a	92.03b	A TAN : 95.05a
Acétate d'éthyle	91.84c	92.33b	RUT : 92.31b
Aqueux acétate d'éthyle	94.73	87.53	CAT : 93.94
Hexane	17.42	28.26	
Chloroforme	47.27	29.13	
Aqueux chloroforme	95.75 a	91.75c	

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3)

-Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P<0,05).

Ces résultats sont en accord avec une étude menée par Han et ses collaborateurs (2004), sur une variété de *Fraxinus*, ou il a été démontré que l'effet scavenger du radical DPPH par les extraits méthanoliques des feuilles de *Fraxinus rhychophlla*, espèce qui appartient à la famille des Oléacées, est de 50% à une concentration de 70µg/ml. Une autre étude faite sur l'activité scavenging de DPPH de trois plantes médicinales dont *Fraxinus excelsior* a montré que l'activité de l'extrait méthanolique est supérieure à celles du n-hexane et du dichlorométhane (Middleton et al., 2005), suggérant ainsi que les composés piègeurs du radical DPPH sont de nature polaires. Une récente étude réalisée par Atmani et ses collaborateurs (2009) sur l'activité antioxydant de trois espèces locales, à savoir *Pistacia lentiscus*, *Fraxinus angustifolia* et *Clematis flammula*, a montré que ce sont également les extraits éthanolique, acétate d'éthyle et aqueux du chloroforme de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*, qui exhibent les meilleures activités anti-DPPH.

L'activité anti-radicalaire des extraits organiques polaire et des extraits aqueux à la concentration de 100µg/ml est très intéressante. Ce résultat s'expliquerait non seulement par leur richesse en phénols totaux, mais aussi par la nature de leurs composés phénoliques hydrosolubles. Ces composés sont caractérisés par la présence des groupements hydroxyles qui jouent un rôle primordial dans l'activité anti-radicalaire (Robards et al., 1999).

- Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH à différentes concentrations

Les extraits ayant exprimés des effets importants ainsi que les molécules de référence ont été testés sur une gamme de concentrations selon leur efficacité anti-radicalaire, dans le but d'exprimer les résultats en termes d'IC₅₀. Les résultats des IC₅₀ des extraits et des standards sont illustrés dans les figures 23 et 24 et le tableau XI.

Dans le cas des extraits d'écorce (figure 23), nous constatons une diminution de l'effet anti-radicalaire à partir de la première dilution (75µg/ml), pour les trois extraits. Au dessous de cette concentration, l'effet anti-DPPH commence à baisser considérablement pour atteindre les taux les plus faibles à 10µg/ml, tandis que l'effet des standards reste stable à cette concentration. À partir de ces courbes nous avons pu déterminer les IC₅₀ dont la plus importante est celle de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle avec une valeur de 18.41µg/ml. Quant aux extraits éthanolique et aqueux du chloroforme, leurs IC₅₀ sont de 29.11 µg/ml et 43.10 µg/ml, respectivement (Tableaux XI). Ces résultats sont très intéressants en les comparant à d'autres signalés par des auteurs qui ont travaillé sur des plantes appartenant au genre *Fraxinus* où des IC₅₀ largement supérieures à 100µg/ml ont été rapportées par Han et ses collaborateurs (2004) pour les feuilles de *F. mandshurica* et par Samarth et Krishna (2007) concernant les feuilles de *F. griffithii*.

Par ailleurs, les IC₅₀ trouvées pour les extraits d'écorce restent supérieures à celles rapportées par Atmani et ses collaborateurs (2009) qui étaient de 10 µg/ml pour les deux extraits aqueux et étant donné que la plupart des paramètres d'investigation (matériel végétal, protocole d'extraction et le procédé d'évaluation de l'activité anti-DPPH) sont semblables entre les deux études, Cette distinction n'est probablement attribuée qu'à la différence dans la période de cueillette de la matière végétale, en l'occurrence, la teneur en composés phénoliques.

En effet, la saison de la collecte du matériel végétal influence énormément l'activité biologique des extraits de plantes, car la teneur en métabolites secondaires chez les végétaux n'est pas stable dans le temps. Au cours des mois, voire des journées, des poussées de biosynthèse engendrent une accumulation plus au moins importante de certains constituants des chaînes métaboliques ; certaines études ont même montré que le profil chimique de ces composés peut être différent au cours de la même journée (Wchitl et Anton, 2003)

Concernant les extraits de feuilles (figure 24), nous constatons que l'effet de la dilution commence également à partir de la concentration de 75µg/ml, donnant ainsi aux extraits : éthanolique, acétate d'éthyle et aqueux du chloroforme des IC₅₀ de 49.08, 54.05, 41.02 µg/ml, respectivement, qui sont loin d'être comparables à celles des standards (Tableau XI).

Les IC₅₀ qui expriment le potentiel anti-radicalaire le plus important sont celles des extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce, ce qui veut dire que les extraits de feuilles sont peu actifs en comparaison aux extraits de l'écorce. Ce résultat présume la richesse de cette partie en composés phénoliques doués d'activité anti-DPPH. La différence du potentiel antioxydant entre les deux parties de la plante peut se justifier par les teneurs

variables et la diversité des molécules contenues d'une partie à une autre, surtout que la structure et le nombre de groupements d'hydroxyles attachés aux composés phénoliques jouent un rôle crucial dans la capacité scavenging du radical DPPH (Tsimogianis , 2006)

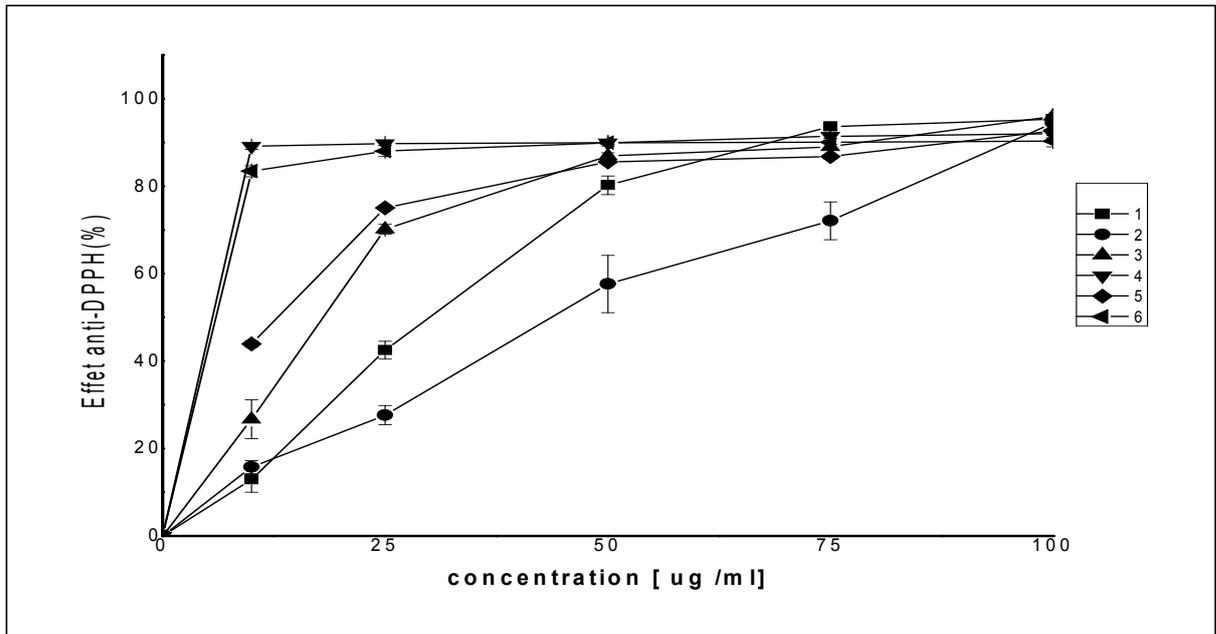


Figure 23: Effet scavenger contre le DPPH des extraits d'écorce de *F. angustifolia* et les standards à différentes concentrations (10,25, 50, 75, 100, µg/ml).

(1)Ethanol ; (2) Aqueux d'acétate d'éthyle ; (3) Aqueux du chloroforme; (4) Rutine; (5) Acide tannique ;(6) Catéchine

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype

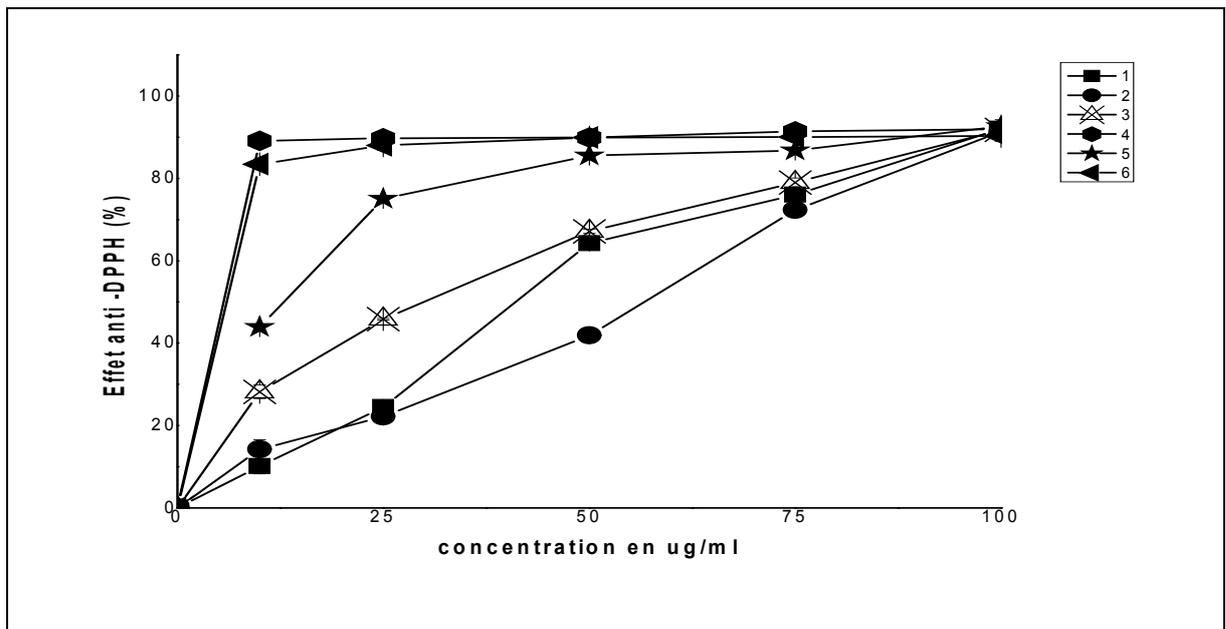


Figure 24: Effet scavenger contre le DPPH des extraits des feuilles de *F. angustifolia* et les standards à différentes concentrations (10,25, 50, 75, 100, µg/ml).

(1)Ethanol ; (2) Acétate d'éthyle ; (3) Aqueux du chloroforme; (4) Quercitine; (5) Acide tannique ;(6) Catéchine

-Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec + l'écartype.

Cependant aucun extrait n'a montré une activité aussi forte que les standards. Cela est dû au fait que les antioxydants de synthèse possèdent une grande aptitude à piéger le radical DPPH d'une part et au phénomène de l'encombrement stérique qui peut masquer l'authentique potentiel antioxydant des extraits de plantes d'autre part.

Tableau XI: Les IC₅₀ des extraits des feuilles et des écorce de *F. angustifolia* et les standards

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Feuilles	Ecorce	standards
Ethanol	49.08	29.11	RUT : 5.19
Acétate d'éthyle	54.05	/	A TAN : 11.90
Aqueux acétate d'éthyle	/	18.41	CAT : 6.24
Aqueux chloroforme	41.01	43.10	

III -3-3. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive non radicalaire ayant tous ses électrons périphériques appariés ; il est plus au moins stable, mais fait l'objet d'une grande préoccupation vu que c'est un redoutable précurseur de radicaux libres (Halliwell, 2000). L'absence de charge à sa surface rend cette espèce réactive très lipophile, c'est pourquoi elle diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. La majeure part de sa toxicité provient essentiellement de sa capacité à générer le radical hydroxyle (Genestra, 2007).

La prédisposition des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène a été évaluée selon la méthode rapportée par Atmani et ses collaborateurs (2009). La réaction se base sur la neutralisation du H₂O₂ par les molécules anti-oxydante se retrouvant dans les extraits, ce qui entraînera sa décomposition en molécule d'eau, selon la réaction suivante :



A la première lecture des résultats illustrés dans la figure 25 et contrairement aux effets des deux premiers tests anti-radicalaires réalisés, discutés précédemment, nous remarquons qu'il n'y a pas une grande diversification dans les valeurs obtenues, en l'occurrence, l'effet anti- H₂O₂ des divers extraits et entre les deux parties de la plante étudiées (feuilles, écorces). Ainsi, tous les extraits (organiques, aqueux, polaires et apolaires) ont exhibé des effets svacengers importants contre le H₂O₂ à 100µg/ml, avec une moyenne d'inhibition de 75%. Le taux le plus élevé est enregistré au niveau de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles (82.69%), ce qui pourrait être attribuée à sa richesse en

composés phénoliques, suivi par les extraits acétate d'éthyle, aqueux de chloroforme et l'extrait hexane de l'écorce qui ne présentent pas d'ailleurs de différence significative ($P < 0,05$) avec un pourcentage d'inhibition de 78%. Le plus faible taux est obtenu par l'extrait chloroforme des feuilles (56.86) (Tableau XII). Ce résultat peut être expliqué par deux suggestions ; soit les molécules responsables de l'activité anti- H_2O_2 sont communes et donc présentes dans tous les extraits ou bien l'effet scavenger de cette espèce réactive n'est pas amplement lié à la structure moléculaire des composés phénoliques, donc elle peut être neutralisée par différentes classes de composés (polaire et apolaires) pourvu que ces derniers soit de bons donneurs d'électrons pour accélérer la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau.

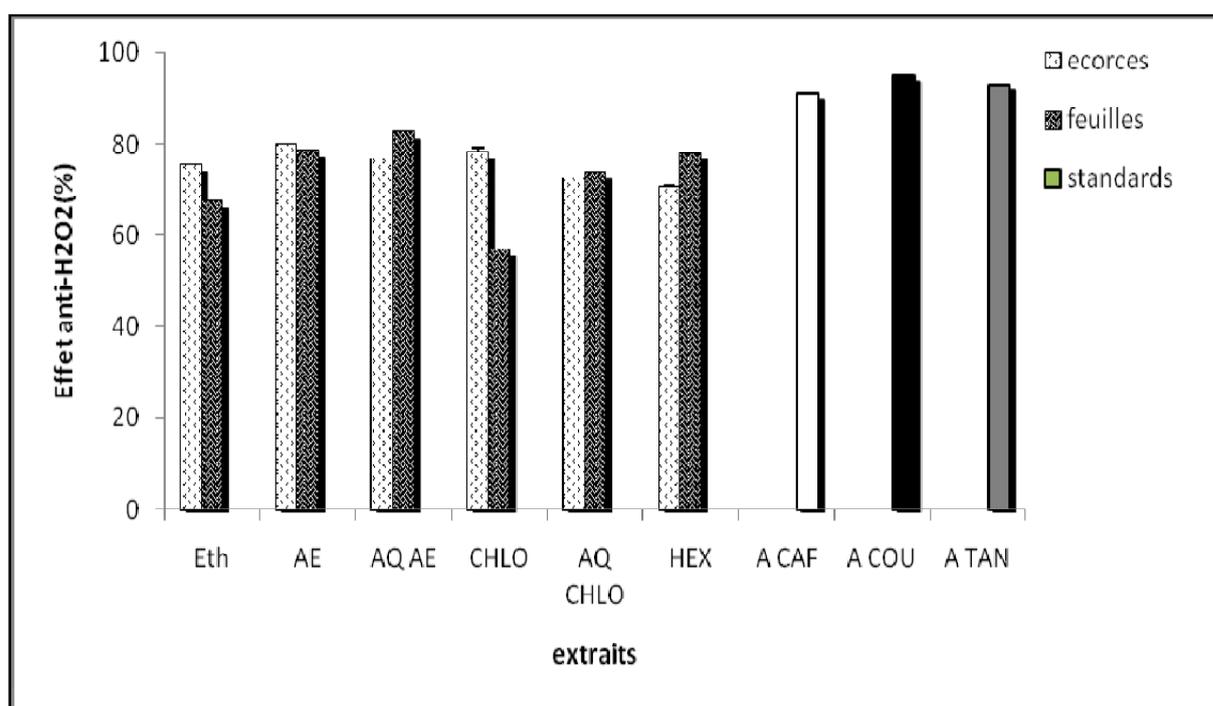


Figure 25: Effet scavenger contre le H_2O_2 des extraits des feuilles et d'écorce de *F. angustifolia* et les standards à $100\mu\text{g/ml}$

Une étude faite par Wang et ses collègues (2007) sur l'activité scavenging du peroxyde d'hydrogène des extraits de l'arachide (légumineuse) qui est connue comme une bonne source d'antioxydants, qui peuvent contribuer à réduire le risque de maladies cardiovasculaires et de certains cancers, a révélé que l'activité de l'extrait éthanolique est de 89,1% mais à la concentration de $500\mu\text{g/ml}$. Les résultats de cette étude s'avèrent plus important que ceux de Atmani et ses collaborateurs (2009) qui montrent que, à une concentration de $100\mu\text{g/ml}$, tous les extraits, à la fois de *Fraxinus angustifolia* et *Pistacia lentiscus* avaient des capacités scavenger modérées allant de 33,83 à 51,05%, et de 22.5 à 75.11% respectivement. Par ailleurs, aucun effet des extraits n'a atteint les effets des

antioxydants de synthèse. Les résultats obtenus pour les standards (Tableau XII) montrent que le pouvoir antiradicalaire le plus élevé a été obtenu avec l'acide coummarique qui a enregistré un taux d'inhibition de 94.94%, tandis que l'acide tannique et l'acide caféique ont présenté des pourcentages d'inhibition de 93.08% et de 91.11%, respectivement.

Tableau XII: Activité anti-radicalaire contre le H₂O₂ à 100µg/ml des extraits de *F. angustifolia* et les standards.

Extraits	Effet scavenger du H ₂ O ₂ (%)		
	Ecorce	Feuilles	standards
Ethanol	75.4	67.36	A TAN : 93.08
Acétate d'éthyle	79.97	78.61a	A COU : 94.94
Aqueux acétate d'éthyle	76.56	82.69	A CAF : 91.11
Hexane	78.28a	72.41	
Chloroforme	73.71	56.86	
Aqueux chloroforme	70.53	78.05a	

- Activité anti-radicalaire contre le H₂O₂ à différentes concentrations

Selon les figures 25 et 26, il en ressort que l'activité scavenger du H₂O₂ augmente avec l'élévation de la concentration des extraits et des standards, c'est-à-dire dose-dépendante. L'extrait acétate d'éthyle des feuilles a exprimé l'effet scavenger le plus important contre ce radical avec une IC₅₀ égale à 51.79 µg/ml, qui ne présente aucune différence significative (P<0,05) par rapport à celle de l'acide coummarique (51.70ug/ml). Des valeurs importantes sont aussi enregistrées pour l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle (52.30 µg/ml) et l'extrait aqueux de chloroforme (57.09 µg/ml), respectivement (Tableau XIII).

Au niveau de l'écorce, l'extrait hexane a affiché la meilleure IC₅₀ (53.42 µg/ml) qui représente un potentiel scavenger significativement supérieur (P<0,05) par rapport à celui de l'acide tannique (IC₅₀=81.91 ug/ml). L'extrait aqueux acétate d'éthyle a montré l'effet antiradicalaire le plus faible avec une IC₅₀ de 64.24µg/ml. On note que l'acide tannique avait un effet de 93.08% à 100µg/ml, significativement supérieur (P<0,05) à l'effet de tous les autres extraits alors qu'il est le moins actif contre le H₂O₂ vu son IC₅₀ élevée. Les résultats obtenus prouvent qu'il est plus fiable de comparer les effets en terme d'IC₅₀ que selon les résultats des tests à 100ug/ml.

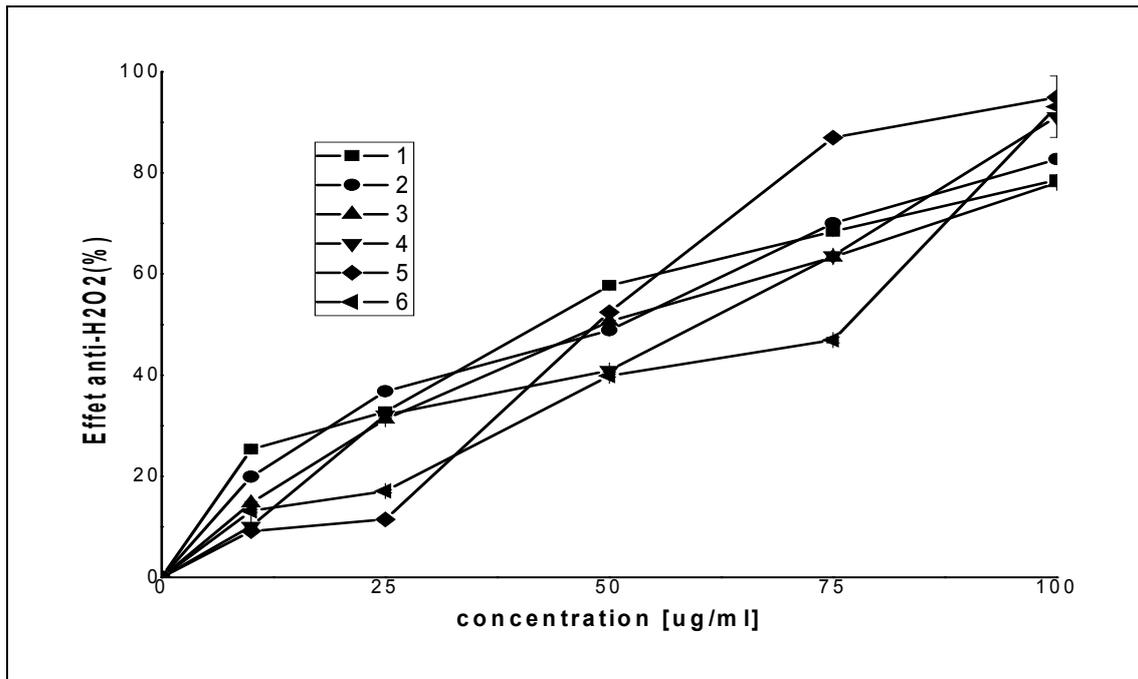


Figure 26: Effet scavenger contre le H₂O₂ des extraits des feuilles de *F. angustifolia* et les standards à différentes concentrations (10,25, 50, 75, 100, µg/ml). (1)Acétate d'éthyle ; (2) Aqueux d'acétate d'éthyle ; (3) Aqueux du chloroforme ; (4) acide caféique ; (5) acide coumarique ;(6) Acide tannique

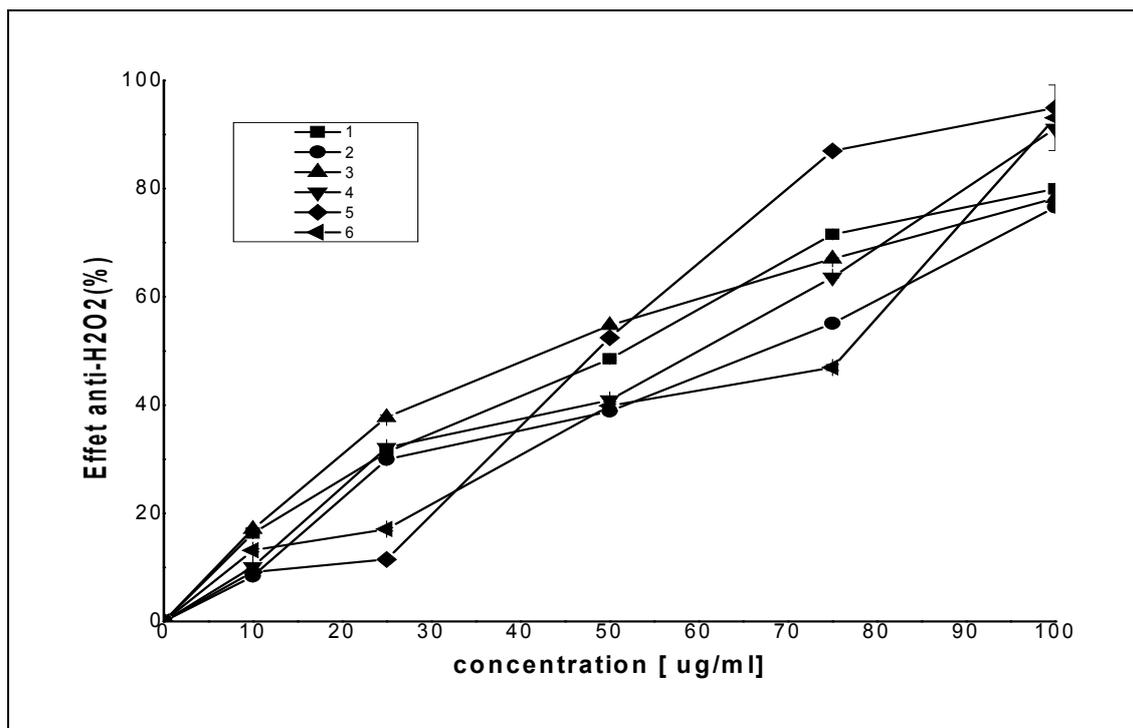


Figure 27: Effet scavenger contre le H₂O₂ des extraits des écorces de *F. angustifolia* et les standards à différentes concentrations (10,25, 50, 75, 100, µg/ml). (1) Acétate d'éthyle ; (2) Aqueux d'acétate d'éthyle ; (3) Hexane ; (4) acide caféique ; (5) acide coumarique ;(6) Acide tannique

Tableau XIII: les IC₅₀ des extraits des feuilles, des écorces de *F. angustifolia* et les standards

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Feuilles	Ecorce	standards
Acétate d'éthyle	51.79a	54.36	A COU : 51.70a
Aqueux acétate éthyle	52.30	64.24	A TAN : 81.91
Hexane	/	53.42	A CAF : 55.37
Aqueux chloroforme	57.09	/	

D'après les résultats des différentes activités anti-radicalaires des extraits de *F.angustifolia* vis-à-vis des radicaux utilisés dans cette étude, les IC₅₀ qui expriment le potentiel antiradicalaire le plus important ont été obtenues contre le radical DPPH par les extraits d'écorce, ce qui pourrait être dû à la stabilité du radical, la simplicité du protocole expérimental et la nature du milieu réactionnel (Wu et *al.*, 2007) et la richesse de cette partie de la plante en molécules douées d'activité antioxydant.

III -4. Etude chromatographique des fractions

Ce type d'analyse a été entrepris dans l'objectif d'obtenir plus de données sur la nature et le contenu des extraits de cette plante en composés phénoliques responsables de chaque activité, après leur évaluation quantitative dans la partie précédente.

Le dispositif de la chromatographie sur colonne contient essentiellement une matrice poreuse qui est traversée par l'échantillon, la phase mobile y progresse par gravité ou sous l'action d'une différence de pression. Les différents composants traversent la colonne à des vitesses variables et les fractions sont collectées dans une série de tubes (Eckert et *al.*, 1999)

Quatre fractions ont été recueillies progressivement avec une élution de polarité croissante : chloroforme, acétate d'éthyle- méthanol, méthanol et enfin méthanol/acide acétique

III -4-1. Activité scavenging des fractions sur le radical hydroxyle

La figure 28 montre l'effet anti-radicalaire contre le OH des quatre fractions récupérées sur colonne à la concentration de 100µg/ml. Pour les trois extraits des feuilles, l'activité anti-OH s'est révélée essentiellement au niveau des deux premières fractions ; les fractions chloroformiques (F₁) et les fractions mixtes (F₂) avec une nette distinction pour ces dernières (figure 28 (A)). En effet, la F₂ de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle a enregistré le taux d'inhibition le plus élevé avec une valeur de 61.89%, supérieur à celui du standard et à celui de son extrait natif (58.18%), suivi par la F₂ de l'extrait éthanolique avec un taux de 54,63%. L'extrait acétate d'éthyle a présenté deux fractions F₁ et F₂ moyennement actives avec des taux respectifs de 35.47 et 50.68% (Tableau XIV). Ce résultat nous permet de déduire que la majeure partie des molécules responsables de l'effet anti-OH des feuilles sont de nature polaire, puisqu'elles ont été éluées par un système polaire (méthanol/acétate d'éthyle), probablement des flavonoïdes qui sont connus pour leurs capacité de chélation des métaux et leur activité scavenging du radical OH· (Morel et *al.*, 1994).

Pour les extraits de l'écorce (figure 28 (B)) ce sont les fractions chloroformiques (F₁) qui exhibent l'activité la plus élevée avec une moyenne de 56% égale à la moyenne de leurs extraits natifs (56.44%), suivi par la F₂ de l'extrait éthanolique qui a exprimé un effet de 35.63% (Tableau XV). Cela peut être expliqué par le fait que les molécules qui sont responsables de cette activité au niveau de l'écorce, sont de nature moins polaire, d'où leur tendance à être éluées dans le premier solvant de fractionnement (chloroforme).

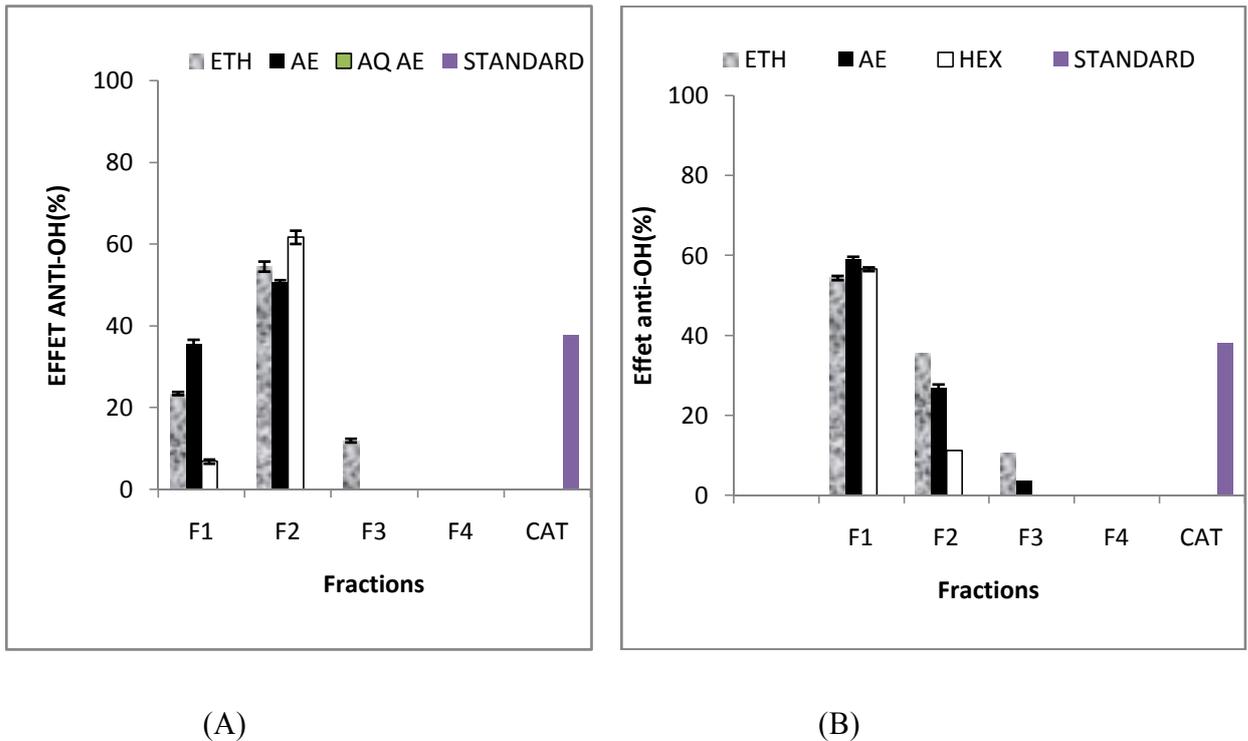


Figure 28: Effet scavenger contre le OH[•] des fractions des extraits ;(A) : éthanolique, aqueux d'acétate d'éthyle et acétate d'éthyle des feuilles, (B) : éthanolique, acétate d'éthyle et hexane de l'écorce de *F. angustifolia* et le standard à 100ug/ml

Tableau XIV : Effet scavenger contre le OH[•] des fractions des extraits des feuilles de *F. angustifolia* et le standard à 100ug/ml

Extraits	Effet scavenger contre le OH (%)				
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	catéchine
Ethanol	23.56	54.63	12.05	ND	37.85
Acétate d'éthyle	35.47	50.7	05.46	ND	
Aqueux acétate éthyle	6.89	61.8	ND	ND	

Tableau XV: Effet scavenger contre le OH[•] des fractions des extraits d'écorces de *F. angustifolia* et le standard à 100ug/ml

Extraits	Effet scavenger contre le OH (%)				
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	catéchine
Ethanol	54.48	35.63	10.56	ND	37.85
Acétate d'éthyle	59.12	26.89	3.56	ND	
Hexane	56.61	11.24	ND	ND	

III -4-2. Activité scavenging des fractions sur le radicale DPPH

Selon la figure ci-dessous, on remarque que l'activité anti-DPPH s'est concentrée au niveau des fractions mixtes des extraits des deux parties de la plante où de puissants effets scavengers contre le radical DPPH ont été enregistrés à 100µg/ml. Pour les feuilles, (figure 29 (A)), les fractions F₂ des extraits éthanolique et acétate d'éthyle ont présenté les meilleures activités avec des taux de 86.19% et 88.06%, respectivement, suivi par la fraction F₂ de l'extrait aqueux de chloroforme avec une activité de 80.80%. Cependant, les autres fractions ont exhibé des activités insignifiantes avec des taux allant de 7.83% à 11.63%, (Tableau XVI).

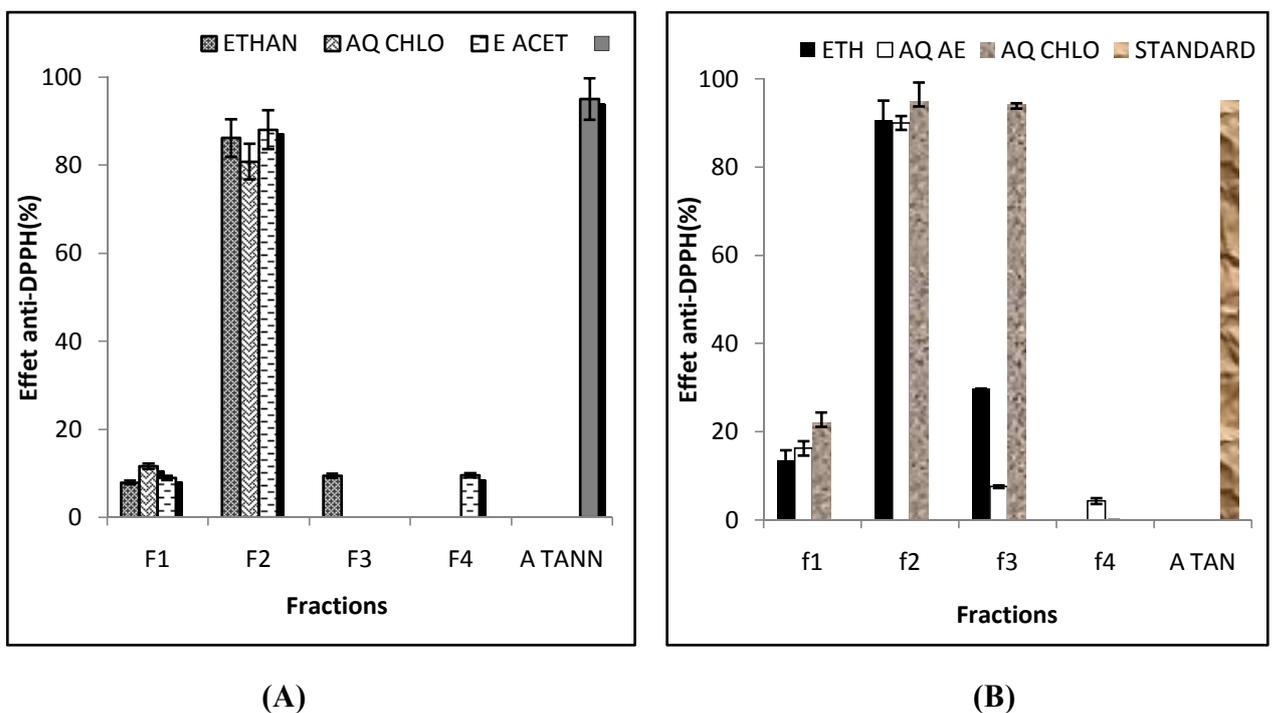


Figure 29: Effet scavenger contre le DPPH des fractions des extraits : (A) : éthanolique, aqueux de chloroforme et acétate d'éthyle des feuilles. (B) : éthanolique, aqueux de chloroforme et aqueux d'acétate d'éthyle des écorces de *F. angustifolia* et le standard à 100ug/ml

Des résultats semblables ont été obtenus pour les extraits d'écorce (figure 29 (B)), où les fractions F₂ des extraits aqueux d'acétate d'éthyle et éthanolique exhibent une activité d'environ 90%. L'extrait aqueux de chloroforme a présenté deux fractions très actives: la fraction mixte (F₂) avec un pourcentage d'inhibition de 94,75% similaire à celui de l'acide tannique (95.05%) (P<0,05), aussi, pour la première fois, la fraction méthanolique (F₃) avec un effet scavenger de 92.32%. Le reste des fractions ont exhibé des activités faibles qui ne dépassaient pas 25% (Tableau XVII).

Tableau XVI: Effet scavenger contre le DPPH des fractions des extraits des feuilles de *F. angustifolia* et le standard à 100µg/ml

Extraits	Effet scavenger contre le DPPH (%)				
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	A TAN
Ethanol	7.93	86.19	9.47	ND	95.05
Acétate d'éthyle	8.99	88.09	ND	ND	
Aqueux chloroforme	11.63	80.8	ND	ND	

Tableau XVII: Effet scavenger contre le DPPH des fractions des extraits d'écorces de *F. angustifolia* et le standard à 100µg/ml

Extraits	Effet scavenger contre le DPPH (%)				
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	A TAN
Ethanol	13.59	90.66	24.69	ND	95.05
Aqueux acétate 'éthyle	16.27	90.01	7.55	3.31	
Aqueux chloroforme	22.14	94.75	92.32	ND	

III -4-3. Activité scavenging des fractions sur le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

La figure 30 illustre l'effet anti-radicalaire contre le H₂O₂ des quatre fractions récupérées sur colonne à la concentration de 100µg/ml, la première remarque est que la position des fractions actives diffère d'un extrait à un autre dans la même partie de la plante, contrairement à l'activité anti-OH et anti-DPPH où la même fraction prédomine au niveau des trois extraits. Ce résultat confirme l'explication donnée auparavant (page 65) concernant l'implication d'au moins deux groupes de composés phénoliques de polarité différente dans l'activité scavenger du H₂O₂ des extraits testés.

Ainsi, les taux les plus élevés sont enregistrés au niveau de la fraction mixte (F₂) de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et des fractions chloroformiques (F₁) des extraits acétate d'éthyle et hexane de l'écorce avec des valeurs respectives de 82.24% et 80.69%, plus importantes que celles de leurs extraits natifs (figure30(B)). Du côté des feuilles, on remarque particulièrement l'apparition de deux fractions actives pour l'extrait acétate d'éthyle avec des taux d'inhibition de 73.54% et 56.00%, sinon la concentration de l'activité s'est observée encore au niveau des fractions mixtes des extraits aqueux (figure30(A)).

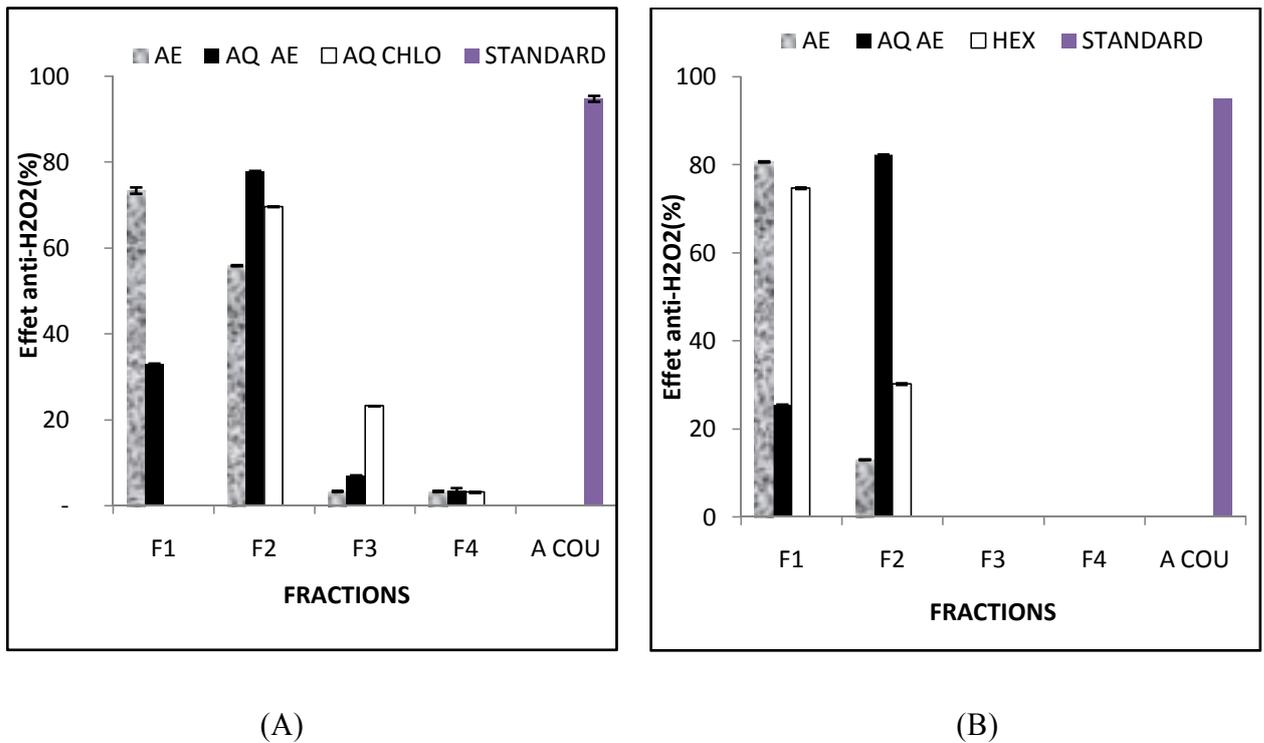


Figure 30: Effet scavenger contre le H₂O₂ des fractions des extraits ; (A) : acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme des feuilles, (B) : acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle et hexane de l'écorce de *F. angustifolia* et le standard à 100µg/ml

Tableau XVIII Effet scavenger contre le H₂O₂ des fractions des extraits des feuilles de *F. angustifolia* et le standard à 100µg/ml

Extraits	Effet scavenger contre le H ₂ O ₂ (%)				
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	A COU
Acétate d'éthyle	73.54	56.00	3.46	3.47	94.94
Aqueux acétate 'éthyle	33.00	77.97	7.15	3.50	
Aqueux chloroforme	ND	69.74	23.30	3.25	

Tableau XIX: Effet scavenger contre le H₂O₂ des fractions des extraits d'écorces de *F. angustifolia* et le standard à 100µ/ml

Extraits	Effet scavenger contre le H ₂ O ₂ (%)				
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	A COU
Acétate d'éthyle	80.69	13.11	ND	ND	94.94
Aqueux acétate 'éthyle	25.44	82.24	ND	ND	
Hexane	74.76	30.28	ND	ND	

L'activité anti-radicalaire est concentrée essentiellement au niveau de la fraction mixte (F₂) récupérée par un mélange de solvants polaires (acétate d'éthyle/méthanol). Cette donnée confirme que la majeure partie des composés phénoliques de *F.angustifolia* (notamment pour les extraits des feuilles où cette fraction a prédominé dans les trois tests) responsables de ces activités sont de nature polaire. Ils peuvent être soit : des flavonoïdes, des tannins, des acides phénoliques ou un mélange de ces derniers (Tableau III), néanmoins ce résultat nous ne permet pas de déduire si la composition de ces fractions (F₂ des feuilles et F₂ de l'écorce) est la même.

Les fractions chloroformiques (F₁), notamment celles des extraits de l'écorce, ont également affiché de très bons résultats, comme lors du test de H₂O₂. Ce résultat indique qu'en plus d'un groupe de composés polaires élués par le système 2, les extraits de *F.angustifolia* renferment un autre groupe de composés phénoliques à polarité inférieure, qui sont probablement des tannins condensés et qui contribuent considérablement à l'activité antioxydant de cette plante. Cette explication est consolidée par le fait que, parfois, il y a une synergie et l'effet anti-radicalaire se réalise par les deux groupes à la fois et s'est ce qui se traduit par la présence de deux fractions actives au sein du même extrait. Dans ce sens, on note que, généralement, ce sont les deux extraits éthanolique et acétate d'éthyle qui ont cette particularité. Ça s'expliquerait par le fait que le premier est l'extrait brut, donc il contient les différentes classes de composés et pour le deuxième, sa polarité moyenne lui permet d'être riche en flavonoïdes, en tannins et en phénols simples en même temps, conformément aux résultats du dosage.

En comparant les résultats de l'activité anti-H₂O₂ à ceux de l'activité anti-OH, nous avons remarqué que les fractions actives communes entre ces deux activités ont affiché nettement le même profil, avec des différences dans les taux d'inhibition respectifs. Ainsi, à partir des deux figures 28(A) et 30(A), il en ressort que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles a exprimé dans les deux tests, une F₂ très active avec une F₁ inférieure. Les extraits d'acétate d'éthyle et hexane de l'écorce ont aussi démontré le même profil dans les deux cas mais avec une F₁ majoritaire et une F₂ moindre (figures 28(B) et 30(B)). Cette comparaison nous permet de déduire que ces deux radicaux sont inhibés par les mêmes composés au niveau de ces extraits et vu que le H₂O₂ est le précurseur de l'hydroxyle, il est aisé de conclure que l'un des modes d'action de l'activité anti-OH de *F.angustifolia* est l'inhibition de la formation de ce dernier en neutralisant au préalable le H₂O₂. Par ailleurs, vu l'existence de fractions communes (les F₂ particulièrement) entre les activités anti-DPPH et OH et sachant que les composés polaires agissent sur le DPPH en le réduisant directement (par donation de proton),

l'hypothèse que ces fractions agissent via le OH de la même façon est vraisemblablement juste, donc l'autre voie plausible de l'inhibition est le piégeage de OH directement.

La distinction de la fraction méthanolique (F₃) qui est apparue exclusivement au niveau de l'extrait aqueux de chloroforme de l'écorce lors du test de DPPH peu être attribué à son état de pureté (qualité) et sa concentration (quantité). Cette donnée indique que ce composé est doué d'un très bon effet scavenger et qu'il est propre à l'écorce.

A la fin, l'apparition parfois de fractions plus actives que l'extrait dont elles sont issues peut être commentée par le phénomène de l'encombrement stérique qui masque le vrai potentiel antioxydant des extraits natifs.

Dans l'ensemble, l'activité antiradicalaire contre les trois radicaux DPPH, OH et H₂O₂, montre que les fractions issues des extraits d'écorce sont plus actives que celles provenant des extraits des feuilles, ce qui s'explique soit par la richesse de cette partie de la plante en composés phénoliques doués d'activité anti-radicalaire ou bien par la qualité de ses composés. Le solvant acétate éthyle semble être le plus adéquat pour l'extraction des composés actifs de *Fraxinus angustifolia*.

III -5. Chromatographie sur couches minces

Afin de caractériser partiellement les différentes fractions actives des extraits de *Fraxinus angustifolia*, une chromatographie sur couches minces (CCM) a été réalisée. Le système utilisé est composé d'un mélange : acétate éthyle, acide formique, acide acétique, eau avec les rapports (100 :11 :11 :26, v/v/v/v) (Andriambelson et *al.*, 1998), un système conçu pour la séparation des composés phénoliques. En effet ce système de polarité importante permis de donner une bonne séparation au niveau des fractions polaires et exerce une hydrolyse acide modérée sur les composés contenus dans les dépôts sous l'effet de l'acide acétique et de l'acide formique. La révélation est effectuée avec la vanilline sulfurique.

Par ailleurs, l'utilisation de la chromatographie sur couche mince nous a permis, non seulement, la caractérisation des différentes fractions, mais aussi elle présente l'avantage de mettre en évidence l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH en visualisant directement les fractions responsables de cet effet sous forme de taches jaunes.

III -5-1. Caractérisation des fractions des extraits de feuilles

Selon la figure 31, la comparaison des chromatogrammes des fractions des trois extraits de feuilles de *F. angustifolia* indique qu'elles ont été bien séparées et sont caractérisées par des profils chromatographiques identiques en révélant quatre sous-fractions bien distinctes pour chacune (SF₁, SF₂, SF₃ et SF₄). Les SF₁ sont apparues un peu plus au niveau des fractions issues des extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle. Elles n'ont pas migré loin et se sont positionnées juste après la ligne de dépôt et peuvent correspondre à des formes complexes de composés phénoliques. En estimant leur RF et leur couleur à la lumière du jour, nous avons remarqué que les composés représentés en SF₂ ont donné une couleur jaune similaire à celle de la rutine utilisée comme standard et partage avec cette dernière le même RF. Dans leur récente étude, Kostova et Iossifova (2007) ont isolé la rutine au niveau des feuilles de cette plante, ce qui est en accord avec les résultats de cette présente étude. La troisième série de composés (SF₃) présente des taches claires, ce qui peut être dû à leur faible concentration. Leur RF correspond à celui du premier dérivé issu de l'hydrolyse acide de l'acide tannique. En fait, le système de séparation (Acétate d'éthyle- Acide formique- Acide acétique- Eau) que nous avons appliqué exerce, selon Andriambelson et ses collègues (1998), une hydrolyse acide sur les formes complexes telles que les tannins (tannins hydrolysables), permettant ainsi la migration des unités issues de cet effet. Enfin, le RF et la couleur des SF₄ sont similaires à ceux du troisième dérivé de l'acide tannique ainsi qu'à celui de l'acide gallique utilisé comme standard sur la même plaque.

La pulvérisation de la solution du DPPH sur la plaque contenant les fractions a montré des taches de décoloration au niveau de toutes les sous-fractions observées à la lumière du jour. On remarque que la décoloration est légèrement plus intense au niveau de celles issues des fractions des deux extraits éthanolique et acétate d'éthyle, particulièrement pour les SF₂ qui correspondent à la rutine. Quoique la CCM soit une méthode d'analyse qualitative et non quantitative, cette observation nous permet de déduire que les extraits polaires en sont plus riches que les autres. Les taches de la décoloration T₁, T₂, T₃ et T₄ (figure 32) témoignent donc de la propriété anti-radicalaire des sous-fractions F₁, F₂, F₃ et F₄ révélées à la lumière du jour.

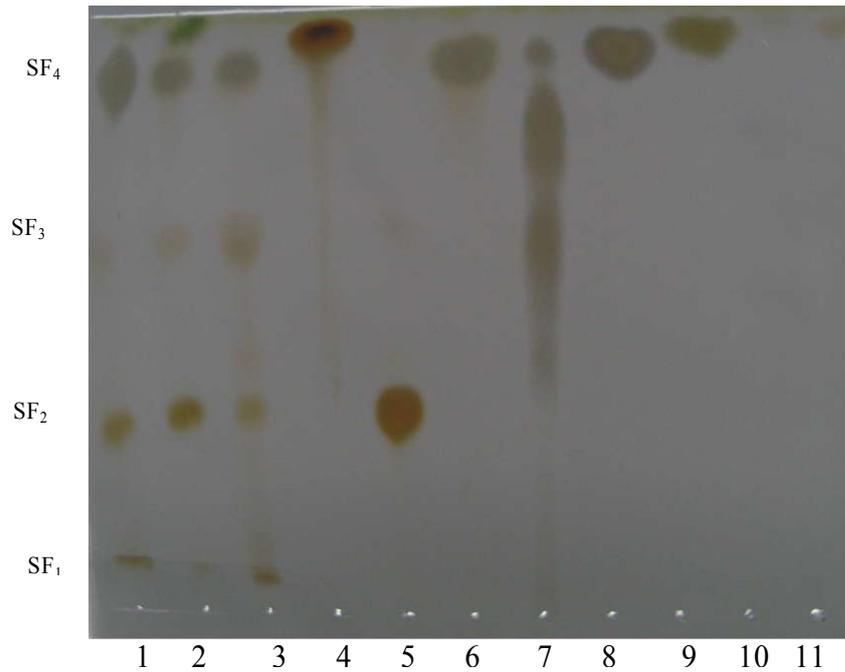


Figure 31. Chromatogrammes des fractions anti-DPPH de feuilles de *F. angustifolia* à la lumière du jour 1) F₂ de l'extrait éthanolique. 2) F₂ de l'extrait d'acétate d'éthyle. 3) F₂ de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle. 4) Quercétine. 5) Rutine. 6) Acide gallique 7) Acide tannique. 8) Catéchine 9) Acide caféique. 10) acide cinnamique. 11) acide coumarique

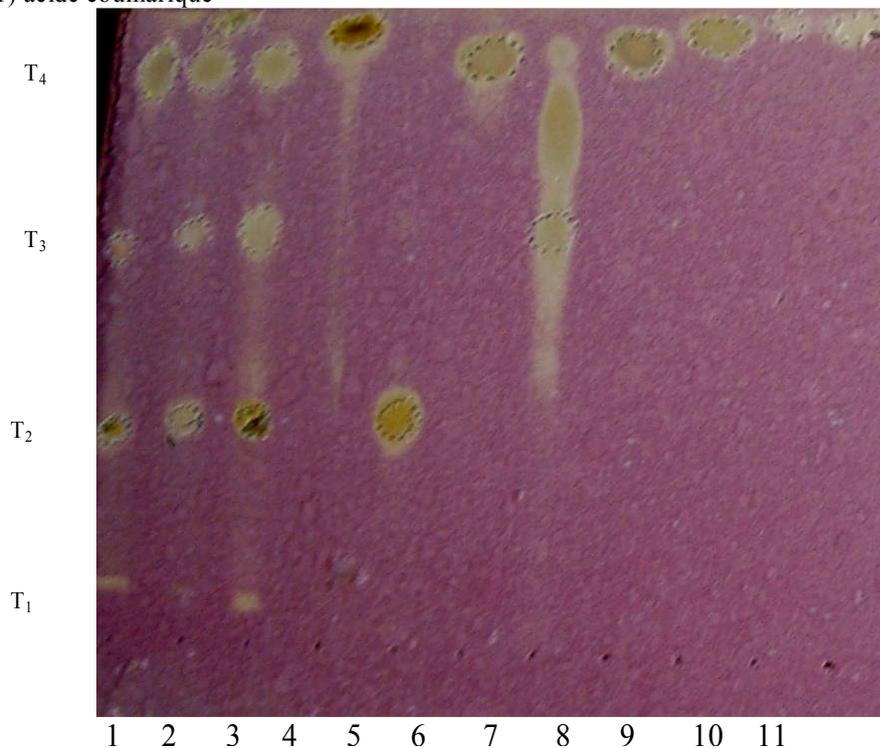


Figure 32. Chromatogrammes des fractions de feuilles de *F. angustifolia* pulvérisées par la solution DPPH 1) F₂ de l'extrait éthanolique. 2) F₂ de l'extrait d'acétate d'éthyle. 3) F₂ de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle. 4) Quercétine. 5) Rutine. 6) Catéchine 7) Acide tannique. 8) Acide gallique 9) Acide caféique. 10) Acide cinnamique. 11) Acide coumarique

La révélation avec la vanilline sulfurique des chromatogrammes de toutes les fractions actives (F₁ et F₂) de feuilles de *F. angustifolia* a permis de mettre en évidence d'autres

composés qui ne sont pas visibles à la lumière du jour. La figure suivante (33) révèle la présence de six sous-fractions ayant des couleurs différentes, concentrées majoritairement dans les fractions mixtes, ce qui confirme la richesse de ces dernières en divers composés. En effet, les profils des fractions F₂ des extraits : éthanolique, acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme apparaissent identiques en révélant quatre sous-fractions chacune, la SF₁ et SF₂ qui n'ont pas migré, pourraient correspondre à des composés à haut poids moléculaire (Andriambelason et *al.*, 1998) outre que les tannins hydrolysables, vu que ces derniers donnent une couleur rouge foncée avec la vanilline sulfurique (Mueller-Harvey ; 2001). La coloration verte indique la présence du sucre, en particulier le mannose (Wichtl et Anton 2003). La SF₃ ne s'est pas bien fractionnée, elle s'est étalée sur plusieurs centimètres, donnant une apparence de couleur marron qui indique la présence de tannins. La révélation confirme la présence de la rutine ou l'un de ces dérivés (SF₄). Les fractions chloroformiques F₁ des extraits éthanol et acétate d'éthyle ne partagent avec les F₂ qu'une seule sous-fraction (SF₅) d'une couleur rouge similaires aux propriétés de la catéchine (standard), conformément aux données de Mueller-Harvey (2001) mais leur RF est différent, cela peut être expliqué par le fait qu'un composé présent dans un mélange complexe, acquiert des propriétés différentes de celles du même composé pure. En fin, les SF₆ propres aux F₁ reflètent la présence des composés actifs polaires, vu leur RF qui est presque égale à 1.

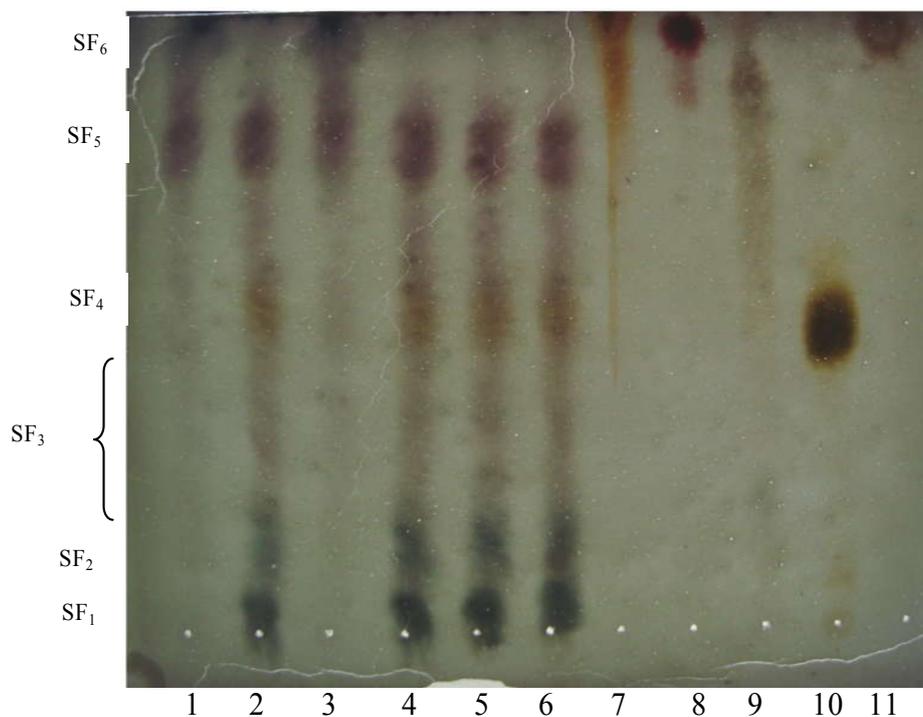


Figure 33. Chromatogrammes de toutes les fractions actives de feuilles de *F. angustifolia* révélées par la vanilline sulfurique. 1) F₁ de l'extrait éthanolique. 2) F₂ de l'extrait éthanolique. 3) F₁ de l'extrait d'acétate d'éthyle. 4) F₂ de l'extrait d'acétate d'éthyle. 5) F₂ de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle. 6) F₂ de l'extrait aqueux de chloroforme. 7) Quercétine. 8) Catéchine. 9) Acide tannique. 10) rutine. 11) Acide gallique

III -5-2. Caractérisation des fractions des extraits d'écorce

L'application du système d'éluion sur les fractions de l'écorce de *F. angustifolia* a démontré des résultats intéressants en développant des chromatogrammes avec des séries de six sous-fractions au niveau des F₂ des extraits ; éthanolique, aqueux d'acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme simultanément. Observés après pulvérisation avec la solution de DPPH (figure 34), les sous-fractions ont manifesté des taches de décoloration bien distinctes, particulièrement intense au niveau des T₃, T₄ et T₅. La fraction méthanolique de l'extrait aqueux de chloroforme (F₃) a présenté une seule tache (T₇) qui a la même couleur et le même RF que la Quercétine.

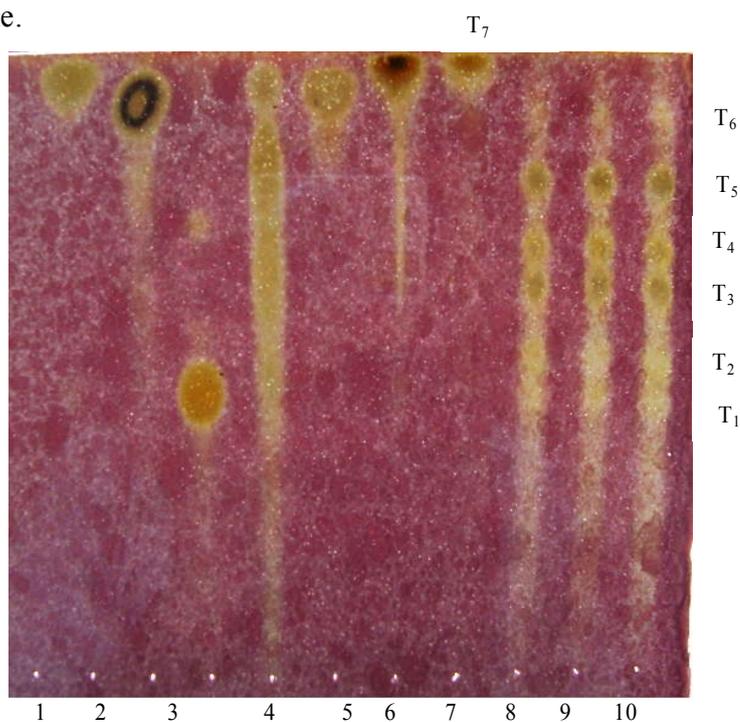


Figure 34. Chromatogrammes des fractions anti-DPPH de l'écorce de *F. angustifolia* pulvérisés par la solution DPPH. 1) Acide caféïque. 2) Acide gallique. 3) Rutine. 4) Acide tannique. 5) Catéchine. 6) Quercétine. 7) F₃ de l'extrait aqueux de chloroforme. 8) F₂ de l'extrait aqueux de chloroforme. 9) F₂ de l'extrait aqueux de l'acétate d'éthyle. 10) F₂ de l'extrait éthanolique.

La révélation avec la vanilline sulfurique a dévoilé des SF claires, ce qui peut être dû à la faible concentration des composés actifs dans la fraction de l'écorce. Dans l'ensemble, les F₂ ont montré trois sous-fractions de couleur différentes ; la SF₁ de couleur jaune avec le même RF que la rutine (figure 35). Par ailleurs les fractions chloroformiques (F₁) ne se sont pas bien séparées dans ce système, représentant ainsi des SF₁ sur le lieu de dépôt, qui correspondent à des formes très complexes de composés phénoliques tels que les tannins condensés (figure 36). Ce résultat n'est pas affirmatif sur la richesse de l'écorce en divers composés, en sachant que, l'application d'autres solvants et d'autres révélateurs permettront

d'obtenir d'autres profils chromatographiques et révéleront d'autres molécules qui ne sont pas séparés par ce système.

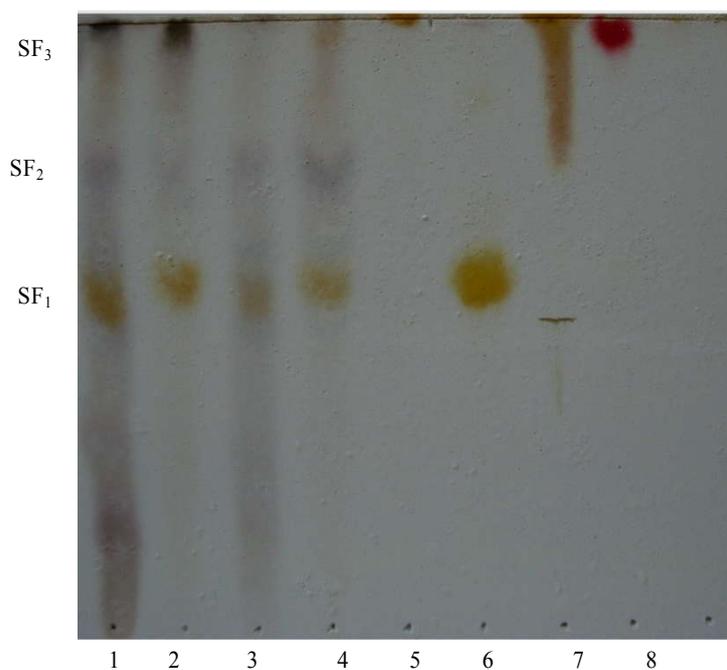


Figure 35. Chromatogrammes des fractions mixtes de l'écorce de *F. angustifolia* révélées par la vanilline sulfurique 1) F₂ de l'extrait éthanolique. 2) F₂ de l'extrait d'acétate d'éthyle. 3) F₂ de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle. 4) F₂ de l'extrait aqueux de chloroforme. 5) F₃ de l'extrait aqueux de chloroforme. 6) Rutine. 7) Acide tannique. 8) Quercétine.

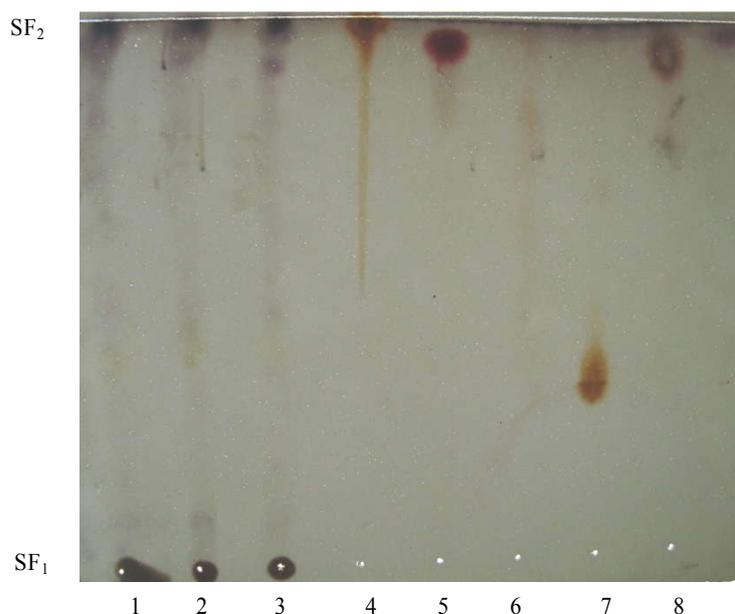


Figure 36. Chromatogrammes des fractions chloroformiques de l'écorce de *F. angustifolia* révélées par la vanilline sulfurique 1) F₁ de l'extrait éthanolique. 2) F₁ de l'extrait d'acétate d'éthyle. 3) F₁ de l'extrait hexane. 4) Quercétine. 5) catéchine. 6) Acide tannique. 7) Rutine. 8) Acide gallique.



IV- Conclusion et perspectives



Les plantes médicinales sont considérées depuis des siècles comme une source majeure des substances à propriétés thérapeutiques. Les principes actifs d'origine végétale découverts jusqu'à présent ont prouvé leur conformité par leur efficacité et l'absence d'effets secondaires. Ces avantages offerts par ces composés ne cessent d'attirer l'intérêt de plusieurs groupes de chercheurs pour découvrir encore d'autres principes, notamment à partir des plantes endémiques peu ou pas étudiées.

Dans le présent travail, on s'est intéressé aux effets anti-radicalaires des extraits de *Fraxinus angustifolia*, une plante utilisée localement comme remède contre de nombreuses pathologies à caractère inflammatoire. Trois aspects ont été visés, à savoir : l'étude des effets anti-radicalaires des extraits contre le OH, le DPPH et le H₂O₂, l'étude des effets anti-radicalaires des fractions chromatographiques issues des extraits qui ont donné des taux d'inhibition élevés et la caractérisation de ces fractions par l'utilisation de la CCM.

Le résultat de dosage des extraits fait ressortir des taux différents dont le plus riche en phénols totaux et en flavonoïdes avec des valeurs respectives de 249.01 mg Eq Cat/g d'extrait et 169.53 mg Eq rut/g d'extrait, est l'extrait acétate d'éthyle des feuilles et le plus riche en tannins est l'extrait éthanolique de l'écorce (990.4 mg Eq Atan/g d'extrait).

Les extraits de *Fraxinus angustifolia* ont été testés pour leur activité anti-radicalaire contre le OH. À la concentration de 100µg/ml, l'extrait éthanolique des feuilles a donné la meilleure activité (65,68%, IC₅₀=79,76µg/ml), plus élevée que celle des standards dont le meilleur (catéchine) a enregistré un taux de 37,85%. Les résultats indiquent la présence d'une bonne corrélation entre l'activité testée et les teneurs des extraits en composés phénoliques suggérant l'implication de ces derniers dans cet effet.

L'évaluation de l'activité anti-DPPH à la concentration de 100µg/ml a prouvé que les extraits de l'écorce manifestent des effets très importants, supérieurs à 94%, notamment au niveau de l'extrait éthanolique, aqueux acétate d'éthyle et aqueux du chloroforme avec des IC₅₀ de 29,11 µg/ml , 18,41µg/ml et 43,10 µg/ml, respectivement.

Les résultats du test anti-H₂O₂ indiquent que tous les extraits exhibent une haute activité au voisinage de 70% à une concentration de 100 µg/ml. L'extrait acétate d'éthyle des feuilles a exprimé l'effet scavenger le plus important contre ce radical avec une IC₅₀ égale à 51,79 ug /ml, alors que celle de l'extrait hexane de l'écorce est de 53,42 µg/ml.

L'utilisation de la chromatographie sur colonne a permis de révéler deux fractions actives ; des F₂ polaires éluées par le mélange acétate d'éthyle/méthanol, constituées probablement de flavonoïde et de phénols simples et les F₁ moins polaires éluées par le chloroforme, composées éventuellement de tannins. Ce résultat nous a permis de conclure que les extraits de *Fraxinus angustifolia* exercent l'effet anti-radicalaire via deux groupes de composés phénoliques à polarité différente. Aussi, l'ensemble des résultats montre que les fractions issues des extraits d'écorce sont plus actives que celles provenant des extraits de feuilles.

L'analyse de ces fractions sur CCM a montré que l'effet anti-radicalaire serait probablement dû à la présence de la rutine et des dérivés de l'acide tannique pour les F₂ des extraits de feuilles et à la rutine et la quercétine au niveau des F₂ et F₃ des extraits de l'écorce. Les F₁ de l'écorce ont montré la présence de molécules complexe à haut poids moléculaire douées d'un important pouvoir anti-radicalaire qui restent à identifier et à exploiter dans le domaine thérapeutique.

Un tel résultat témoigne la richesse de ces extraits en divers composés et met en valeur les diverses applications thérapeutiques de *F. angustifolia*. Néanmoins, les résultats obtenus dans cette étude restent préliminaires et des études complémentaires approfondies sont envisagées et se résument dans les points suivants:

- Isolement et caractérisation des composés actifs dans ces fractions par des méthodes plus spécifiques,
- Evaluation de l'effet antioxydant *in vitro* des fractions en utilisant d'autres techniques
- Pour obtenir une vue globale sur l'activité antioxydant de *F. angustifolia*, une étude *in vivo* est souhaitable, partant du fait qu'une substance pouvant être très active *in vitro*, peut perdre cette activité une fois pénétrée dans le corps, et vice versa.

V- Références bibliographiques

- Amic, D., Davidonic-Amic, D., Beslo, D. and Trinajstic, N. (2003). Structure Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta*.76(1):55-61.
- Andriambelson, E.; Magnier, C.; Hann-Archipoff, G.; Lebestien, A.; Anton, R.; Bertz, A.; Stoclet, J. C.; and Andriansitohaina, R. (1998) .Natural dietary polyphenolic compound cause endothelium-dependent vasorelaxtion in rat thoracic aorta. *The Journal of Nutrition*, 128:2324-2333.
- Atmani, D. ; Chaher, N. ; Berboucha ,M .; Ayouni, K .; Lounis, H .; Boudaoud, H .; Debbache, D .; and Atmani .D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*. 112: 303–309
- Babior, B. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*.18: 42-47.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; and Samman, S. (2005). Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 46: 752-761.
- Balin, A.K and Vilenchik, M. (2007). Oxidative Damage. *The Sally Balin Medical Center*. P: 301-310.
- Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt cardio*. 2(1) : 43-52.
- Beani, J. C. (1995) Actions biologiques du rayonnement solaire sur la peau. *Rev Int Péd*. 259:2-7.
- Beaudeau, J-L., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, D and Legrand, A. (2006b). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. *Ann Pharm Fr*. 64: 373-381.
- Beckman, K. B. and, Ames, B. N. (1998).The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 78: 547-581.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*. 13 (2), p. 184-196.
- Berger, M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 48-53.
- Bonnefont-Rousselot, D., Beaudeau, J.L., Théron, P., Peynet, J., Legrand, A and Delattre, J. (2004). Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Annales Pharmaceutique Françaises* .62 :147-157.
- Bossokpi, I.P.L. (2003). Etude des activités biologiques de *fagara zanthoxyloides Lam* (Rutaceae). *Thèse doctorat, université de Bamako*, p : 8-10.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation Lavoisier*, 3 : 286-347.

- Bruneton, J., (1999).composés phénoliques. In *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. (3^{ème} édition), Technique et Documentation Lavoisier. Paris : 228-387.
- Cacace, J. E. and Mazza, G. (2001). Extraction à l'eau sulfurée des anthocyanines et d'autres composés phénoliques du cassis. *Agriculture et Agroalimentaire Canada*, 12: 1-15.
- Cai, Y. Z.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q.; and Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 2872-2888.
- 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.
- Chami, F. (2005). Evaluation de l'Action Antifongique des Huiles Essentielles d'Origan et de Girofle et de leurs Composés Majoritaires in vivo. Application dans la Prophylaxie et le Traitement de la Candidose Vaginale sur des Modèles de Rat et de Souris Immunodéprimés. *Thèse doctorat : Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Maroc*. p. 27-28.
- Chen, J-W., Zhu, Z-Q., Hu, T-X et Zhu, D-Y. (2002). Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects. *Acta Pharmacol.*23 (7):667-672.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal Clinical Nutrition*, 81: 223–229.
- Chira, K., Suh, J.H., Saucier, C and Teissède, P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. 6: 75–82.
- Chung, Y.; Chien, C.; Teng, K. and Chou, T. (2006). Antioxidant and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides*. *Food Chemistry*, 97: 418-425.
- Cillard, J and Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 13(1):24-9.
- Conner, E.M and Grisham, M.B. (1996). Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. *Nutrition*. 12: 274-277.
- Cook, N.C and Samman, S. (1996). Flavonoids---Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*. 7: 66-76
- Coudray, C and Favier, A. (2000). Determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 29(11):1064–1070.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. and Lewis, N.G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *American Society of Plant Physiologists*, 24, p. 1251-1254.
- Cseke, J. L., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S., Duke, J. A. and Brielmann, H. L. (2006). Natural Products from Plants. *Taylor & Francis Group. 2nd ed. New York*. 551p
- De Leiris, J. (2003). Biochemistry of free radicals. *Heart Metabolism*, 19:40–44.

- Deby-Dupont, G., Deby, C and Lamy, M. (2002). Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *Réanimation*.11: 28-39.
- Derbel, S. and Ghedira, K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 1, p. 28-34.
- De-Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A. Ariese, F. Gooijer, C. and Brinkman, U. A. T. b. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112: 31- 63.
- Devi, A., Gondi, M., Sakthivelu, G., Giridhar, P., Rajasekaran, T and Ravishankar, G.A. (2009). Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chemistry*. 114: 771–776.
- Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traoré, A., Coulibaly, K. and Maïga, A. (2004). Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana Lam.* (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C. R. Chimie*, 7, p. 1073–1080.
- Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82: 47-95.
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., French, K., Math, F., Propper, A and Henquell, L. (1999). *Physiologie animale*. Edition De BOECK Université. 840p.
- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106: 119-133
- El Beyrouthy, M., Arnold, N., Delelis-Dusollier, A. and Dupont F. (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology*. 120, p. 315–334.
- Elmastase, M., Gulçin, I., Isildaka, O., Kufrevioglu, O.I., Ibaoglua, K. and Aboul-Eneinc, H.Y. (2006). Radical Scavenging Activity and Antioxidant Capacity of Bay Leaf Extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 3:258-266.
- Eloff, J. N.; Famakin, J. O.; and Katerere, D. R. P. (2005). *Combretum woodii* (Combretaceae) leaf extracts have high activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 4 (10): 1161-1166.
- Escribano-Bailon, M.T and Santos-Buelga, C. (2003). Polyphenol extraction from foods. *Journal of: Royal society of chemistry*, 1-16.
- 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.
- Fontaine, E. (2007). Chapitre XIX : Radicaux libres. *Traité de Nutrition Artificielle de L'adulte*. 251-257.

- Fontaine, E. (2007a). Radicaux libres et vieillissement. *Cahier de Nutrition et Diététique*. 42(2): 110-115.
- Fragoso, R. L., Reyes-Esparza, J., Burchielb, S., Herrera-Ruiza, D. and Torrec, E. (2008). Risks and Benefits of Commonly used Herbal Medicines in México. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15; 227(1), p. 125–135.
- Garait, B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique ou par voie gazeuse et effet de la GliSODin. *Thèse doctorat, université Joseph Fourier*, P: 22-23.
- Gardès-Albert, M. (2006). Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l’oxygène. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 64 : 365-372.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh Z and Jore D. (2003). Espèces réactives de l’oxygène. Comment l’oxygène peut-il devenir toxique ?. *L’actualité chimique*. P: 91-96.
- Gausson, H., Leroy, J-F. and Ozenda, P. (1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs. *Tome II.2ème éd. Masson. Paris*. 579 p.
- Genestra, M. (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and *antioxidants*. *Cellular Signaling*. 19: 1807–1819.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
- Ghidouche, S., Es-Safi, N.E and Ducrot, P.H. (2008). Mechanistic study on the enzymatic oxidation of flavonols. *Tetrahedron Letters*. 49: 619–623
- Gramegna, M. A. (2004). Chromatographie. Purification d’un produit organique à l’aide d’une colonne chromatographique. *Biochimie*: 1-8
- Griendling, K. K.; and Fitzgerald, G. A. (2006). Oxidative stress and cardiovascular injury part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *American Heart Association*, 108:1912-1916.
- Grisham, M. B. and McCord, J. M. (1986) Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In “Physiology and oxygen radical” AE Taylor, S Matalon, Ed PA Ward. Bethesda. *American Physiology Society*. 1-18.
- Guignard, J-L. 2001. Botanique, systématique moléculaire. *Masson .Paris*. 285 p.
- Gutteridge, J.M.C (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*. 91: 133-140.
- Ha, S, K.; Lee, P.; Park, J, A .; Oh, R, H.; Lee, S, Y.; Park, J, H.; Lee, E, H.; Ryu, J, H.; Lee, R, K.; and Kim, S, Y. (2008). Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochemistry International*, 52: 878-886.

- Hagerman, A.E.; and Butler, L.G. (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26: 809-812.
- Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacology*. 142: 231-255
- Halliwell, B.; Clement, M.V. and Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *Federation of European Biochemical Societies*, 486: 10-13.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. and Aruoma, O.I. (1987). The Deoxyribose Method: A Simple "Test-Tube" Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. *Analytical biochemistry* 165: 215-219.
- Han, S. S.; Lo, S. H.; Choi, Y. W.; Kim, J. H.; and Baek, S. H. (2004). Antioxidant Activity of Crude Extract and Pure Compounds of *Acer ginnala* Max. *Bull Korean Chem Soc*, 25 (3): 389-391
- Hara, S., Mizukami, H., Kuriwa, F. and Endo, T. (2008). Hydroxyl radical generation dependent on extracellular ascorbate in rat striatum, as determined by microdialysis. *Toxicology*. 258:10–16.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology&Therapeutics*, 96: 97-202
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 : 572-584.
- Hennebelle, T.; Sahpaz, S. and Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1 : 3-6.
- Houdret, J. C. (2004). Bien se soigner par les plantes, Un guide pratique pour traiter les troubles et affections du quotidien de toute la famille. *Pocket Evolution*. 633 p
- Huang, D. J., Lin, C. D., Chen, H. J. and Lin, Y. H. (2004). Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45. p. 179-186.
- Jayakumar, T., Thomas, P.A and 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.
- Joël P.; Karine P.; Karine C. and Jean-Olivier D. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition et stress antioxydant*.
- Jung, M.J., Heo, S and Wang, M-H. (2008). Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chemistry*. 108: 482–487.

- Kahkonen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; and Heinonen, M.(1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- Kasperek, M., and al-Janabi, S. (2008). Plantes médicinales, La diversité biologique au service de la santé. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit*. p. 1-2.
- Katalinic, V.; Milos, M.; Kulisic, T.; and Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, 94: 550-557.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20 : 165–177.
- Kostova, I., and Iossifova, T. (2007). Chemical components of Fraxinus species. *Fitoterapia*. 78. p.85-106.
- Kundakovic, T., Mimica Dukic, N and Kovacevic. N. (2005). Free radical scavenging activity of *Achillea alexandri-regis* extracts. *Fitoterapia*. 76:574–576.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N and Fillastre, J.P. (2004). Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*.52:314–322.
- Lamarti, A., Badoc, A., DEFFIEUX, G. and CARDE, J. P. (1994). Biogénèse des monoterpènes : II - La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133. p.79 – 99.
- Larrey, D. (2005). Hépatotoxicité de la phytothérapie. Service d'Hépto-gastroentérologie et Transplantation. *Hôpital Saint Eloi, 80 rue Augustin Fliche - 34295 MONTPELLIER*, p. 169-178.
- Laughton, M.J. Halliwell, B. Evans, P.J and Hoult, J.R. (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol*. 38(17):2859-65.
- Leclerc, H. (1954). Précis de phytothérapie: essais de thérapeutique par les plantes françaises, 4eme édi. *Masson, Paris*. 363 p.
- Lee, L., Koo, N and Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.3:21-33
- Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P. and Prost, M. (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med*. 30: 1076-1081.
- Li, H.B.; Wong, C.C.; Cheng, K.W. and Chena, F. (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*, 41: 385–390.

- Lopes, G.K.B., Schulman, H.M and Hermes-Lima, M. (1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1472(1-2):142-152.
- Louis, S. (2004). Diversité structurale et activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses. *Thèse doctorat : institut national des sciences appliquées de lyon*. p. 28-30.
- Lu, C., Song, G and Lin, J-M. (2006). Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. *Trends in Analytical Chemistry*. 25(10): 985-994.
- Lu, Y and Foo, Y. (2002). Polyphenolics of Salvia—a review. *Phytochemistry*. 59: 117–140.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A. and Jay- Allemand, C.H. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*. 192 p.
- Maisuthisakul, P.; Pongaswatmanit, R. and Gordon, M. H (2007). Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer). *Food Chemistry*, 100:1620-1629.
- Maki, T., Soh, N., Fukaminato, T., Nakajima, H., Nakano, K. and, Imato, T. (2009). Perylenebisimide-linked nitroxide for the detection of hydroxyl radicals. *Analytica Chimica* 30: 107-108
- Maksimovie, Z.; Malencié, N.D.; and Kovacevié, N. (2004). Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technology*, 96 (8): 873-877.
- Marc, F., Brisbarre, F., Davin, A., Baccaunaud, M. and Ferrand, C. (2004). Évaluation du pouvoir antioxydant (TEAC) d'extraits de végétaux en vue d utilisations alimentaires. *Journal of Food Science and Technology*. 24(5):399-414.
- Marnett, L. J. (2000) Oxy radicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 21: 361-370.
- Masella, 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. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 577-586.
- Mattie, M. D.; and Freedman, J. H. (2004). Copper-inducible transcription: regulation by metal- and oxidative stress responsive pathways. *The American Physiological Society*, 286: 293-301.
- Martínez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. 77: 147-161.
- Minami, H., Kim, J. S., Ikezawa, N., Takemura, T., Katayama, T., Kumagai, H. and Sato, F. (2008). Microbial production of plant benzylisoquinoline alkaloids. *The National Academy of Sciences of the USA*, 105 (21), p. 7393–7398.

- Minh, T. T. L., Mignard, B., Vinter, E., Ayala, O., Hồng, P. V. C., Tuyén, B. C., Dechaux, C., Lanoue, A., Boitel-Conti, M., Bourgaud, F. and Gontier, E. (2004). Étude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* Mill. Cultive en hydroponie. Évaluation d'un procédé générique de production de métabolites végétaux à usage thérapeutique et/ou cosmétique. *UMR ENSAIA-INRA*, p. 322-330.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 26(2). p. 211-219.
- Morel, I., Lescoat, G., Cillard, P and Cillard, J. (1994). Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods in enzymology*. 234:437-443
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of Hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-21.
- Naczki, M.; and Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542
- Nakiboglu, M.; Ozturk Urek, R.; Kayali, H.A. and Tarhan, L. (2007). Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey. *Food Chemistry*, 104: 630–635.
- Narayana, K. R.; Reddy, M. R.; Chaluvadi, M.R.; and Krishna, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16.
- Newman, P. R., Timmerman, B. N. and Marby, T. J. (1997) Laboratory manual for the systematic identification of flavonoids.
- Owen, P. L and Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of Northeastern North America plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64:149-160.
- Ozsoy, N., Yilmaz, T., Kurt, O., Can, A and Yanardag, R. (2009). In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chemistry* .112:69-72.
- Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*. (276) : 87-92.
- Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R and et Defraigne, JO. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Cœur, Poumons*. 4(4) : 29-33.
- Pou, S., Nguyen, S.Y., Gladwell, T and Rosen, G.M. (1995). Does peroxynitrite generate hydroxyl radical?. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1244: 62-68.
- Prasad, K. N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H. and Jiang, Y. ((2009). Flavonoids contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. p. 1-25.

- Pribitkin, E. A. and Boger, G. (2001). Herbal Therapy. *Arch Facial Plast Surg*, 3, p. 127-132.
- Priya, T.T., Sabu, M.C and Jolly, C.I. (2008). Free radical scavenging and anti-inflammatory properties of *Lagerstroemia speciosa* (L). *Infammo-pharmacology*. 16:182–187.
- Rajbir, S.; Singh, S.; Kumar, S. and Arora, S. (2007). Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A.Cum. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1216-1223.
- Rasmussen, S.E., Frederiksen, H., Krogholm K.S and Poulsen, L. (2005). Dietary proanthocyanidines: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 49: 159-174.
- Ré, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian Le Goff, L and Had-Aissouni, L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 24:502–509.
- Reddy, B.S., Reddy, R.K.K., Reddy, B.P., Ramakrishna, S and Diwan, P. (2008). Potential in vitro antioxidant and protective effects of *Soymida febrifuga* on ethanol induced oxidative damage in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3429-3442.
- Reed, J. D. (1995). Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *Journal Animal Science*, 73:1516-1528.
- Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., Haan, L., Spenkelink, B., Awad, M.H., Cnubben, N.H.P., Zanden, J.J., Woude, H., Alink, G.M and Koeman, J.H. (2002). The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 11: 321–333.
- Robards, K.; Prenzeler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; and Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436.
- Rochette, L. (2008). Stress oxidant et species. *Réanimation*. 3: 1-4
- Samarth, R. M.; and Krishna, V. (2007). Evaluation of radical scavenging activity of certain plant extracts using cell free assays. *Pharmacologyonline*, 1: 125-137.
- Samy, R. P. and Gopalakrishnakone, P. (2008). Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. *CAM Advance Access published*, p.1-12.
- Sana, H, Temlali, Y, and Metaouib, F. Le journal de la finance africaine. Hebdomadaire. p 2. N 16 :14 au 20 février (2008).

- Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B. Di Benedetto, R., Filesi, C. and Masella, R. (2007). Polyphénols, intracellular signaling and information. *Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari*, 43 (48), p .394-405.
- Shih, M. C., Kuo, C. C. and Chiang, W. (2009). Effects of drying and extrusion on colour, chemical composition, antioxidant activities and mitogenic response of spleen lymphocytes of sweet potatoes. *Food Chemistry*. 117. p. 114–121
- Shyu, Y. S., Lin, J. T., Chang, Y. T., Chiang, C. J. and Yang, D. J. (2009). Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens L.*) flower. *Food Chemistry*. 115. pp 515–521.
- Sievers, A.; Oshinowo, L.; Schultze, W.; Koch, A.; and Richter, R. (2002). Simple thin-layer chromatographic test for antioxydative compounds using DPPH assay. *Camag Bibliography Service*, 88: 14-15.
- Simirgiotis, M. J. Caligari, P. D.S. and Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens A. DC.* grown in Chile by liquid chromatography–UV detection–mass spectrometry. *Food Chemistry*. 115. pp. 775–784
- Sirikantaramas, S., Yamazaki, M. and Saito, K. (2008). Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *The National Academy of Sciences of the USA*. 105 (18), p. 6782–6786.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner Hras, A., Simonic, M and Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89: 191–198
- Small, E. and Catling, P. M. (2000). Les cultures médicinales canadiennes. *National Research Council Canada, Conseil national de recherches Canada*. 281 p.
- Soobrattee, M. A.; Neergheen, V. S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma. O. I.; and Bahorn, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agent: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579: 200-213.
- Suzuki, H., Sasaki, R., Ogata, Y., Nakamura, Y., Sakurai, N., Kitajima, M., Takayama, H., Kanaya, S., Aoki, K., Shibata, D and Saito, K. (2008). Metabolic profiling of flavonoids in *Lotus japonicus* using liquid chromatography Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Phytochemistry*. 69: 99–111.
- Therond, P. (2006). Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutique Françaises*. 64: 383-389.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D and Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 104: 466–479.

- Tsao, R. and Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*. 812, p. 85–99.
- Turgeon, M. (2001). Profil des produits forestiers, première transformation, huiles essentielles. *Ministère des Ressources naturelles, Québec*. 21 p.
- Vamecq, J.; Vallée, L.; Storme, L.; Gelé, P. and Bordet, R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*, 18 (1) :16-23.
- Verma, B., Hucl, P. and Chibbar, R. N. (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*, 116. p. 947–954
- Vermerris, V and Nicholson, R. (2006). *Phenolic compound biochemistry*. Chapter I: Families of phenolic compounds and means of classification. Edition *Springer*, 1-32
- Villano, D.; Fernandez-pachon, M, S.; Moya, M, L.; Traoncoso, A, M. and Garcia-parrilla, M, C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230-235.
- Wang, B.S., Li, B.S. and Zeng, Q.X. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food Chemistry*. 107: 1198-1204.
- Wang, R.J., Yuan, X., Jin, Z., Tian, Y and Song, H. (2007). Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chemistry*. 104: 242–250.
- Wargovich, M. J., Woods, C., Hollis, D. M. and Zander, M. E. (2001). Herbals, Cancer Prevention and Health. *The Journal of Nutrition*. 131, p. 3034S–3036.
- Wchitl, M. and Anton., R. (2003). *Plantes thérapeutiques 5Tradition, pratique, officinale, science et thérapeutique) 2 éme Ed. Tec. Et Doc. Paris . 200-202.*
- Wei,T., Sun, H., Zhao, X., Hou, J., Hou, A., Zhao, Q and Xina, W. (2002). Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallotannin, *Pistafolia A. Life Sciences*. 70:1889–1899
- Wichtl, M. and Anton, R. (2003). *Menthae Piperitae folium* in *Plantes thérapeutique*. Ed. Tec et Doc. 387-393p
- William, R. J.; Spencer, J. P. E.; and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Apsorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (7): 838-849.
- Woolley, J. G. (2001). Plant alkaloids, encyclopedia of life sciences. *Nature publishing group*, p.1-11.
- Wu, C-R., Huang, M-Y., Lin, Y-T., Ju, H-Y. and Ching, H. (2007). Antioxidant properties of Cortex fraxini and its simple coumarins. *Food Chemistry*. 104: 1464–1471

- Yasunorio, O., Hiroe, Y., Yasushi, S and Hisashi, Y. (2001). Reaction between Polyphenols and Hydroxyl Radical. Study using High-Speed Flow ESR Method. *Nippon Kagakkai Koen Yokoshu*. 79(2): 758.
- Yokozawa, T., Zhong, Dong, E and Shimizu, M. (1997). Antioxidative Activity of Flavones and Flavonols In Vintro. *Phytotherapy Research*. 11: 446-449.
- You, K.M.; Lee, C.H.; Moon, B. and Lee, C.Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106: 929-939.
- Zhou, R and Li, S. (2009). In vitro antioxidant analysis and characterisation of antler velvet extract. *Food Chemistry*. 114:1321–1327.



Annexes

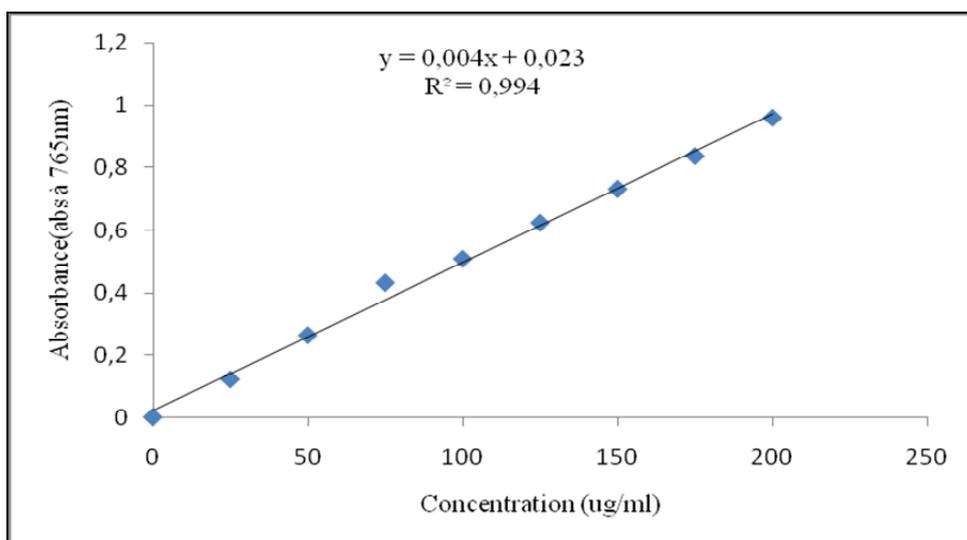


Figure 1: Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des phénols totaux.

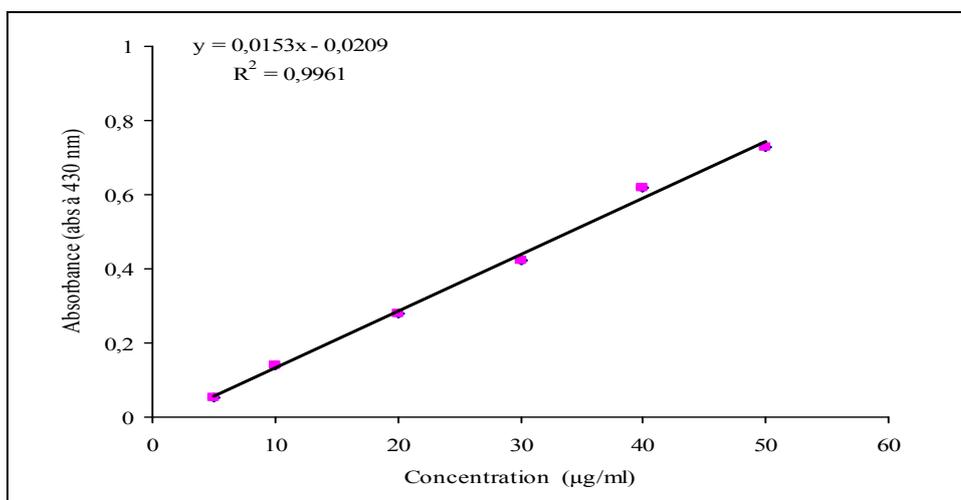


Figure 2: Courbe d'étalonnage avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes

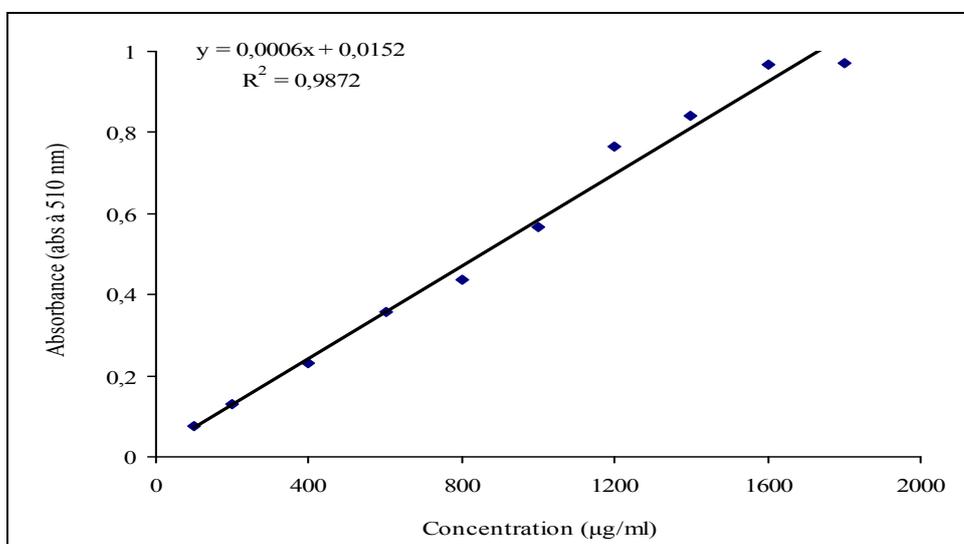


Figure 3: Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tanins

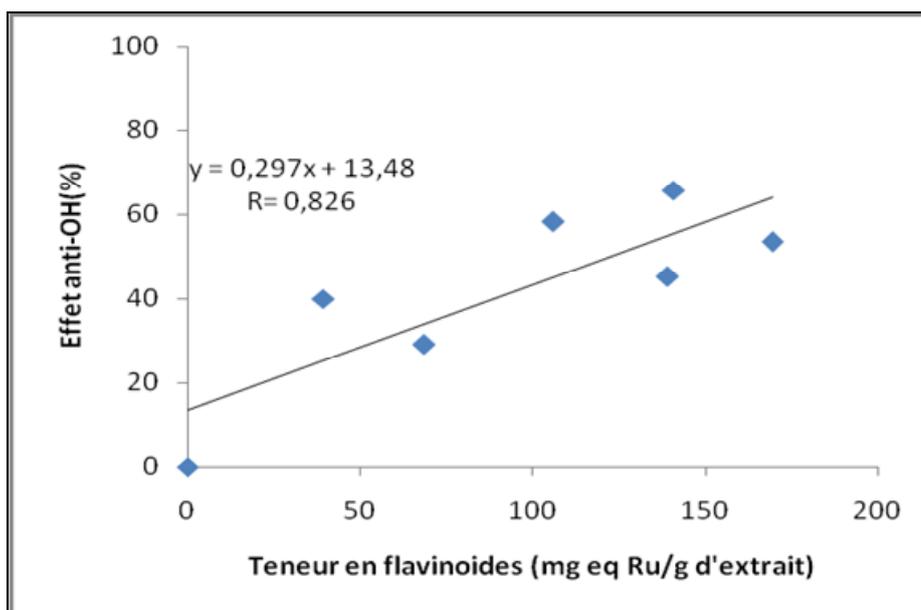


Figure 4 : Corrélation entre l'activité scavenging contre le radical hydroxyle et les flavonoides des feuilles de *F.angustifolia*

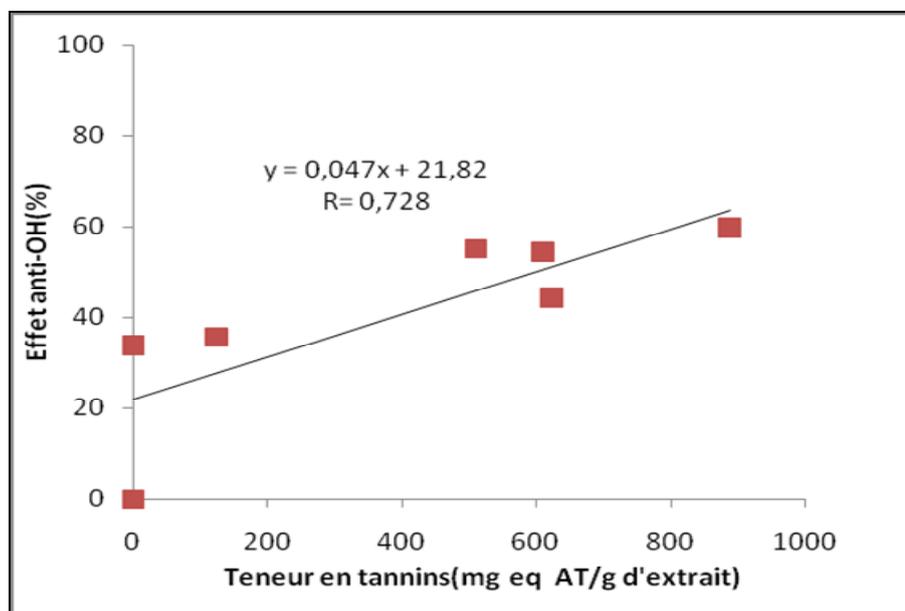


Figure 5 : Corrélation entre l'activité scavenging contre le radical hydroxyle et les tannins de l'écorce de *F.angustifolia*.

Résumé

Dans le présent travail, nous avons étudié les effets anti-radicalaires des extraits de *Fraxinus angustifolia*, une plante utilisée localement comme remède contre de nombreuses pathologies à caractère inflammatoire. Les résultats de dosage des extraits, ont fait ressortir des taux différents, dont le plus riche en phénols totaux et en flavonoïdes avec des valeurs respectives de 249.01 mg Eq cat/g d'extrait et 169.53 mg Eq rut/g d'extrait, est l'extrait acétate d'éthyle des feuilles et le plus riche en tannins est l'extrait éthanolique de l'écorce (990.4 mg Eq Atan/g d'extrait). A 100 µg/ml, l'extrait éthanolique des feuilles a donné la meilleure activité contre le OH (65.68%, IC₅₀ = 79.76 µg/ml), plus élevée que celle des standards dont le meilleur (catéchine) a enregistré un taux de 37.85%. L'évaluation de l'activité anti-DPPH à la concentration de 100 µg/ml a prouvé que les extraits de l'écorce manifestent des effets très importants, supérieurs à 94%. Les résultats du test anti-H₂O₂ indiquent que tous les extraits exhibent une haute activité au voisinage de 70% à une concentration de 100 µg/ml, l'extrait acétate d'éthyle des feuilles a exprimé l'effet scavenger le plus important contre ce radical avec une IC₅₀ égale à 51.79 µg/ml.

L'utilisation de la chromatographie sur colonne a permis de révéler deux fractions actives ; des F₂ polaires éluées par le mélange acétate d'éthyle/méthanol et les F₁ moins polaires éluées par le chloroforme. L'analyse de ces fractions sur CCM a montré que l'effet anti-radicalaire serait probablement dû à la présence de la rutine et des dérivés de l'acide tannique pour les F₂ des extraits de feuilles et à la rutine et la quercétine au niveau des F₂ et F₃ des extraits de l'écorce. Les F₁ de l'écorce ont relevé la présence de molécules complexes à haut poids moléculaire douées d'un important pouvoir anti-radicalaire qui restent à identifier et à exploiter dans le domaine thérapeutique

Mots clés : activité anti-radicalaire, Caractérisation, *F. angustifolia*, (DPPH), CCM ...

Abstract

In the present work, we studied the anti-radical effects of extracts of *Fraxinus angustifolia*, a plant used locally to treat numerous inflammatory-related pathologies. Results concerning phenol analysis showed different rates, the richest in total phenols and Flavonoids with respective values of 249.01 mg CatEq/g of extract and 169.53 mg RtEq /g of extract is the ethyl acetate extract of leaves and the richest in tannins is the ethanol extract of bark (990.4 mg TAEq /g of extract). At a concentration of 100 µg/ml, the ethanolic leaf extract exhibited the best activity against OH (65.68%, IC₅₀ = 79.76 µg/ml), higher than that of the standards of which the best (catechin) showed a rate of 37.85%. Evaluation of anti-DPPH activity at a concentration of 100 µg/ml proved that bark extracts showed very important activity which is higher than 94%. Results of anti-H₂O₂ indicate that all extract showed a high activity around 70% at 100 µg/ml; the ethyl acetate extract of leaves showed the most important scavenging effect against this radical, with an IC₅₀ of 51.79 µg/ml.

Analysis using column chromatography revealed two active fractions: polar F₂ eluted with a mixture of ethyl acetate/methanol and F₁ less polar eluted with chloroform. Analysis of these fractions using thin layer chromatography showed that the anti-radical effect could be probably due to the presence of rutin and tannic acid derivatives in the case of F₂ of leaf extracts and to rutin and quercetin for F₂ and F₁ of bark extracts. Bark F₁ revealed the presence of complex molecules with high molecular weight having an important anti-radical effect which remains to be identified and exploited in therapy.

Keywords: Characterization, *F. angustifolia*, (DPPH), anti-radical activity...

ملخص

رنبته طبفة تستعمل مقلبا في علاج الأمراض المختلفة خاصة في علاج الالتهابات. نتائج تقييم المركبات الفينولية أظهرت غناء مستخلصات الأوراق مقارنة باللحاء

اختبارات النشاطات المضادة للجذور الحرة أظهرت أن مستخلص الايثانول للأوراق يملك نشاطا فعالا ضد OH[•]، حيث عبر عن IC₅₀ ب79.76 ميكغ/مل. مستخلص الاسيتات ائيل أظهر نشاط عالي ضدH₂O₂ بحيث قدرت ال IC₅₀ ب51.79 ميكغ/مل. قياس النشاط ضد جذر DPPH برهن أن مستخلصات اللحاء تملك نشاطا معتبرا عند التركيز 100 ميكغ/مل تقارب ال90%. فصل المستخلصات الفعالة بالكروماتوغرافيا سمح لنا بالحصول على الجزيئين ج1 وج2 الذين اظهرا نشاطا فعالا ضد هذه الجذور. استعمال CCM سمح لنا بإظهار عدة مركبات فينولية مختلفة مما يدل على غنى نبتة

الكلمات الرئيسية : . للمركبات الفينولية، الجذور الحرة، ، الكروماتوغرافيا،