

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

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

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie

Option : Biochimie Appliquée aux Substances Végétales Bioactives

Thème

**Activité biologique *in vitro* des extraits de
Fraxinus angustifolia contre les radicaux ABTS^{·+},
O₂^{·-} et NO[·] et caractérisation des fractions actives**

Présenté par :

ARKOUB Louiza épouse HAMITOUCHE

Devant le jury :

Président : M^{me} BENABDESSELAM F.

Maitre de conférences A (Université de Bejaia).

Promoteur : M^r ATMANI D.

Professeur (Université de Bejaia).

Examineurs : M^{me} BEDJOU F.

Maitre de conférences A (Université de Bejaia).

M^r BELHAMEL K.

Maitre de conférences A (Université de Bejaia).

Année 2011

Remerciements

Ce travail à été réalisé au laboratoire de Biochimie appliquée (Génétique). Que M^r. ATMANI, mon enseignant avant d'être mon directeur de mémoire, reçoit l'expression de ma reconnaissance. Je le remercie pour m'avoir aidé, orienté et soutenu de part ses compétences scientifiques, sa disponibilité et sa patience pour mener à bien cette étude. Son assistance et ses recommandations continues pour moi, me furent très utiles.

Je suis très sensible à la présence dans ce jury de M^{me} F. BENABDESSALAM, qui nous a fait l'honneur de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Je remercie tout particulièrement M^{me} F. BEDJOU et M^r K. BELHAMEL d'avoir accepté d'examiner ce travail et consacré de leurs temps pour son évaluation.

Comme je suis très reconnaissante à tous les membres de l'équipe du laboratoire de biochimie appliquée, leurs qualités humaines et scientifiques m'ont été indispensables pour mener à bien cette étude : M^{me} ATMANI, M^{me} DEBACHE, M^{me} OUAHMED, M^{elle} AYOUNI, M^{elle} BERBOUCHA, M^{elle} CHAHER, M^{elle} LOUNIS, M^{elle} REMILA, M^{elle} MOULAOUÏ et M^{elle} SAIDAN. Je note également l'aide apportée par le personnel du laboratoire de biophysique particulièrement M^r HAMOUM et M^r BOUCHENOUA.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à tous mes collègues des laboratoires: M^r AMROUCHE, M^{me} KHERBACHI, M^{me} ADJAOUT, M^{me} GUERGAA, M^{me} DJERADA, M^{elle} AIDLI, M^r et M^{me} RAMDANI.

Mes remerciements tout aussi à ma camarade de travail NASSIMA avec qui j'ai partagé les moments les plus difficiles dans la réalisation de cette étude, sans oublier mon amie SALIMA qui ma beaucoup aidé et mon beau frère KHODIR pour sa précieuse aide.

Tout mon amour et ma gratitude sont adressés à mon mari qui à su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de ces années.

A toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, je dis merci.



Dédicaces

Ce travail est dédié :

A mon mari bien aimé.

A ma mère, mon défunt père (que Dieu lui accorde Sa Miséricorde), mes frères et sœurs, sans oublier particulièrement ma grande mère centenaire.

A mes beaux parents, mon beau frère, mes belles sœurs, mes neveux et mes nièces.

A tous mes amis.



Sommaire

<i>Introduction</i>	01
---------------------------	----

Synthèse bibliographique

I- Les radicaux libres.....	02
I-1-Définition.....	02
I.2. Espèces oxygénées réactives (EOR)	02
.....	
I.3. Nature et sources cellulaires des EOR	03
I.4. Stresse oxydant et cibles moléculaires	07
1.5. Conséquences biologique du stresse oxydant.....	10
I.6. Systèmes de défenses antioxydant	12
II. Les composés phénoliques.....	15
II.2. Biosynthèse des composés phénoliques.....	15
II.3. Classification des composés phénoliques	15
II.4. Activités biologiques des composés phénoliques	22

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

II.1Matériel végétal	31
II.1.1. Description du matériel végétal	31
II.1.2.Classification	32
II.1.3. Usages thérapeutiques.....	32
II.1.4. Récolte.	32
II.1. 5. Séchage, broyage et tamisage	32
II.1.6. Extraction des composés phénoliques.....	33
II.2. Dosage des composés phénoliques	33

Sommaire

II.2.1. Dosage des phénols totaux.....	33
II.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	35
II.2.3. Dosage des tannins.....	35
II.3. Etude de l'activité antioxydant de <i>Fraxinus angustifolia</i>	35
II.3.1. Etude de l'activité réductrice (FRAP).....	36
II.3.2. Activité scavenging du radical ABTS ⁺	36
II.3.3. Activité scavenger de l'anion superoxyde(O ₂ ⁻).....	37
II.3.4. Activité scavenging du Radical nitrique oxyde (NO [•]).....	38
II.4. Chromatographie sur colonne de gel de silice	39
II.5. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	39
II.6. Etude statistique	40

Résultats et discussions

III.1. Extraction des composés phénoliques	41
III.2. Dosage des composés phénoliques.....	42
III.2.1. Dosage des phénols totaux	42
III.2.2. Dosage des flavonoïdes	44
III.2.3. Dosage des tannins	45
III.3. Evaluation de l'activité antioxydant et anti radicalaire	46
III.3.1. Activité réductrice (FRAP).....	46
III.3.2. Activité scavenging du radical ABTS ⁺	48
III.3.2.1. Activité anti radicalaire contre le radical ABTS ⁺ à différentes concentrations.....	51

Sommaire

III.3. 3. Activité scavenging du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....	55
III.3.3.1. Effet anti radicalaire contre le radical $O_2^{\cdot-}$ à différentes concentrations.....	57
III.3. 4. Activité scavenging du radical nitrique oxyde ($NO^{\cdot}$)	61
III.3.4.1. Effet anti radicalaire contre le radical $NO^{\cdot}$ à différentes concentrations.....	63
III.4. Corrélations entre l'activité antioxydant et les teneurs en composés phénoliques.....	67
III.4.1. Activité réductrice (FRAP) et teneur en composés phénoliques.....	68
III.4.2. Activité scavenger du radical $ABTS^{\cdot+}$ et teneur en composés phénoliques	68
III.4.3. Activité scavenger du super oxyde et teneur en composés phénoliques	69
III.4.4. Activité scavenger du monoxyde d'azote et teneur en composés phénoliques.....	69
III.5. Evaluation de l'activité antioxydant des fractions chromatographique des extraits actifs de <i>Fraxinus angustifolia</i>	70
III.5.1. Activité réductrice des fractions des extraits actifs de <i>Fraxinus angustifolia</i> ...	70
III.5.2. Activité scavenging des fractions sur le radical $ABTS^{\cdot+}$	71
III.5. 3. Activité scavenging des fractions sur le radical super oxyde	75
III.5. 4. Activité scavenging des fractions sur le radical monoxyde d'azote.....	77
III.6. Caractérisation de l'activité antioxydante par chromatographie sur couche mince	79

Sommaire

III-6-1- Caractérisation de l'activité antioxydante des extraits d'écorce de	
<i>Fraxinus. angustifolia</i>	79
III.6.2. Caractérisation de l'activité antioxydante des extraits de feuilles de	
<i>Fraxinus. angustifolia</i>	83
<i>Conclusion et perspectives</i>	87
<i>Références bibliographiques</i>	89
<i>Annexe</i>	102

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxy-ribo-nucléique
ABTS	Acide 2 ;2' -azinobis -(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfinique)
AGPI	Acide gras polyinsaturé
ARN	Acide ribo-nucléique
BH4	Tétrahydrobioptérine
BSA	Bovine sérum albumine
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur couche mince
ERN	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	High performance liquid chromatography
MDA	Malonaldialdéhyde
NADH	Nicotinamide Adenine dinucleotide
NADPH:	Nicotinamide Adenine dinucleotide phosphate
NBT	Nitrobleu tétrazolium
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrique synthase
¹ O ₂	Oxygène singulet
O ₂ ⁻	Anion superoxide
·OH	Radical hydroxyle
ONOOH	Nitroperoxyde
PMS	Phenazine Methosulfate
R _f :	Rapport frontal
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sGC	Guanylate cycase
SOD	Superoxyde dismutase

SNP	Sodium nitroprusside
TEA	Triethanolamine
TEAC	Trolox equivalent antioxydant capacity
TPTZ	2,4,3-tripyridyltriazine
XOR	Xanthine oxydoréductase

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Principales sources des radicaux libres	03
02	Etapes de la peroxydation lipidique	09
03	Système de régénération du GSH.	13
04	Structure générale des acides hydroxybenzoïques	16
05	La formule générale des acides hydroxycinnamiques	17
06	Structure de base des flavonoïdes	18
07	Formule générale des coumarines	20
08	structure générale des tanins condensés	21
09	Structure des gallotanins (pentagalloyglucose)	21
10	Mécanisme de l'activité scavenger des flavonoïdes via la fonction catéchol	24
11	Groupe fonctionnel de l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes	25
12	Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Men+)	27
13	Photographie des parties utilisées de <i>Fraxinus angustifolia</i>	31
14	Procédé d'extraction des composés phénoliques	34
15	Teneurs en phénols totaux des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i>	42
16	Teneurs en flavonoïdes des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i>	44
17	Teneurs en tannins des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	45
18	Activité réductrice de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	46
19	Activité réductrice d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	47
20	Capacité antioxydant équivalent trolox (TEAC) de <i>Fraxinus angustifolia</i>	48
21	Activité scavenging du radical ABTS ^{•+} de <i>Fraxinus angustifolia</i>	50
22	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> et certains standards à différentes concentrations	52
23	Effet scavenger contre le radical ABTS ^{•+} des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et certains standards à différentes concentrations.	53
24	Activité scavenging de l'anion super oxyde de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	56
25	Effet scavenger contre l'anion super oxyde des extraits d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> et de l'acide caféique à différentes concentrations	58
26	Effet scavenger contre l'anion super oxyde des extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> et de l'acide caféique à différentes concentrations	58
27	Activité scavenging du mono oxyde d'azote de <i>Fraxinus angustifolia</i>	52
28	Pouvoir réducteur des fractions des extraits actifs de feuilles de <i>F.angustifolia</i> à 100µg/ml	64
29	Effet scavenger contre le radical NO [•] des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et certains standards à différentes concentrations.	65
30	Pouvoir réducteur des fractions des extraits actifs d'écorce de <i>F.angustifolia</i> à 100µg/ml.	70
31	Pouvoir réducteur des fractions des extraits actifs de feuilles de <i>F.angustifolia</i> à 100µg/ml	71

32	Capacité antioxydant équivalent Trolox des fractions des extraits actifs d'écorce	72
33	Capacité antioxydant équivalent Trolox des fractions des extraits actifs des feuilles	73
34	Effet scavenger contre l'ABTS ^{•+} des fractions des extraits actifs d'écorce et des standards à 100µg/ml	73
35	Effet scavenger contre l'ABTS ^{•+} des fractions des extraits actifs des feuilles et des standards à 100µg/m	74
36	Effet scavenger contre l'anion super oxyde des fractions des extraits actifs d'écorce et de l'acide caféique à 400µg/ml.	75
37	Effet scavenger contre l'anion super oxyde des fractions des extraits actifs des feuilles et de l'acide caféique à 400µg/ml.	76
38	Effet scavenger contre le monoxyde d'azote des fractions des extraits actifs d'écorce et des standards à 100µg/ml	77
39	Effet scavenger contre le monoxyde d'azote des fractions des extraits actifs des feuilles et des standards à 100µg/ml	78
40	Chromatogrammes de l'extrait éthanolique et ses fractions	79
41	Chromatogrammes de l'extrait chloroforme et ses fractions	80
42	Chromatogrammes des extraits aqueux et leurs fractions	81
43	Chromatogrammes de l'extrait éthanolique et ses fractions	83
44	Chromatogrammes de l'extrait chloroforme et ses fractions	84
45	Chromatogrammes des l'extraits aqueux et leurs fractions	85

Liste des tableaux

N°	Titre	page
I	Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques	02
II	Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque	16
III	Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique	17
VI	Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe	19
V	Taux d'extraction des composés phénoliques des extraits de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	41
VI	les IC ₅₀ des extraits d'écorces et de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et des standards	54
VII	Exemples de travaux réalisés concernant l'activité anti ABTS ⁺ des extraits de plantes	55
VIII	les valeurs d'IC ₅₀ des extraits d'écorce et de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et de l'acide caféique	60
XI	Exemples d'études concernant l'effet scavenging de l'anion super oxyde par les extraits de plantes.	61
X	les valeurs d'IC ₅₀ des extraits d'écorce et de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et de molécules de références	65
XI	Exemples d'études concernant l'effet scavenging du radical nitrique oxyde par les extraits de plantes.	66
XII	Corrélations entre le pouvoir réducteur et l'ABTS ⁺ et composés phénoliques	67
XIII	Corrélations entre l'effet anti O ₂ ⁻ et NO [•] et composés phénoliques	67
XIV	Caractéristiques des chromatogrammes du chloroforme de l'écorce de <i>F. angustifolia</i>	81
XV	Caractéristiques des chromatogrammes des extraits aqueux et leurs fractions F2	82
XVI	Caractéristiques des chromatogrammes de l'éthanol et ces fractions	83
XVII	Caractéristiques des chromatogrammes du chloroforme et ces fractions.	85
XVIII	Caractéristiques des chromatogrammes des extraits aqueux et leurs fractions	86

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit quotidiennement des radicaux libres, composés très réactifs comportant au moins un électron célibataire et nécessaires à des mécanismes vitaux. La superproduction de ces espèces chimiques peut avoir des effets délétères sur plusieurs molécules cellulaires (lipides, ADN, protéines et glucides), entraînant ainsi le stress oxydant (Favier, 2003). Ce phénomène oxydatif peut être défini comme étant la rupture d'équilibre entre la production d'éléments oxydants et mécanismes de défenses antioxydants. Ce déséquilibre est à l'origine de plusieurs maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les cancers et les maladies neurodégénératives (Guinebert *et al.*, 2005).

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression de ces oxydants grâce à un système de défense cellulaire, complété par les apports alimentaires en substances antioxydants tels que les vitamines, les caroténoïdes et les composés phénoliques. Ces derniers sont des métabolites secondaires très répandus chez les plantes (Pincemail *et al.*, 2007).

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. En effet, un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydant telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires et les maladies inflammatoires (Macheix *et al.*, 2005).

Ces pathologies, traitées avec les plantes médicinales, alors il est fort probable d'y dégager des molécules de nature phénolique qui agissent spécifiquement contre ces pathologies via leurs propriétés antioxydantes.

À cet effet, la présente étude s'étalera sur l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro*, des extraits d'écorce et de feuilles de *Fraxinus angustifolia* de la famille des Oléacées utilisée localement comme remède contre de nombreuses pathologies, notamment le pouvoir réducteur (FRAP) et l'activité scavenging du radical (ABTS^{•+}), anion super oxyde et nitrique oxyde, par la suite, l'isolement des fractions douées de cette activité par chromatographie sur colonne et leur caractérisation par chromatographie sur couche mince afin d'identifier les composés responsables de cette activité.

I. Les radicaux libres

I.1. Définition

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron(s) libre(s) non apparié(s) sur leurs couches externes (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical (Koechilin-Ramonatxo, 2006). Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

I.2. Espèces oxygénées réactives (EOR)

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc....) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite (Fantaine *et al.*, 2002; Bartosz, 2003 ; Halliwell et Whiteman 2004) (Tableau I).

Tableau I. Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (D'après Bartosz, 2003).

Espèces radicalaires	
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$
Radical hydroxyl	$OH^{\bullet}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\bullet}$
Espèces non radicalaires	
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$OHCL$
Oxygène singulier	1O_2
Peroxydinitrite	$ONOO^-$

L'instabilité des EOR rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures, elles sont très élevées et peuvent aller de 10^5 à $10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La durée de vie des EOR est extrêmement très courte de la nano à la milli seconde (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

En effet, la toxicité des EOR n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité, dans plusieurs cas des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demie vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles où elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production (Kohen et nyska., 2002).

I.3. Nature et sources cellulaires des EOR

Les EOR se forment de façon parasitaire dans toutes les réactions biochimiques comportant le transfert d'électrons ou la participation de l'oxygène. Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux EOR par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normale et parfois en réponse à un stimulus spécifique. Dans ce contexte, plusieurs exemples peuvent être cités. (Figure 1).

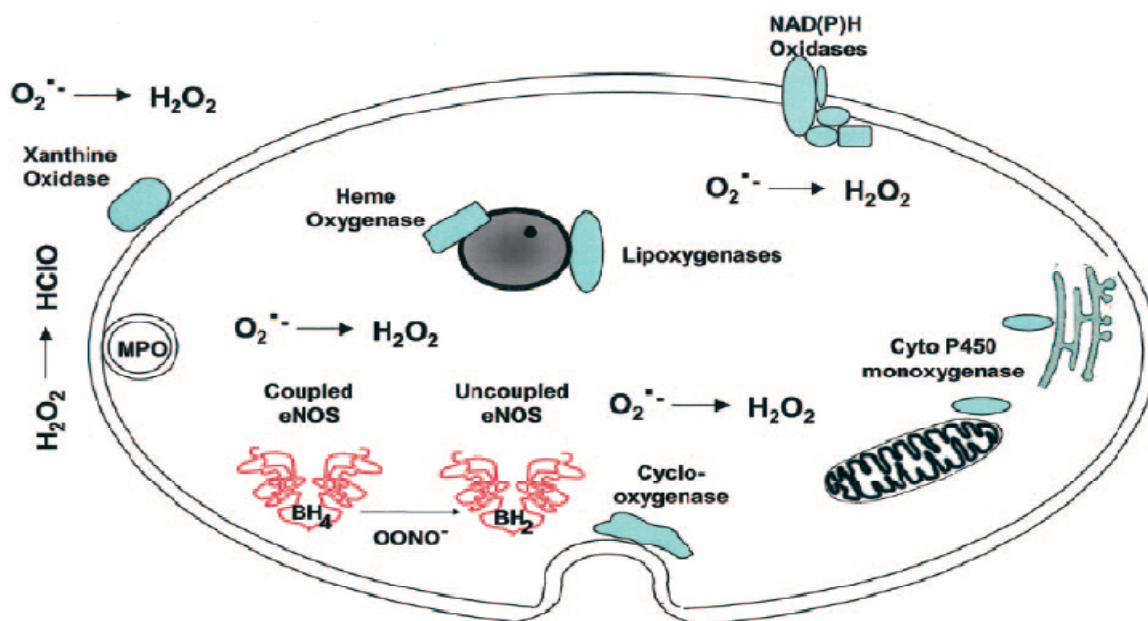
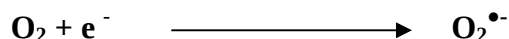


Figure 1 : Principales sources des radicaux libres (Griendling et Fitzgerald, 2003).

I.3.1. Le radical anion superoxyde

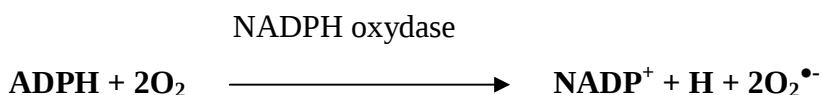
Par sa configuration électronique l'oxygène moléculaire est un radical, il possède en effet deux électrons non appariés, heureusement un blocage cinétique limite sa réactivité ; les spins de ses deux électrons sont parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande. Cependant, dans l'organisme, une partie de cet oxygène moléculaire peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) (Koechilin-Ramonatxo, 2006).



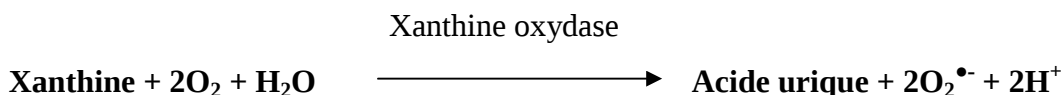
La source principale de ce radical est la chaîne de transport d'électrons mitochondrial (Bartosz, 2003) au niveau du complexe I (NADH /ubiquinone oxydoréductase) et du complexe III (ubiquinol /cytochrome c oxydoréduction) (Chiarugi et Fiaschi, 2007). Environ 0 à 5 % de l'oxygène moléculaire utilisé par les mitochondries est partiellement réduit par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire (Bartosz, 2003).

D'autres chaînes de transport d'électrons (péroxyosomes et microsomes) contribuent pareillement à la production du $O_2^{\bullet-}$ dans les cellules en aérobiose. Les cytochromes P450 et b5 de la chaîne de transport d'électrons des microsomes peuvent produire des EOR quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers l' O_2 (Sevanian *et al.*, 1990).

Le stress respiratoire (respiratory burst) des polynucléaires neutrophiles constitue une source cellulaire importante de l'anion superoxyde qui est produit au niveau de la NADPH oxydase, un complexe enzymatique formé de plusieurs sous unités. Cette enzyme normalement inactive est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée pour produire le $O_2^{\bullet-}$. Cette production est à l'origine de la synthèse de molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite ($ClO^{\bullet-}$) indispensables à la digestion du matériel phagocyté (Babior *et al.*, 2002).



Le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante :

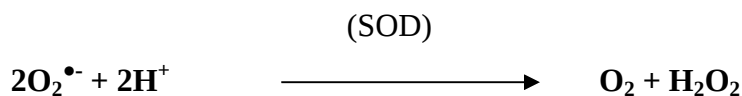


De nombreuses molécules peuvent être substrats de réactions d'auto-oxydations (non enzymatique), comme le glucose, les monoamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline) l'hémoglobine, conduisant également à la formation du superoxyde (Bartosz, 2003).

Ce radical est peu réactif mais représente le précurseur d'espèces plus oxydantes. Avec l'apport d'un autre électron il devient un ion peroxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ qui à son tour avec l'ajout de deux ions hydrogène (2H^+) produit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

1.3.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) se forme par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde (Pal Yu, 1994), La dismutation enzymatique est catalysée principalement par la superoxyde dismutase (SOD).

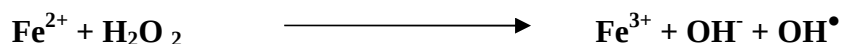


À côté de la SOD, il existe d'autres enzymes produisant H_2O_2 , comme les oxydases présentes particulièrement dans les peroxysomes (Kohen et Nyska et *al.*, 2002). Cependant, certaines de ces oxydases comme la glycoxylate oxydase, la D-aminoacide oxydase peuvent catalyser directement la réduction divalente de l'oxygène moléculaire produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène sans formation du radical superoxyde (Del Rio et *al.*, 1996), le foie est l'organe central de cette production. Les microsomes sont responsables dans 80% de la concentration d' H_2O_2 généré *in vivo* dans les sites hyperoxiques (Valko et *al.*, 2006).

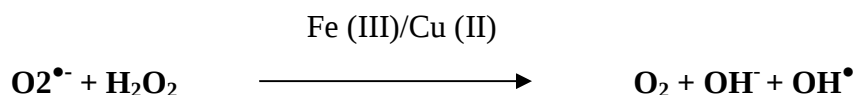
L'absence de charge à sa surface rend cette EOR très lipophile et peu réactif en milieu aqueux, le peroxyde d'hydrogène peut néanmoins être considéré comme un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique car sa faible réactivité associée à sa capacité de traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse, il peut alors participer à la biosynthèse du radical hydroxyle (Pal Yu, 1994 ; Cash et *al.*, 2007).

I.3.3. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi H_2O_2 associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton :



H_2O_2 peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant à la production du $\text{OH}^\bullet$, ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (Sorg, 2004).

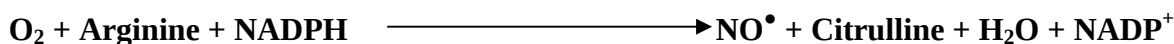


D'autres voies de formation du $\text{OH}^\bullet$ sont : la décomposition de l'acide peroxonitrique et la réaction de l'acide hypochloreux avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Bartosz, 2003). Avec une demi vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène, il réagit avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant dans son voisinage (protéine, lipide, ADN) entraînant ainsi de multiples dommages, il apparaît comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la cytotoxicité des radicaux libres (Gutteridge, 1993).

I.3.4. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote ($\text{NO}^\bullet$) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par la nitrique oxyde synthase (NOS) (Sorg, 2004) selon la réaction suivante :

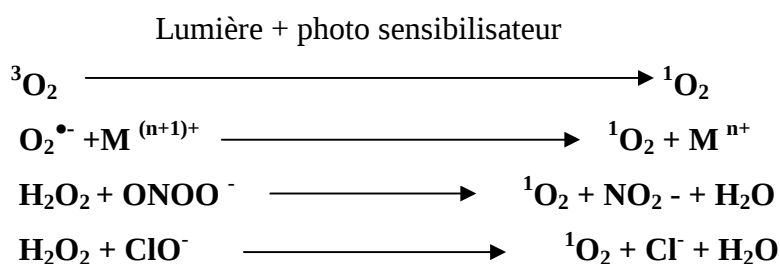
Nitrique oxyde synthase



Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans la neurotransmission, régulation de la pression sanguine, mécanisme de défense, relaxation des muscles lisses, et régulation immunitaire (Valko *et al.*, 2007). Mais à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le $O_2^{\bullet-}$ pour former un puissant oxydant le peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO_2 et le $OH^{\bullet}$ (Densiov et Afanas'ev, 2005).

I.3.5. L'oxygène singulier

Il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, par la réaction entre divers EOR ou en présence de la lumière, d'oxygène et de photosensibilisateur comme la porphyrine, tel est le cas de la porphyrie erythropoétique- congénitale (Sorg, 2004).



Les EOR apparaissent donc comme des molécules produites par divers mécanismes physiologiques. À certaines doses, elles sont utiles à l'organisme, mais leurs productions peuvent devenir excessives ou résulter de mécanismes toxiques exogènes à l'organisme tel que les radiations ionisantes, les radiations UV, les xénobiotiques pro-oxydants et les cytotoxines pro-inflammatoires (Fukagawa, 1999;Beaudeux *et al.*, 2006).

I.4. Stress oxydant et cibles moléculaires

I.4.1. Les lipides

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Flourie *et al.*, 2006 ; Koechlin-Ramonatou, 2006).

L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, et de la perméabilité des membranes (Hong et *al*, 2004). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Fukagawa, 1999; Marnett, 2000 ; Beaudeux et *al*, 2006). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonenal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Çanakçı et *al.*, 2005). La peroxydation lipidique, se déroule en trois étapes suivantes (figure 2) :

- ❖ **l'initiation:** l'attaque par un radical $\text{OH}\cdot$ du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné $\text{R}\cdot$ ($\text{OH}\cdot$ enlève un atome d'hydrogène du CH_2 puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence d'Oxygène le radical carboné est transformé en radical peroxy $\text{RO}\cdot_2$ (Martínez-Cayuela, 1995).
- ❖ **la propagation:** le radical $\text{RO}\cdot_2$ enlève un hydrogène à un acide gras insaturé (AGPI) voisin qui à son tour produira un radical $\text{R}\cdot$ puis un radical $\text{RO}\cdot_2$, une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions, les hydroperoxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décompositions ; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Martínez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel, 2001).
- ❖ **la terminaison :** cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante (Khohen et Nyska., 2002).

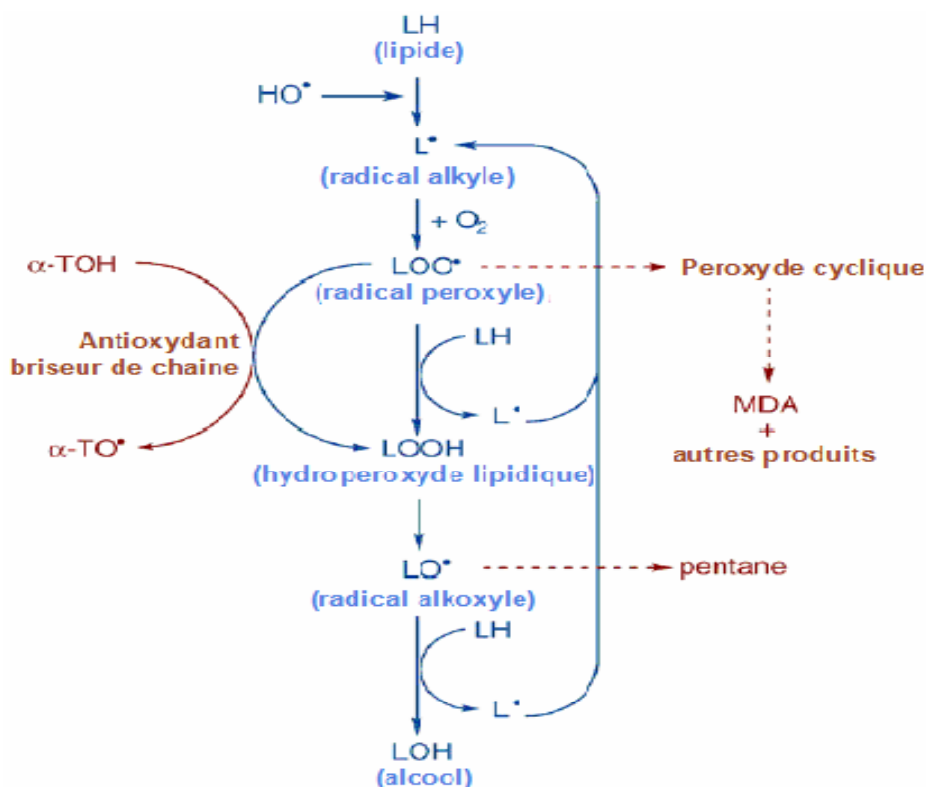


Figure 2. Etapes de la peroxydation lipidique (Sachdev et Davies, 2008)

I.4.2. Les protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les espèces oxygénées réactives. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle ou hydroxyle dans la protéine (Dean *et al.*, 1997; Ré *et al.*, 2005). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} et peuvent être classées en deux catégories :

- ❖ Cassure des liaisons peptidiques et modification de la chaîne protéique.
- ❖ Modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique.

Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de la fonction catalytique, fonction antigénicité, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Valko *et al.*, 2007).

I.4.3. Les acides nucléiques (ADN)

L'ADN qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est une cible majeure des ERO. Les radicaux $O_2^{\cdot -}$ et $OH^{\cdot}$ peuvent interagir avec les désoxyriboses, les bases puriques ou pyrimidiques de l'ADN, il en résulte : des bases oxydés, des sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (Favier, 2003). L'une des mutations les plus fréquentes est l'oxydation de la guanine en 8-hydroxy-guanosine. 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 (Hartmann et Niess, 2000).

1.5. Conséquences biologique du stress oxydant

En raison de leur réactivité élevée, les EOR interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré (Favier, 2003).

De nombreuses études, épidémiologiques et cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail *et al*, 2002) allant de l'athérosclérose (Harrison *et al*, 2003) au cancer (Valko *et al.*, 2007) tout en passant par les maladies inflammatoires (Densiov et Afanas'ev, 2005), cardiovasculaires et vieillissement cellulaire (Favier, 2003), neurodégénératives (Sorg, 2004) et le diabète (Pal Yu, 1994). La plupart des ces maladies apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (Sohal *et al.*, 2002).

❖ L'athérosclérose

C'est une étape de la maladie cardiaque impliquant des dépôts de graisses à l'intérieur des parois artérielles (Ceriello, 2004). L'implication du stress oxydant dans cette pathologie a été initialement révélée par l'oxydation des LDL, ce mécanisme se double en fait de l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les cellules de la paroi artérielle, qui concourt fortement à l'altération des fonctions vasculaires, effecteur majeur du processus d'athérogénèse et de fragilisation des lésions athéroscléroses (Beaudeux et *al.*, 2006 (a)).

❖ La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique qui concerne le tissu cartilagineux de certaines articulations (Borg et Reeber, 2004). Une grande partie de la connaissance sur le rôle de l'O₂⁻ en pathologie articulaire a été acquise indirectement par la présence de résidus nitrotyrosine dans le cartilage de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, ou par l'action d'ONOO⁻ *in vitro*, démontrant que l'association de l'O₂⁻ avec le NO[•] est délétère pour le cartilage (Afonso et *al.*, 2007).

❖ Le vieillissement

La théorie radicalaire du vieillissement accorde un rôle central au stress oxydant (Harman, 1956). Cette théorie postule qu'initialement au cours du vieillissement un stress oxydant s'installe et provoque le dysfonctionnement des cellules. L'effet du vieillissement sur la régulation de l'équilibre pro/antioxydant est très étudié sur de nombreux tissus tels que le cœur, le muscle squelettique, le cerveau et le foie (Servais 2004).

❖ Les Maladies neurodégénératives

Le stress oxydant est impliqué dans de diverse maladie neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et d'Alzheimer (Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Lim et Murtijaya, 2006). Dans cette dernière les radicaux libres sont responsables de la mort neurale qui pourrait être liée à un phénomène d'apoptose. La maladie de parkinson s'accompagne d'un stress oxydant en relation à la fois avec un dysfonctionnement mitochondrial et un défaut de l'élimination des protéines oxydées par les protéasomes (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

I.6. Systèmes de défenses antioxydants

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'anti-oxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (Buettner *et al.*, 1996).

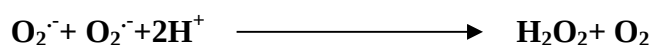
Dans notre organisme les antioxydants peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

I.6.1. Systèmes enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes ; la superoxyde dismutase (SOD), lacatalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet -}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

❖ La superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (Afonso *et al.*, 2007) selon la réaction suivante :



Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.*, 2002).

❖ La catalase

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

❖ Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries.

La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, et d'hydro peroxydés résultants de l'oxydation du cholestérol ou d'acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004). Le mécanisme réactionnel de cette détoxification enzymatique peut être résumé comme suit :

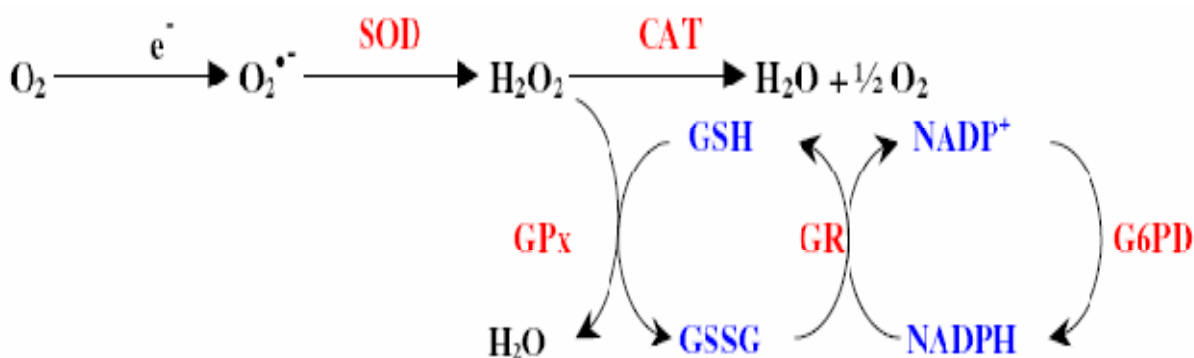


Figure 3 : Système de régénération du GSH.

I.6.2. Systèmes non enzymatiques

Ce groupe renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine et l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003). La bilirubine est capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^{+} permettant de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (Martínez-Cayuela, 1995).

Les oligoéléments, tels que le sélénium ; nécessaire à l'activité de nombreuses enzymes, à savoir les glutathion peroxydases (Gpx) (Favier, 2003), le zinc, un oligoélément essentiel dans la prévention des effets toxiques dus aux radicaux libres, il joue un rôle dans l'activité et le maintien de la SOD qui est un piègeur capital des ions superoxydes (Favier, 2003).

Le cuivre, un oligoélément dont le rôle est controversé : d'une part, il intervient comme coenzyme de la superoxyde-dismutase d'autre part, il favorise la formation des ERO (Goussard, 1999).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (Pincemail *et al.*, 2002 ; koechlin–ramonatxo, 2006). La vitamine piègeuse devient à son tour un radical qui sera détruit où régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (Pincemail *et al.*, 2002).

Les dérivés végétaux sont nombreux à être utilisés comme suppléments, qu'il s'agisse des principes extraits de légumes, d'épices, de fruits ou de plants médicinaux. Ils appartiennent à de nombreuses familles chimiques ; alcaloïdes, glucosides, dérivés indoliques, mais celles de composés phénoliques, particulièrement des acides phénoliques, des flavonoïdes et des tannins ont donné le plus de molécules (Favier, 2003).

La reconnaissance des composés phénoliques comme antioxydants naturels est maintenant bien acquise et est pour une part à l'origine du regain d'intérêt qu'on leur porte dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. En effet, un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de ces composés phénoliques dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydant telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires, les maladies ulcéreuses, le diabète ou maladies inflammatoires (Guedira, 2005 ;Macheix *et al.*, 2005 ; Gardeli *et al.*, 2008).

II. Les composés phénoliques

II.1. Définition

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8 000 molécules d'une extrême diversité (Edeas, 2007), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire, tels les acides phénoliques, à des composées hautement polymérisés comme les tannins (Lugasi et *al.*, 2003 ; Cheynier, 2005) ; ces molécules présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle et *al.*, 2004 ; Lotito et Frei, 2006).

II.2. Biosynthèse des composés phénoliques

Ils sont synthétisés à partir de deux voies bio-synthétiques :

II.2.1. La voie de shikimate

C'est une voie réactionnelle essentielle. Celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs dérivés, tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (Luttge et *al.*, 2000).

II.2.2. La voie de l'acétate

Cette voie issue de l'acétate, conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueurs variables menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones. De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques, due à cette double origine bio-synthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes (Luttge et *al.*, 2000).

II.3. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols naturels regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, un ou plusieurs groupes hydroxyles et d'autres constituants. Ce sont communément subdivisés en phénols simples, acides phénoliques (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique), coumarines, flavonoïdes, et en formes polymérisées : lignanes, lignines, tannins condensés (Bamforth, 1999).

II.3.1. Les acides phénoliques

Le terme d'acide- phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Bruneton, 1999). Les deux groupes essentiels des acides phénoliques sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ces derniers sont des dérivés de molécules non phénoliques qui sont l'acide benzoïque et l'acide cinnamique (Budic-Leto et *al.*, 2002).

II.3.1.1. Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure de base de type C6-C1 (Figure 4), composée d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone. Ces groupements hydroxyles phénoliques (OH) peuvent ensuite être méthylés (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

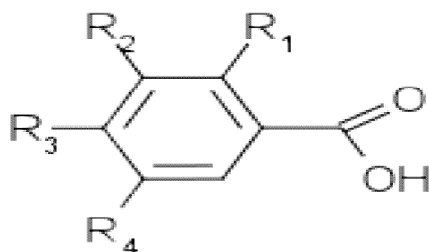


Figure 4: Structure générale des acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Tableau II: Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque (Guignard, 2004).

Nom	R1	R2	R3
Acide benzoïque	H	H	H
Acide hydroxy-4- benzoïque	H	OH	H
Acide méthoxy-4- benzoïque	H	OCH ₃	H
Acide protocatéchique	OH	OH	H
Acide gallique	OH	OH	OH
Acide vanillique	OCH ₃	OH	H

II.3.1.2. Les acides hydroxycinnamiques

C'est une classe très importante, dont la structure de base est de C6-C3 (Figure 5), dérivée de celle de l'acide cinnamique (Macheix *et al.*, 2006). Ces molécules ont une réactivité chimique grâce aux modifications du cycle benzénique, dont la molécule de base est appelée phényle propanoïde (l'acide caféique, p-coumarique, férulique et sinapique) qui sont produits par des séries d'hydroxylation et de méthylation (Cheynier, 2005 ; Chira *et al.*, 2008).

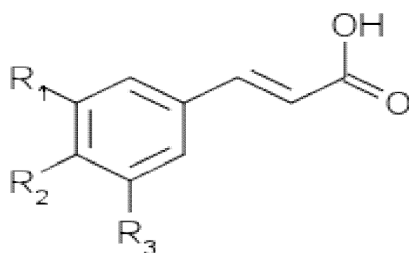


Figure 5: La formule générale des acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Tableau III : Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique (Guignard, 2004)

Nom	R1	R2	R3
Acide cinnamique	H	H	COOH
Acide coumarique	H	OH	COOH
Acide caféique	OH	OH	COOH
Acide férulique	OCH ₃	OH	COOH
Acide isoférulique	OH	OCH ₃	COOH

Dans les plantes, ces acides phénols sont souvent sous forme d'esters d'alcools aliphatiques ou d'esters de l'acide quininique, de l'acide rosmarinique ou de glycosides (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006 et Bruneton, 2009).

II.3.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques généralement produit par cyclisation d'un intermédiaire dérivé de l'acide cinnamique et de trois molécules de malonyl-CoA (Judd et *al.*, 1999), ils possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (Heller et Forkmann, 1993). Leur fonction principale semble être la coloration des plantes, ils sont beaucoup utilisés en leur systématique probablement parce que leur extraction et leur identification sont assez faciles. Ils sont parfois utiles pour estimer les relations phylogénétiques au niveau supérieur (Judd et *al.*, 1999). Les flavonoïdes sont connus principalement pour leur activité antioxydante. Ils sont présentés dans des organismes très divers. Ils ont tous une origine biosynthétique commune, ce qui explique qu'ils partagent la même structure de base (Bruneton, 2008).

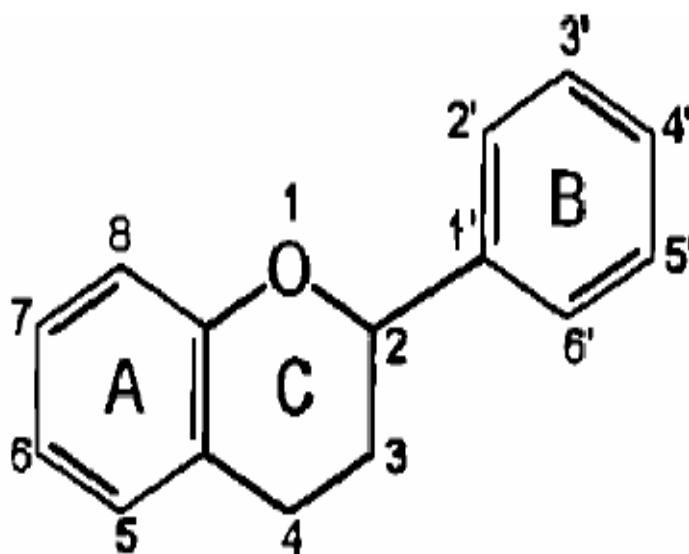
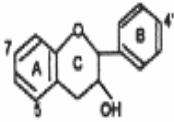
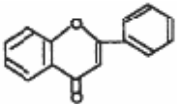
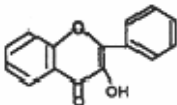
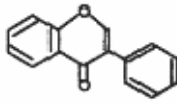
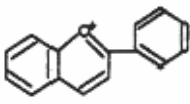


Figure 6: Structure de base des flavonoïdes (Richter, 1993).

Tableau IV: Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe(Heim et *al.*, 2002).

Classe	Structure	Flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-catechine (-)-epicalectchine Epigallocatechine gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		Chrysrine Apigénine Rutine Luteoline Luteoline glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH,3-rutinosé 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH,4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose
Flavonol		Kaempférole Quercétine Myricétine Tamarixétine	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe
Isoflavone		Genistine Genistéine Daidzine Daidzéine	5,4'-OH,7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH,7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanéidin		Apigénidine Cyanidine	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

II.3.4. Les coumarines :

La famille des coumarines est formée des composés phénoliques dérivés de la coumarine simple, la 2H-1-benzopyrane-2-one (Bruneton, 2009). Ce sont des substances naturelles organiques aromatiques. Ces composés possèdent des hydroxyles phénoliques qui peuvent être méthylés ou être engagés dans des liaisons hétérosides. Elles sont très largement distribuées dans le règne végétal (Richter, 1993). Toutes les coumarines sont substituées en C-7 par un hydroxyle phénolique (Bruneton, 2009).

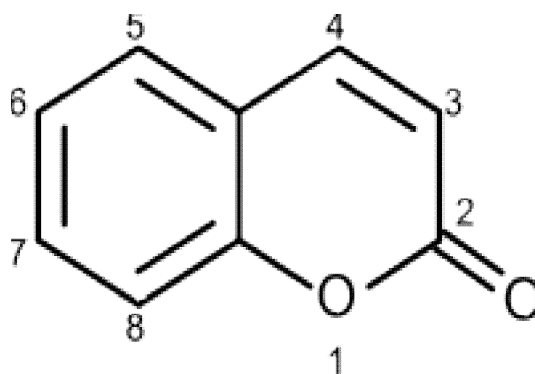


Figure 7: Formule générale des coumarines (Richter, 1993)

II.3.4. Les tannins

Les tannins sont des polyphénols polaires d'origine végétale (Berthrod et *al.*, 1999) qui existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, et racines, leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 300 (Cowan, 1999). Il est difficile de les séparer dans un extrait végétal, parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (Berthrod et *al.*, 1999).

Les tannins naturels sont subdivisés selon leur structure chimique en deux groupes : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Muetzel et becker, 2006).

II.3.4.1. Les tannins condensés ou catéchines

Les tanins condensés ou pro-anthocyanidines sont principalement des polymères et oligomères non hydrolysables de " Flavan -3- ols " (Figure 8), Les tanins condensés ne sont pas hydrolysables mais peuvent être oxydées par des acides forts libérant des anthocyanidines (Guignard, 2000; Macheix *et al.*, 2006; Bruneton, 2008).

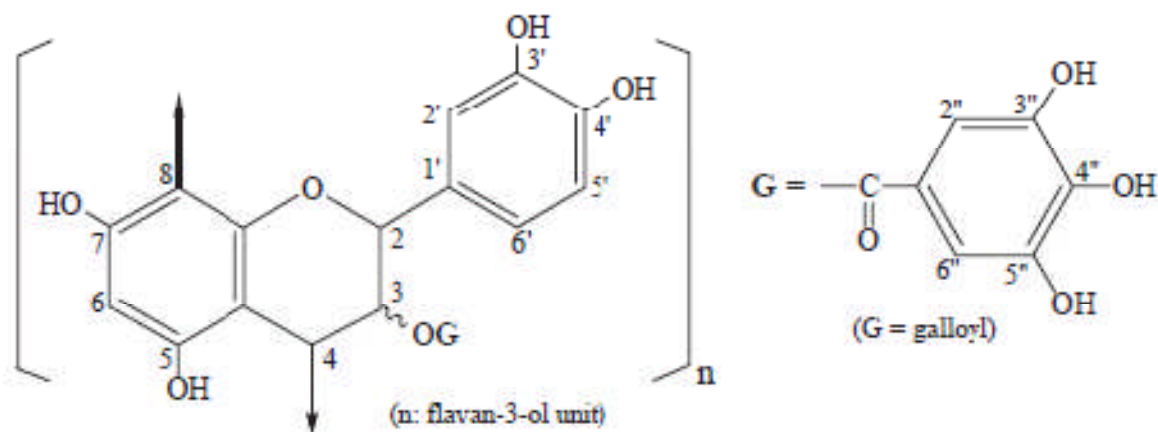


Figure 8: structure générale des tanins condensés (Cai *et al.*, 2005).

II.3.4.2. Les tannins hydrolysables

Se sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre qui est généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acide- phénol qui est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation exemple(acide chébulique=DHHDP) dans le cas des tanins classiques mais improprement dénommés tanins éllagiques(ellagitanins) (Figure 9) (Khanbabae et Van Tee, 2001 ; Derbel et Ghedira, 2005).

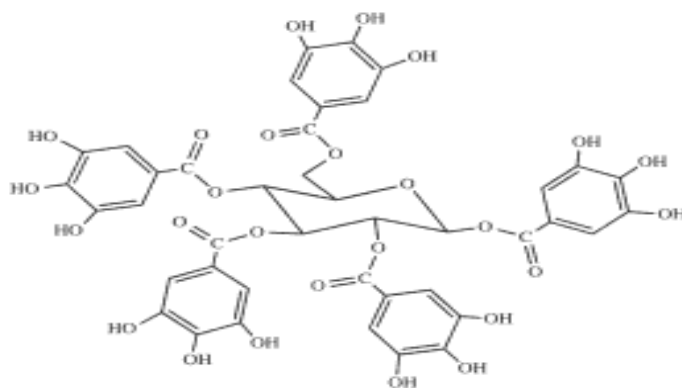


Figure 9: Structure des gallotannins (pentagalloylglucose) (Macheix *et al.*, 2006).

II.3. Les propriétés physicochimiques des polyphénols

Les phénols sont en principe :

- Solubles dans les solvants organiques polaires.
- Ils sont aussi solubles dans les solutions d'hydroxyde de sodium et de carbonate de sodium.
- Les acides phénoliques sont solubilisés par les hydrogénocarbonates.
- Ils sont extractibles par les solvants organiques en milieu légèrement acide.
- Les formes hétérosidiques de ces composés phénoliques sont, classiquement, solubles dans l'eau.
- Tous les phénols sont facilement oxydables, surtout en milieu alcalin (Bruneton, 1999).

II.4. Activités biologiques des composés phénoliques

II.4.1. Activité anti-cancéreuse

L'activité anti-tumorale est attribuée à la capacité de la catéchine d'inactiver le T-PA (tissue-type plasminogen activator) en greffant à celui-ci la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. La quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones. La croissance cellulaire peut être inhibée également par d'autres mécanismes, à savoir : la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes, et la réduction des radicaux libres. En effet, la catéchine augmente la résistance du collagène et inhibe l'activité de la collagénase (Marfak, 2003).

II.4.2. Activité antibactérienne

Les flavonoïdes montrent une activité antimicrobienne exemple des travaux de Harikrishna et *al.*, 2004), ont démontré le pouvoir antimicrobien d'un flavonoïde glycoside « prunine-6 »-O-P-coumarate » contre deux souches de bactéries gram+ (Bacillus subtilis et Staphylococcus albus) et deux bactéries gram- (Escherichia coli et Proteus vulgaris) (Harikrishna et *al.* , 2004).

II.4.3. Activité anti-inflammatoire

Sous l'action de la cyclo-oxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Landolfi et son groupe ont montré que certains flavonoïdes tels la quercétine et la myricétine, l'apigénine et la chrysine sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes en inhibant ces enzymes (Marfak, 2003).

II.4.4. Activité anti-ulcéreuse

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la guérison de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres, et également l'inhibition de la production de leucotriènes. D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés antiulcéreuses de la quercétine, naringénine, rutine et kaempférol, et la production de PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes (Marfak, 2003).

II.4.6. Activité antioxydant des composés phénoliques

L'activité antioxydant des polyphénols est due à leur capacité à piéger les radicaux libres, à chélater les ions métalliques et à inhiber les enzymes responsables de la production des ROS (Balasundram et *al.*, 2006).

II.4.6. 1. 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).

La capacité scavenger des radicaux libres est attribuée en premier lieu à la réactivité élevée des groupements substitués OH des flavonoïdes selon la figure suivante :

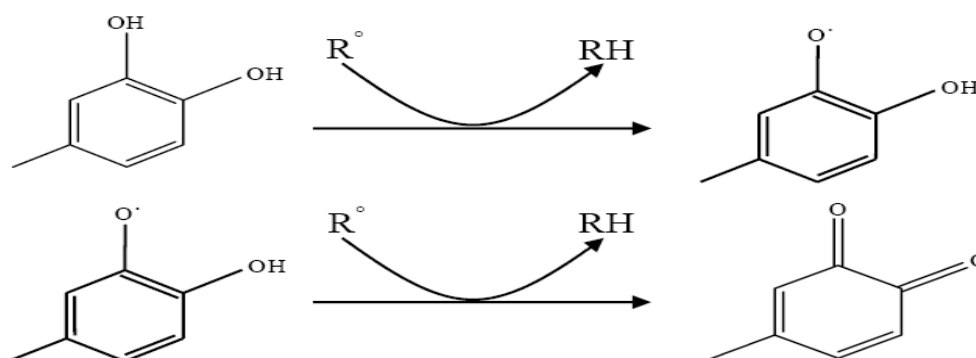


Figure 10: Mécanisme de l'activité scavenger des flavonoïdes via la fonction catéchol (Pietta, 2000).

L'antioxydant est transformé en un radical qui doit être suffisamment stable pour inhiber la formation d'un autre radical et arrêter ainsi la propagation de la chaîne radicalaire (Favier, 2003). De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres (Balasundram et *al.*, 2006).

II.4.6.1. Relation structure-activité

L'activité antioxydant est étroitement liée aux propriétés structurales des composés phénoliques (Heim et *al.*, 2002).

- Le degré d'hydroxylation, la position et l'arrangement spatial du groupement **OH**.
- La présence de la double liaison entre **C2-C3** en conjugaison avec la fonction **4-OXO**.
- La présence du groupement **3-4catéchol** dans le noyau **B**.
- Le degré de polymérisation et la présence d'autres fonctions (Heim et *al.*, 2002).

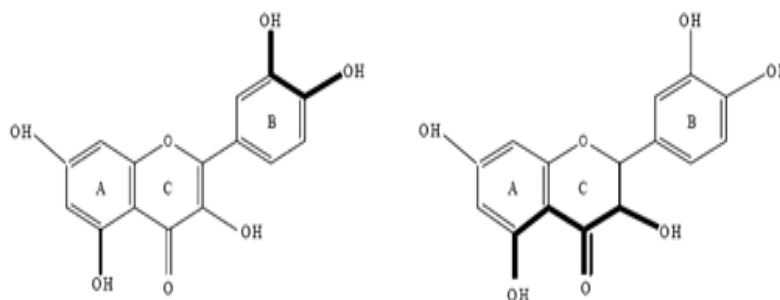


Figure11: Groupes fonctionnels de l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes (Soobrattee et *al.*, 2005).

❖ Les groupements hydroxyles

L'arrangement spatial des groupements substitués hydroxyles peut être un grand déterminant de l'activité antioxydant ainsi que l'inhibition de l'activité enzymatique. La capacité scavenger des radicaux libres est attribuée en premier lieu à la réactivité élevée des groupements OH des flavonoïdes (Heim et *al.*, 2002).

Le kaempférol (flavonol) avec un seul groupement hydroxyle est moins actif que la quercétine (flavonol) avec deux groupements hydroxyles en ortho (Heim et *al.*, 2002).

La structure conjuguée 3'- 4'catéchol forme le groupe pyrogallol qui a été considéré comme accélérateur de l'activité antioxydant (Balasundram et *al.*, 2006) ; l'absence du 3-OH chez les flavones expliquerait leur faible activité antioxydante (Pietta, 2000).

En effet, l'activité antioxydant des acides phénoliques dépend du nombre et des positions des groupements hydroxyles liés à des groupements fonctionnels carboxyliques. La substitution des groupements hydroxyles en positions 3 et 5 avec un groupement méthoxyl comme l'acide syringique réduit l'activité antioxydant (Balsundram et *al.*, 2006).

❖ Double liaison entre C2 et C3 et la fonction 4-oxo

Il a été démontré que les flavonoïdes ayant une insaturation entre le carbone 2 et 3 présentent de plus faibles IC₅₀ et donc une meilleure activité antioxydante, nous pouvons citer un exemple, la quercétine et la (+) catéchine qui comportent les mêmes groupes sauf que la (+) catéchine est dépourvue de l'insaturation et du groupement 4-OXO, cette dernière exhibe une capacité antioxydant inférieure de moitié à celle de la quercétine. (Heim et *al.*, 2002).

❖ L'O-methylation

La différence dans l'activité antioxydant des flavonoïdes polyhydroxylés et les polyméthoxylés est le plus souvent due à des différences dans l'hydrophobicité et dans leur planarité moléculaire, la quercétine a un potentiel piègeur du radical peroxyde élevé suivi des dérivés O-Méthylé et O-glycoylés. La suppression de l'activité antioxydant par O-méthylation peut refléter des effets stériques qui perturberaient la planarité de la structure (Heim et *al.*, 2002 ; Pietta, 2000).

La substitution des groupements hydroxyles du noyau B par des groupements méthyles altère le potentiel redox qui affecte la capacité antioxydant (Balasundram et *al.*, 2006).

❖ Les groupements carbohydrates

Les flavonoïdes aglycones ont un plus grand potentiel antioxydant que leurs correspondants glycosylés. Plusieurs études ont rapporté que la substitution du 3-OH par un groupement méthyle ou glycosyle diminue l'activité de la quercétine et du kaempferol, comme la O- methylation, la glycosylation interfère la structure planaire et la délocalisation des électrons (Heim et *al.*, 2002; Pietta, 2000).

❖ Le degré de polymérisation

L'effet des procyanidines trimères est plus efficace que les flavonoïdes monomériques sur l'anion superoxyde (Heim et *al.*, 2002), en effet les tannins hydrolysables et les procyanidines présentent des propriétés antioxydantes significatives, ils agissent comme donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation (Soobrattee et *al.*, 2005).

L'effet scavenger de l'epigallocatechine gallate (EGCG), une molécule oligomérique des tannins est due la présence de la forme galloyl en position C3 avec trois groupements hydroxyles (Okuda, 2005).

II.4.6. 2. Chélation des ions métalliques

Les flavonoïdes chélatent efficacement les ions métalliques tels que le fer et le cuivre, qui sont responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité de chélater les ions métalliques, les éléments essentiels sont :

- Le noyau catéchol sur le cycle B.
- Les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C.
- Les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Pietta, 2000 ; Marfak, 2003).

Le complexe chélateur des cations divalents peut se former entre le 5-OH et le groupement 4-oxo ou entre le 3' et le 4'-OH (Heim et *al.*, 2002).

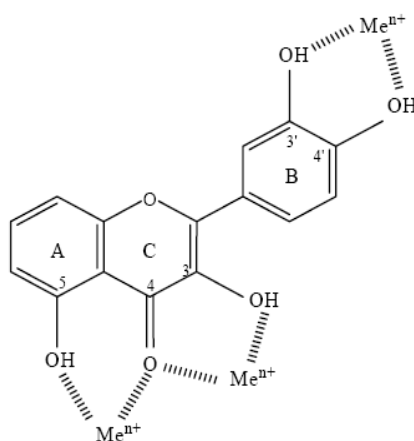


Figure 12: Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) (Pietta, 2000).

II.4.6. 3. Inhibition des enzymes responsables de la production des ERO

II.4.6. 3.1. La xanthine oxydase

La XO joue un rôle physiologique important dans l'absorption du fer dans l'intestin et sa mobilisation dans le foie; elle possède aussi une activité antimicrobienne par le biais des radicaux libres (Frederik et Bosh, 1996). En plus de ce rôle, la XO participe dans différentes pathologies telle que la xanthinurie et la goutte.

Nagao et ses collaborateurs ont déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice sur la XO (Nagao et al., 1999). Le pouvoir Inhibiteur des flavonoïdes sur la XO est en rapport avec leurs propriétés structurales. Les groupements hydroxyles en C5 et C7 et la double liaison entre C2 et C3 sont essentiels pour une forte activité inhibitrice (Cos et al., 1998). Aussi, le groupe carbonyle en C4 contribue à des liaisons hydrogènes favorables et à des interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et le site actif de la XO (Lin et al., 2002).

La chrysine et la lutéoline appartenant à la classe des flavones inhibent fortement l'activité de la XO; les IC_{50} respectives sont 5,02 μmol et 0,96 μmol , mais le flavone lui-même ne l'inhibe pas. La quercétine, un dérivé 3- hydroxy de la lutéoline, est l'inhibiteur le plus puissant de la XO avec une $IC_{50} = 0,44 \mu\text{mol}$.

Le rhamnetine, avec un groupe 7 methoxy, est un dérivé de la quercétine et possède un effet inhibiteur beaucoup plus faible dont l' $IC_{50} > 50 \mu\text{mol}$. l'isorhamnetine, un dérivé 3'-methoxy de la quercétine, possède le même effet inhibiteur que ce dernier avec une $IC_{50} = 0,40 \mu\text{mol}$ (Nagao et al., 1999). La genisteine et la daidzeine sont des isoflavones qui ont un effet inhibiteur faible même s'ils possèdent un groupe hydroxyle en C7. De plus l'hespéridine et la taxifoline sont des dérivés 2,3 dihydroxy de la quercétine et de l'isorhamnetine, respectivement, ont un effet inhibiteur faible sur la XO. L'epicatechine gallate et l'epigallocatechine gallate sont des flavanols qui possèdent un groupe galloyl sur le C3 et ont un faible effet inhibiteur sur la XO.

Les anthocyanidines inhibent modérément la XO, même si elles ont un groupement 7-hydroxyle et une structure planaire; le cation flavylum pourrait être responsable de la diminution de l'activité inhibitrice (Nagao et al., 1999).

D'après des études menées par Chang et ses collaborateurs (1993), la (+) catéchine n'a aucun effet inhibiteur sur la XO, un résultat confirmé par Nagao et ses collaborateurs (1999); d'un autre côté, un effet inhibiteur de la catéchine ($KI = 304 \mu\text{mol}$) a été démontré après un temps de préincubation de l'inhibiteur et l'enzyme, aussi le baicaleine, un 5, 6, 7 trihydroxyflavone a été jugé inhibiteur de la XO comme la quercétine.

II.4.6. 3.2. Les lipooxygénases (LOX) et les cyclooxygénases (COX)

Les LOX et les COX sont des enzymes qui participent à l'oxydation de l'acide arachidonique, substrat naturel chez les mammifères ; cette oxydation donne lieu à la synthèse des prostaglandines, des thromboxanes, des prostacyclines et de leucotriènes, ces métabolites causent l'inflammation (Chan 1973).

Les flavonoïdes possèdent une variété d'activités biologiques telles que anti-inflammatoire et anticancéreuse (Havsteen, 1983 ; Middleton et Kandaswami, 1992 ; Kim et al., 1996). Ces derniers inhibent les COX et les LOX, le mécanisme d'inhibition n'est toujours pas clair, mais il a été démontré qu'une double liaison C 2-C3 dans noyau C- des flavonoïdes pourrait être importante pour l'inhibition de ces enzymes.

Au cours de l'inhibition, la LOX et la COX s'attachent au noyau benzopyrone du flavonoïde (Melzig, 1996 ; Huang et al., 1999 ; Kavutru et al., 1999), ainsi qu'aux groupements hydroxyles libres en C5 et C7 du flavonoïde (Beiler et al., 1951).

Les flavones, flavonols et certains autres flavonoïdes empêchent l'accumulation des eicosanoides produits par les COX et les LOX (Baumann et al., 1980 ; Kimura et al., 1986 ; Welton et al., 1988 ; Reddy et al., 1991), parmi ; les flavonols, la quercétine a montré une activité inhibitrice faible sur la COX des plaquettes sanguines (Ferrandiz et al., 1990), d'autres dérivés flavonols comprenant le fisétine, kaempférol et la quercétine se sont avérés des inhibiteurs de 5-LOX (Laughton et al., 1991). Cirsiol est un inhibiteur relativement spécifique de la 5-LOX (Yamamoto et al., 1984).

Certaines flavones telles que la chrysine, le 3-hydroxyflavone et le galangine sont des inhibiteurs de la COX (Laughton et al., 1991), l'artonine E, une autre flavone, a montré une activité inhibitrice efficace sur la 5, la 12 et la 15-LOXs (Kimura et al., 1986 ; Reddy et al., 1991). La Baicaleine, est un inhibiteur sélectif de la 12-LOX (Sekiya Okuda, 1982). l'apigénine inhibe sélectivement l'activité de la 15-LOX avec une valeur $IC_{50} : 4,0 \pm 1\mu M$ (Sadik et al., 2003). Kim et ses collaborateurs (1998), ont trouvé que l'amentoflavone, est un biflavonoïde et un inhibiteur sélectif de la COX, comparable à l'indométhacine (molécule de synthèse).

Notre étude porte sur l'extraction, le dosage ou quantification des composés phénoliques (phénol totaux, flavonoïdes et tannins) d'écorce et de feuilles d'une plante médicinale de la famille des oléacées ; *Fraxinus angustifolia* utilisée localement dans le traitement des pathologies à caractère inflammatoire (la goute et les rhumatismes) ainsi qu'à l'évaluation de l'activité biologique principalement antioxydant des différents extraits par plusieurs méthodes ; pouvoir réducteur (FRAP), effet scavenger du radical ABTS⁺., de l'anion super oxyde et du nitrique oxyde et, par la suite, l'isolement des fractions douées de ces activités par chromatographie sur colonne et la caractérisation de ces dernières par chromatographie sur couche mince.

II.1 Matériel végétal

Nous avons retenu dans le cadre de cette étude l'écorce et les feuilles d'une plante médicinale de la famille des oléacées. Il s'agit de *Fraxinus angustifolia* appelée communément frêne et localement Aslen ou Dardar (figure 13).



Figure 13: Photographie des parties utilisés de *Fraxinus angustifolia* (A : écorce, B : feuilles).

II.1.1. Description du matériel végétal

Fraxinus angustifolia est un arbre vigoureux et caduc qui peut atteindre 20 mètres de longueur, à écorce d'un beau gris (Bernard, 1997). Originaire d'Europe, commune des régions humides de toute l'Algérie septentrionale (Rameau et *al.*, 1989). Caractérisé par des petites fleurs vert tendre, discrètes, sans calice ni corolle, réunies en grappes. Les fleurs s'épanouissent au début du printemps et donnent des fruits secs appelé samares, de forme allongée et à aile échancrée au sommet (Thomassine et Lacroix, 2005).

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont opposées, composées, finement dentées, de formes oblongues, pointues à leurs extrémités et se divisent en nombre impaire (13 à 15) folioles (Bailly, 2004).

I.1.2. Classification Selon Gaussen et *al.* (1982).

Règne : végétal.

Groupe : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Sous-classe : Asteridaes.

Ordre : Oléales.

Famille : Oléacées.

Genre : Fraxinus.

Espèce : *Fraxinus Angustifolia*

I.1.3. Usages thérapeutiques

Les feuilles contiennent des flavonoïdes, des tannins, du mucilage et des triterpènes. Elles ont un effet anti inflammatoires, diurétiques et antirhumatismales. Les feuilles et les fruits du frêne sont astringents, laxatifs et fébrifuges. L'écorce est anti-hémorroïdaire, fébrifuge et astringente (Baba Aissa, 2000 ; Mazoyer, 2002).

I.1.4. Récolte

Les feuilles ont été récoltées au mois de juin et les écorces au mois de septembre 2009, dans la forêt d'Azru n Bechar dans la région d'Amizour, wilaya de Bejaia ; un endroit naturel loin de toute perturbation et impact de pollution susceptible de modifier la composition chimique de l'espèce.

II.1.5. Séchage, broyage et tamisage

Les feuilles et les écorces récoltés ont été séchées à l'air libre et à température ambiante dans un endroit aéré et ombragé.

Après séchage, à l'aide d'un broyeur électrique les feuilles et l'écorces ont été broyés jusqu'à l'obtention des poudres fines. Ces dernières ont été tamisées, à l'aide d'un tamis de granulométrie de 63µm, pour récupérer des poudres très fines, afin d'optimiser l'extraction.

II.1.6. Extraction des composés phénoliques

Le protocole adopté pour l'extraction des composés phénoliques à partir des poudres des feuilles et d'écorce est celui de Chiang et ses collaborateurs (1994), qui consiste à macérer une quantité de la poudre fine dans l'éthanol à raison de 1g pour 4ml de solvant, le mélange est soumis à une agitation pendant 24H, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le mélange est décanté, par la suite le surnageant est centrifugé (3000g/10min). Après évaporation totale de ce dernier, l'extrait éthanolique est récupéré. Ce dernier est fractionné dans différents mélanges de solvants : acétate d'éthyle/eau et chloroforme/eau à raison de (3:1) (v/v). Les différentes phases sont séparées et évaporées pour obtenir en fin de l'extraction cinq extraits (éthanolique, acétate d'éthyle, aqueux acétate d'éthyle, chloroforme et aqueux de chloroforme) (figure 14). Le taux d'extraction de chaque étape est calculé par la formule suivante :

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

P_1 : Poids de l'extrait après évaporation.

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

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

II.2. Dosage des composés phénoliques

II.2.1. Dosage des phénols totaux

L'estimation de la teneur en phénols totaux des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* est réalisée selon la méthode de Djeridane et ses collaborateurs (2006).

la réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdène-phosphotungstène du réactif de Folin-Ciocalteu vers un complexe de couleur bleue dont l'intensité dépend du nombre de groupements hydroxyles ainsi que de leur position dans les molécules.

Dans des tubes à essais, sont mélangés 100µl de la solution d'extrait, 500µl du réactif de folin-ciocalteu, 1ml d'eau distillée et 1,5ml d'une solution de carbonate de sodium à 20%. Après 2 heures d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765nm. Les concentrations en phénols totaux des extraits sont exprimées en mg d'équivalent catéchine/g d'extrait, en se référant à une courbe d'étalonnage (annexe1).

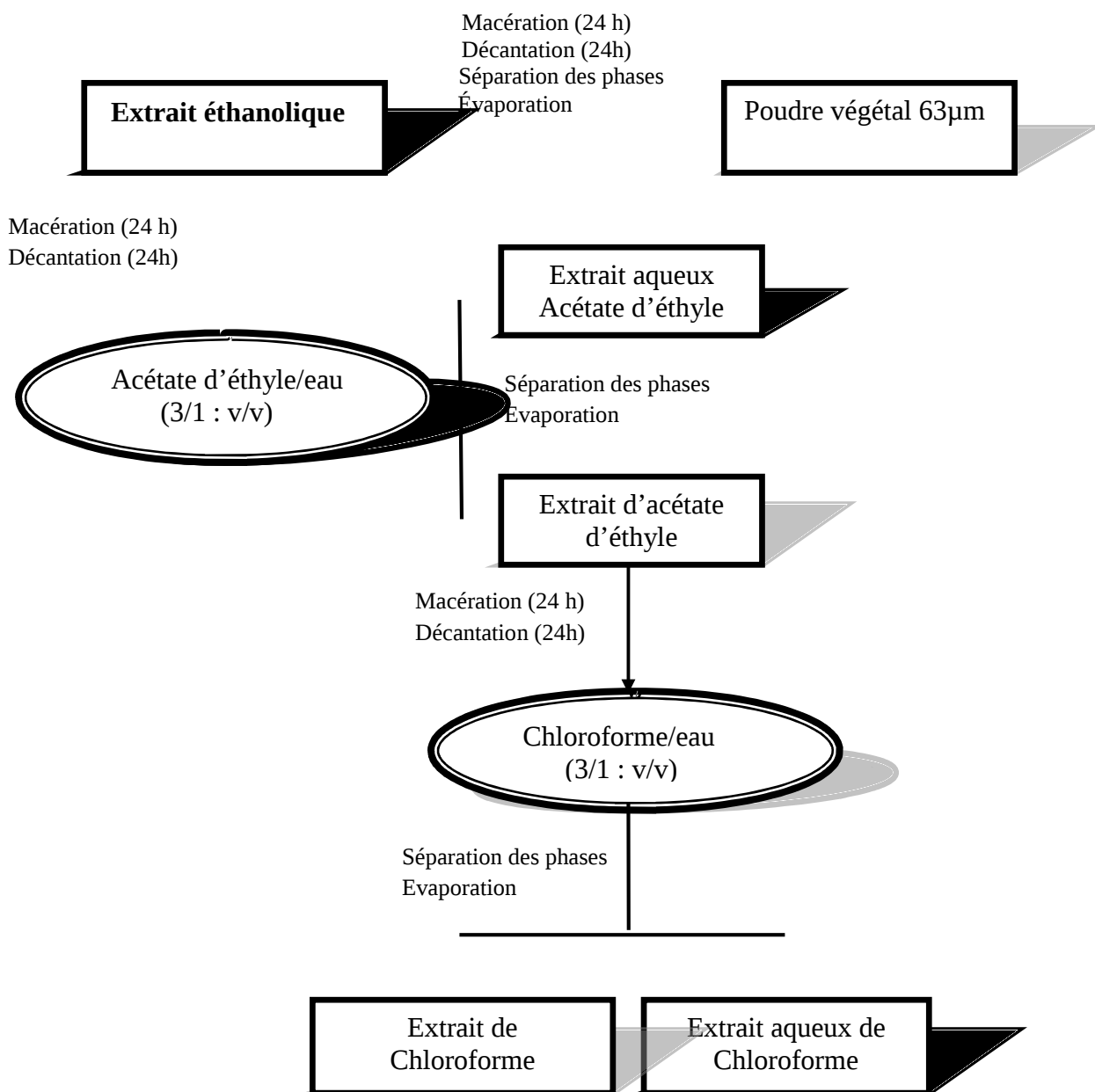


Figure 14 : Procédé d'extraction des composés phénoliques (Chiang *et al.*, 1994).

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des différents extraits est déterminée suivant la méthode de Mimika-Dukié (1992) in (Maksimović et al., 2004). Ces composés forment des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3), qui donnent à la solution une coloration jaunâtre dont l'absorption est mesurée à 430nm.

Un volume de 500 μl d'une solution de chlorure d'aluminium est ajouté à 1 ml de la solution d'extrait, le mélange est incubé pendant 10min à l'obscurité et l'absorbance est mesurée à 430nm. Les concentrations en flavonoïdes sont déterminées à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la rutine comme standard et les résultats sont exprimés en mg d'équivalent rutine/g d'extrait (annexe1).

II.2.3. Dosage des tannins

La méthode décrite par Hagermn et Butler (1978) est utilisée pour déterminer la teneur en tannins des différents extraits. Cette dernière mesure la quantité de tannins hydrolysables ou condensés capables de précipiter la protéine standard BSA (bovin sérum albumin).

Un volume de 2ml de la solution BSA est mélangé à 1 ml de la solution d'extrait, incubé à 4C° pendant 24heurs et centrifugé à 3000g pendant 15 minutes. Le culot récupéré est dissout dans 4 ml de solution SDS/ TEA et 1ml de chlorure de Fer (FeCl_3) sont ajouté à la solution. Après 15 min d'incubation, l'absorbance est mesuré à 510 nm. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide tannique/g d'extrait en se référant à une droite d'étalonnage (annexe1).

II.3. Etude de l'activité antioxydant de *Fraxinus angustifolia*

L'activité antioxydant des extraits végétaux traduit leur aptitude à réduire et piéger les radicaux libres de l'organisme. L'activité réductrice ainsi que anti radicalaire contre le radical ABTS^+ , l'anion super oxyde et le monoxyde d'azote des différents extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont évaluées.

II.3.1. Etude de l'activité réductrice (FRAP)

Le pouvoir antioxydant d'une solution comme les extraits végétaux est déterminé par le teste FRAP ou Feric reducing antioxidant power. A faible pH et à 37°C, le complexe tripyridyletriazine ferrique (TPTZ-Fe³⁺) est ajouté à la solution d'extrait. Les antioxydants présent réduisent le complexe en sa forme ferreux (TPTZ-Fe²⁺) et son absorbance est mesuré à 593 nm (Benzie et *al.*, 1996).

Un volume de 100µl de la solution d'extrait de *Fraxinus angustifolia* sont mélangés avec 3ml de la solution FRAP [25ml du tampon acétate de sodium (300mM); 2.5ml TPTZ (10 mM) dissout dans du HCl (40mM) ; 2.5 ml de la solution chlorure de Fer (FeCl₃, 6 H₂O) (20 mM)], le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 5min et l'absorbance est mesurée à 593nm (Maksimović et *al.*, 2004). La concentration des composés réducteurs présents dans l'extrait est exprimée en mg équivalent acide ascorbique et acide caféique en se référant à des courbes d'étalonnage (annexe 2).

II.3.2. Activité scavenging du radical ABTS^{•+}

Cette méthode est basée sur la capacité des composés à réduire le radical-cation ABTS^{•+}, acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), qui présente une bande d'absorption dans le visible avec trois maxima à 645, 734 et 815 nm. Le radical est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec différents composés, comme le dioxyde de manganèse (MnO₂, Miller et *al.*, 1996), la met myoglobine (Miller et *al.*, 1993), le peroxyde d'oxygène (H₂O₂, Cano et *al.*, 2002) ou le persulfate de potassium (Re et *al.*, 1999). Le composé à tester est ajouté au radical préformé et l'absorbance résiduelle du radical ABTS^{•+} est mesurée à 734 nm (Schlesier et *al.*, 2002).

L'activité scavenging du radical ABTS^{•+} des extraits de feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été mesurée selon la méthode rapporté par Re et ces collaborateurs (1999). Le persulfate de potassium est dissout dans l'eau distillée à une concentration de 2,45 mM, et l'ABTS est ajouté à une concentration de 7mM. Le mélange est ensuite conservé à l'abri de la lumière pendant 12 à 16 h avant l'utilisation, Ce laps de temps permet l'oxydation complète de l'ABTS. La solution d'ABTS^{•+} est diluée avec l'eau distillée pour avoir une absorbance égale à 0,7 à 734 nm.

Un volume de 10µl de chaque extrait ou de molécule standard d'une concentration de 100 µg /ml est ajouté à 1ml de la solution de l'ABTS^{•+} et l'absorbance est mesurée à 734 nm.

L'activité des composés est alors exprimée par la capacité antioxydante équivalente Trolox(TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1mM de l'extrait testé en se référant à une courbe d'étalonnage (annexe 2) et en pourcentage d'inhibition calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Scavenging du radical ABTS}^{\bullet+} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : absorbance du control (sans extrait).

A₁ : absorbance du teste (avec extrait ou standard).

Les extraits éthanolique, acétate d'éthyle, aqueux acétate d'éthyle, chloroforme et aqueux chloroforme des feuilles et d'écorce, ainsi que les molécules standards ont fait l'objet d'une étude en fonction de la concentration afin de déterminer les IC₅₀ à des intervalles de concentrations de 6,25 à 100µg /ml.

II.3.3. Activité scavenger de l'anion superoxyde(O₂^{•-})

L'effet scavenger des différents extraits de *Fraxinus angustifolia* vis-à-vis de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) est évalué en utilisant un système purement chimique PMS-NADH-NBT suivant le protocole décrit par Maximovie et ses collaborateurs (2004), basé sur la méthode de Liu et *al.* (1997). La génération du O₂^{•-} se fait par l'oxydation de β-NADH en présence de Phenazine methosulphate (PMS) et de l'oxygène moléculaire, elle est couplée à la réduction du nitro bleu tetrazolium (NBT) en formazan qui absorbe à 560 nm (Ani et *al.*, 2006) .

La réaction est conduite dans un tampon HCL (100µM, pH 7,4) en présence de β-NADH (936µM) et de NBT (300µM). Ce mélange est initialement incubé avec ou sans extraits pendant 2 min. La génération de l'O₂^{•-} est induite par l'addition de PMS (120 µM). Après 5 minutes d'incubation à 25°C, l'absorbance est mesurée à 560 nm.

L'effet des extraits de *Fraxinus angustifolia* sur le superoxyde produit par le système PMS-NADH est traduit en pourcentage d'inhibition de la formation de formazan par rapport au contrôle négatif (contenant tous les réactifs à l'exception de l'extrait). L'acide caféique est utilisé comme standard.

$$\% \text{ Scavenging de l'anion superoxyde} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : absorbance du control (sans extrait).

A₁ : absorbance du teste (avec extrait ou standard).

Les extraits éthanolique, aqueux acétate d'éthyle, aqueux chloroforme d'écorce et éthanolique, acétate d'éthyle, aqueux chloroforme des feuilles, ainsi que l'acide caféique ont fait l'objet d'une étude en fonction de la concentration afin de déterminer les IC₅₀ à des intervalles de concentrations de 0 à 400µg /ml.

II.3.4. Activité scavenging du Radical nitrique oxyde (NO[•])

Le nitroprusside composée de sodium (Sodium nitroprusside) est connue pour se décomposer dans le soluté à pH physiologique (7.2) produisant le nitrique oxyde (Marcocci et al, 1994). L'oxyde nitrique réagit avec l'oxygène pour former des produits stables : nitrite ou nitrate. Les substances exerçant un effet scavenger sur l'oxyde nitrique provoquent une diminution de la production de nitrite. La concentration de nitrite dans une solution aqueuse est déterminée par la réaction des nitrites avec le réactif de Greiss. La mesure spectrophotométrique à 550 nm du produit formé permet de quantifier les nitrites en solution (Gorinstein et al., 2004). La capacité des extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* à piéger le monoxyde d'azote a été déterminé suivant la méthode développée par (Marcocci et al, 1994).

1 ml de solution du sodium nitroprusside (10mM) préparé dans un tampon phosphate salin (pH =7,2) est ajouté à 1ml de la solution d'extrait ou de standards (acide caféique, acide gallique et quercétine) d'une concentration de 100µg /ml. Après une incubation de 3 heures à 25°C, 1ml de réactif de Greiss [1% de sulfanilamide, 0,1% naphtyle éthylène diamine dichloride et 5% acide phosphorique (H₃PO₄)] est ajouté. L'absorbance du chromophore formé est mesurée à 550nm. Le pourcentage du monoxyde d'azote piégé est calculé comme suit :

$$\% \text{ Scavenging du monoxyde d'azote} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : absorbance du control (sans extrait).

A₁ : absorbance du teste (avec extrait ou standard).

Les extraits éthanolique, acétate d'éthyle, aqueux acétate d'éthyle, chloroforme et aqueux chloroforme des feuilles et d'écorce, ainsi que les molécules standards ont fait l'objet d'une étude en fonction de la concentration afin de déterminer les IC_{50} à des intervalles de concentrations de 6,25 à 100 μ g /ml.

II.4. Chromatographie sur colonne de gel de silice

La silice de chromatographie sur colonne (0,063mm-0,2mm) est préparée dans le chloroforme, l'échantillon à fractionner (20mg /ml de 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. Les fractions sont récupérées progressivement avec une élution de polarité croissante, chloroforme/acétate d'éthyle (90 :10/v : v), acétate d'éthyle /méthanol (50 :50/ v : v), acétate d'éthyle/méthanol (20 :80/ v : v), méthanol/eau (10 :90/ v : v) et eau/acide acétique (99,75 : 0 ,25/ v : v), 5 fractions sont ainsi récupérées, séchées et évaluées pour leurs activités antioxydantes.

II.5.Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice), en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage. Les plaques de la chromatographie sont préparées en étalant une fine couche de gel de silice (Silica gel 60 F254 avec indicateur fluorescent) sur des plaques en verre à une épaisseur de 0 ,5cm. Après réactivation de la plaque à 110°C pendant 30mn, deux lignes (ligne de dépôt et ligne du front d'éluant) sont tracées, limitant une distance de migration de la phase mobile de 14 cm. Un volume de 10 μ l d'extrait et/ou de fraction (10mg /ml) et molécules de référence (5 mg/ml) sont déposés sur la plaque de silice au niveau de la ligne de dépôt à environ 2cm du bord inférieur de la plaque. La plaque est ensuite introduite dans la chambre de migration préalablement saturée par les vapeurs de la phase mobile. Deux systèmes de migration sont utilisés (éthyle acétate, acide acétique, acide formique, eau « 100 :11 :11 :26 » ; v/v/v/v) et (hexane, éthyle acétate et acide formique « 50 :45 :5 » ; v/v/v). Le déplacement des molécules du mélange dépendra des interactions entre la phase mobile (mélange de solvant) et la phase stationnaire (silice).

Après développement, les plaques sont séchées sous hotte, examinées à la lumière du jour et révélées avec la vanilline sulfurique préparé selon la méthode décrite par Eloff et ses collaborateurs (2005) et chauffées à 110°C pendant 10 minutes. Chaque constituant d'un mélange est mis en évidence par une tâche et caractérisé par un rapport frontal (R_f).

Les rapports frontaux des spots issus de la séparation sont calculés et comparés à ceux des molécules de références permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits.

II.6. Etude statistique

Chaque test est réalisé en trois essais et les résultats représentent la moyenne des trois mesures. Une étude statistique a été réalisée pour la comparaison des résultats et la mise en évidence des différences significatives entre les extraits, et ce pour chaque méthode en appliquant une analyse de la variance (ANOVA) à l'aide d'un logiciel STATISTICA 5.5. Le degré de signification des résultats est pris à la probabilité $p < 0,05$.

III.1. Extraction des composés phénoliques

La méthode utilisée pour l'extraction des composés phénoliques a été choisie pour son caractère de sélectivité, visant ainsi l'optimisation de l'extraction des composés susceptibles d'avoir une activité antioxydant. Plusieurs solvants de polarités distinctes ont successivement été utilisés dans les différentes étapes, dont la polarité par ordre décroissant est comme suit : l'eau, l'éthanol, l'acétate d'éthyle et le chloroforme. Il est à noter que les extractions utilisant des solvants de faibles polarités, à savoir le chloroforme et l'acétate d'éthyle sont accompagnées de solvants polaires (eau). Le premier solvant utilisé l'éthanol extrait le maximum de composés phénoliques (Cowan, 1999). Les taux d'extraction obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

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

Extraits	Taux d'extraction (%)	
	Ecorce	Feuilles
Éthanol	5,6	11,42
Acétate d'éthyle	23,5	43,75
Aqueux Acétate d'éthyle	49,81	29,9
Chloroforme	61	89,63
Aqueux de Chloroforme	26	10

D'après nos résultats, nous constatons qu'un faible taux d'extraction a été obtenu à partir de la première étape utilisant l'éthanol comme solvant ; (11,42%) pour les feuilles et (5,6%) pour l'écorce, ce qui confirme que l'extraction dépend du matériel (matrice) végétal (Contini et al., 2008) et de la richesse des feuilles en composés phénoliques.

Pour ce qui est de la deuxième et troisième étape de l'extraction, on note que les taux les plus élevés pour les feuilles ont été obtenus à partir des phases apolaires (organiques) à savoir le chloroforme (89,63%) et l'acétate d'éthyle (43,75%) ; le taux le plus faible d'extraction est obtenu par l'extrait aqueux de chloroforme (10%).

Concernant l'écorce, la majeure partie des composés de l'extrait éthanolique ont tendance à se retrouver dans l'extrait de chloroforme (61%) et aqueux d'acétate d'éthyle (49,18%), des taux faibles ont été obtenus avec l'extrait aqueux de chloroforme (26%) et acétate d'éthyle (23,5%). De ces résultats nous pouvons dire que le choix de l'éthanol comme premier solvant a permis l'extraction de composés polaires et apolaires, qui suite aux autres extractions, se sont repartis selon leurs degrés de polarités, la nature du solvant utilisé, la structure chimique du composé extrait et de son degré de polymérisation dans les différentes phases (Naczek *et al.*, 2006). Ces taux d'extraction sont également influencés par la méthode utilisée, la granulométrie (taille des particules), le temps de macération, la température et le pH du milieu d'extraction, les conditions de stockage et la présence de substances interférentes (Cowan, 1999; Falleh *et al.*, 2008; Levizou *et al.*, 2004 ; Naczek et Shahidi, 2006).

III.2. Dosages des composés phénoliques

III.2.1. Dosages des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux exprimées en milligramme d'équivalent catéchine sont représentées dans la figure suivante :

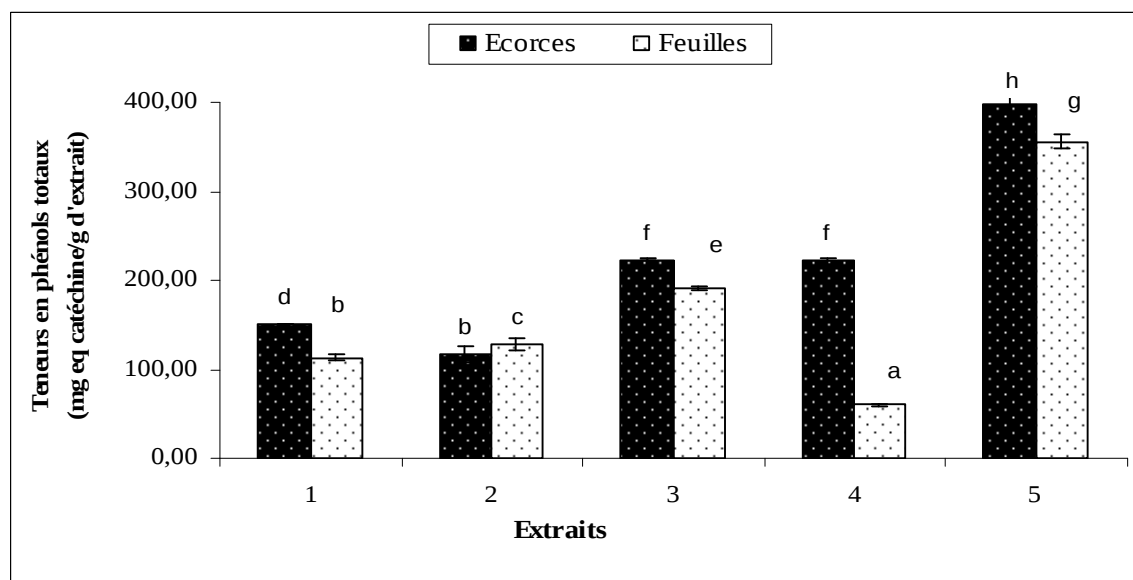


Figure 15 : Teneurs en phénols totaux des extraits de *Fraxinus angustifolia*.

1: Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait de chloroforme, 5 : extrait aqueux de chloroforme.

Les résultats obtenus confirment une fois de plus que les différents solvants utilisés présentent des différences dans leurs capacités à extraire les composés phénoliques de *Fraxinus angustifolia* et montrent la richesse des deux parties en ces composés, notamment les extraits d'écorce. Les extraits aqueux de chloroforme et aqueux acétate d'éthyle des feuilles enregistrent des teneurs élevées avec des valeurs de 355,12 et 223,25 mg Eq cat / g d'extrait. En effet l'extrait de chloroforme donne la teneur la plus faible en phénols totaux avec 59,80 mg Equivalent catéchine /g d'extrait).

Quant aux extraits d'écorce, l'aqueux de chloroforme renferme la teneur la plus élevées (397,60 mg Eq cat/g), les extraits aqueux acétate d'éthyle et chloroforme donne des teneurs inférieures (223,25 et 222,25 mg Eq cat/g) respectivement et la teneur la plus faible est enregistrée par l'acétate d'éthyle avec une valeur de 117,34mg Eq cat/g d'extrait.

Une étude menée par Li et ses collaborateurs (2007) utilisant la méthode au folin ciocalteu montre que l'extrait méthanolique de *Fraxinus rhynchophyllalla* enregistre une valeur de $40,27 \pm 0,54$ mg GAE/g qui est largement inférieure à celles enregistrées par les extraits éthanoliques d'écorce et feuilles de *Fraxinus angustifolia*, qui sont de 115,24 et 113,15mg Eq cat /g respectivement. L'étude de Mi Yoo et ses collaborateurs (2008), montre que le dosage des phénols totaux des feuilles de *Jasminum*, plante appartenant à la famille des oléacées enregistre une valeur de $73,4 \pm 0,049$ mg GAE/g d'extrait obtenu par l'extrait méthanolique (70%), cette dernière est inférieure à celle obtenue par l'extrait éthanolique de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

La méthode au Folin-Ciocalteu utilisée est choisie pour les raisons suivantes ; c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée, la grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent colorée, c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants naturels à travers le monde (Huang *et al.*, 2005). Si le dosage au Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols car il réagit avec les acides aminés tyrosines et tryptophane des protéines.

De telles interférences peuvent être négligées car ces acides aminés aromatiques sont en proportions trop faibles par rapport aux composés phénoliques non protéiques dans les extraits végétaux (Boizot et Charpentier, 2006).

III.2.2. Dosage des flavonoïdes

D'après nos résultats (figure16), on remarque la présence de flavonoïdes dans les deux parties étudiées, avec une teneur légèrement élevée obtenue par les feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

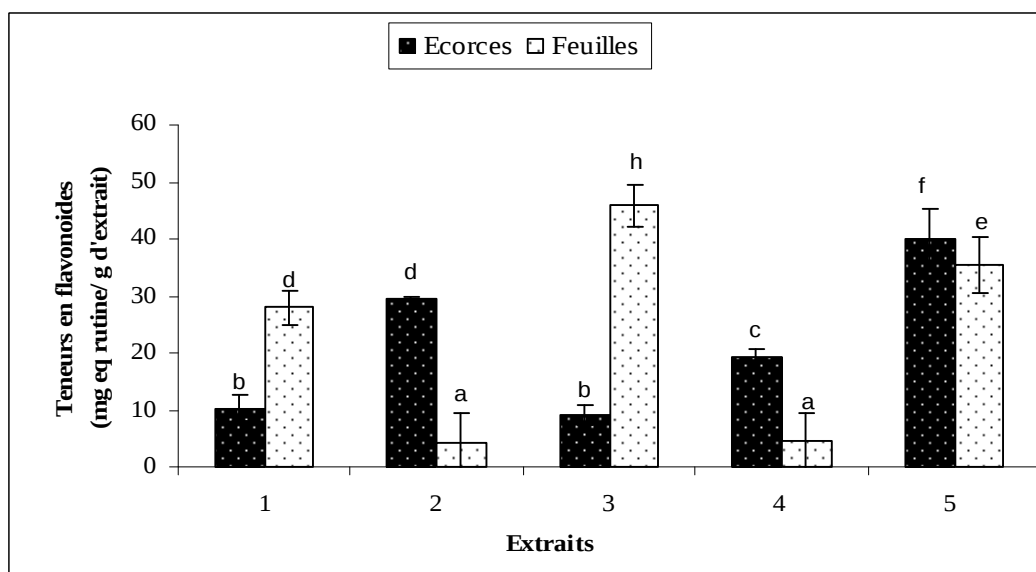


Figure 16 : Teneurs en flavonoïdes des extraits de *Fraxinus angustifolia*.

1: Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait de chloroforme, 5 : extrait aqueux de chloroforme.

L'extrait aqueux d'éthyle acétate des feuilles s'avère le plus riche en flavonoïdes (45,81), suivis de l'extrait aqueux de chloroforme (35,50) et éthanolique (27,92 mg Eq rutin/g), tandis que les teneurs les plus faibles sont obtenus par les extraits récupérés des phases peu polaire voir apolaire (acétate d'éthyle et chloroforme).

Concernant l'écorce, les teneurs en flavonoïdes obtenus pour les différents extraits sont données dans l'ordre : aqueux de chloroforme, acétate d'éthyle et chloroforme enregistrant ainsi des teneurs qui oscillent entre 40,01, 29,49 et 19,43mgEq rutin /g d'extrait. Cependant l'extrait éthanolique et aqueux acétate d'éthyle enregistrent des teneurs inférieures.

III.2.3. Dosage des tannins

Les extraits étudiés réaffirment la richesse des feuilles de *Fraxinus angustifolia* en ces composés. En revanche, l'extrait éthanolique des feuilles montre une teneur élevée ($p < 0,05$) de 268,93 mg EqAT/g d'extrait qui est sept fois supérieure de celle enregistrée par l'extrait éthanolique d'écorce d'une teneur de 37,92 mg Equivalent acide tannique (figure 17).

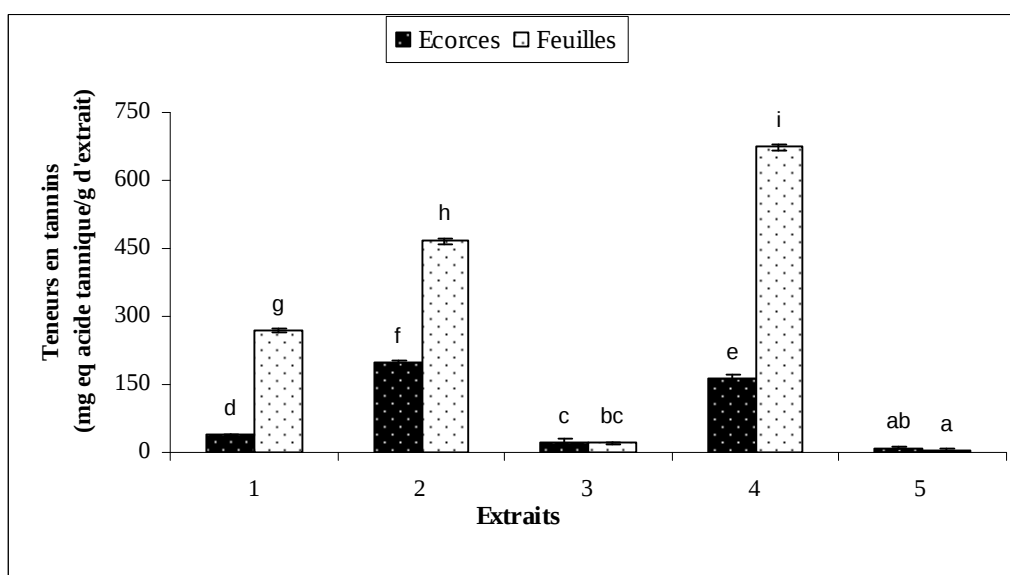


Figure 17 : Teneurs en tannins des extraits de *Fraxinus angustifolia*.

1: Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait de chloroforme, 5 : extrait aqueux de chloroforme.

D'après la figure, les tannins des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* se concentrent principalement dans les phases organiques (éthyle acétate et chloroforme) renfermant ainsi des teneurs de (673,28 et 466,44 mg EqAT/g) respectivement pour les feuilles et de (196,34 et 161,94 mg EqAT/g) respectivement pour l'écorce.

L'extrait aqueux de chloroforme est très pauvre voire même, dépourvu en tannins (9,90 et 2,22 mg Eq AT/g) enregistrés par l'écorce et les feuilles respectivement. Cette dernière remarque peut s'expliquer par l'insolubilité des tannins, en particulier les tannins condensés à haut poids moléculaire dans les solutions aqueuses (Reed et al., 1995 ; Cheynier, 2005). Dans leur étude portant sur 28 plantes, Owen et Johns (1999), ont rapporté que la plus riche présente un taux de 292 mg Eq AT/g d'extrait, *F. angustifolia* est remarquablement riche en tannins.

III.3. Evaluation de l'activité antioxydant et anti radicalaire

III.3.1. Activité réductrice (FRAP)

La méthode FRAP est utilisée pour évaluer le pouvoir réducteur de différents extraits. La réduction du fer ferrique-tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) en fer ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) est évalué en présence d'antioxydant (Benzie et Strain, 1996 ; Gourine et *al.*, 2010). Cette méthode est fiable et fréquemment utilisée pour évaluer la capacité des antioxydants des composés qui se trouvent dans les aliments ainsi que les extraits des plantes médicinales (Firuzi et *al.*, 2005).

La concentration des composés réducteurs présents dans les différents extraits de *Fraxinus angustifolia*, est exprimée en équivalence acide ascorbique (molécule antioxydante) et acide caféique (composé phénolique) voir figure1 et 2 annexe 2. Les résultats obtenus sont montrés par la figure(18) et la figure (19).

Pour tous les extraits étudiés, les valeurs en termes d'équivalence acide ascorbique sont légèrement supérieures à celles données en termes d'acide caféique. La répartition de l'activité réductrice entre les phases aqueuses et organiques est différente pour les extraits d'écorce et de feuilles.

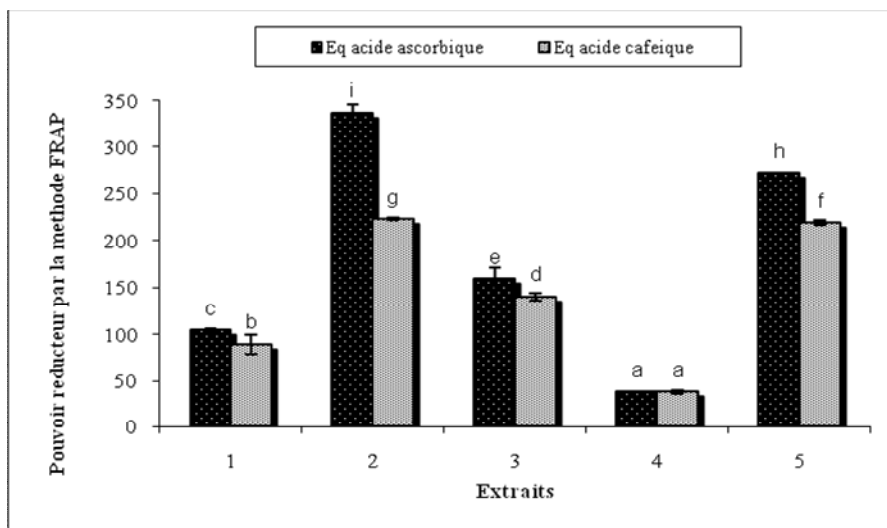


Figure 18 : Activité réductrice de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

1: Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait de chloroforme, 5 : extrait aqueux de chloroforme.

L'extrait acétate d'éthyle des feuilles se distingue par le meilleur pouvoir réducteur avec une valeur de 337,31 mg équivalent acide ascorbique et 223,23 mg équivalent acide caféique, cette dernière est légèrement inférieure à la valeur obtenu par Li et ses collaborateurs (2008), dans une étude portant sur l'activité antioxydante de 45 plantes médicinales à caractère anti inflammatoire par la méthode FRAP, parmi *Fraxinus rhynophylacé* qui a enregistré une valeur de $373,35 \pm 3,22$ équivalent trolox. L'extrait aqueux de chloroforme a montré une activité réductrice inférieure avec une valeur de 272,46 et 219,32 mg équivalent acide ascorbique et acide caféique respectivement.

Par ailleurs la plus faible activité est montrée par l'extrait de chloroforme enregistrant une valeur de 37,83 mg équivalent acide ascorbique.

Une autre étude réalisée par Chrysavgi et ses collaborateurs (2008), qui ont utilisé une extraction méthanolique sur *Pistacia lentiscus* a démontré que cette plante a une activité moins élevée que notre plante avec une valeur de 105 mg Eq AA/g d'extrait. Nous avons obtenu une réduction des ions ferriques en ions ferreux très élevée comparativement au résultat de Gourine et al. (2010), sur *Pistacia Atlantica* plante à propriétés anti inflammatoire en utilisant la même méthode (qui est de 9,02 mg EqAA/g).

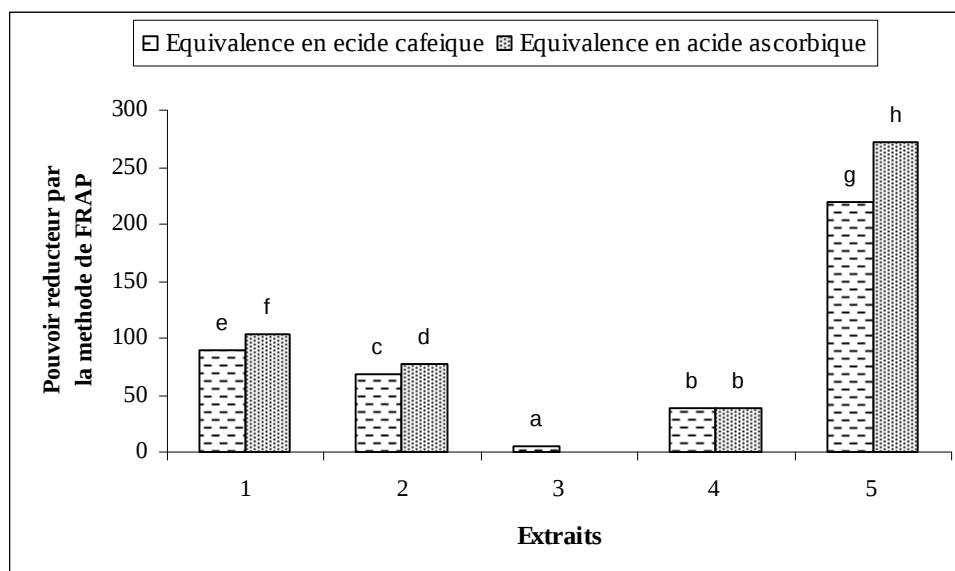


Figure 19: Activité réductrice d'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

1: Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait de chloroforme, 5 : extrait aqueux de chloroforme.

D'après cette figure, nous constatons que la meilleure activité réductrice est obtenu par l'extrait aqueux de chloroforme enregistrant ainsi une valeur de 243,2 mg équivalent acide ascorbique et 196,68 mg équivalent acide caféique, suivie de l'extrait aqueux acétate d'éthyle par une valeur de 191,05 et 146,81mg équivalent acide ascorbique et acide caféique, tandis que le plus faible pouvoir réducteur est montré par l'extrait de chloroforme renferment une valeur de 68,99mg équivalent acide ascorbique.

L'étude menée par Pantelidis et ces collaborateurs (2007), sur l'activité antioxydant de *Rubus fruticosus* par la méthode FRAP exprimé en terme d'équivalent acide ascorbique à enregistré une valeur inférieure ($169 \pm 2,24$) qui est attribue à la richesse de cette plante en composés phénoliques connus comme molécules riches en groupement hydroxyle doués d'activité antioxydant et réductrice de molécule oxydé (Cai et al., 2004 ; Tang et al., 2004).

III.3.2. Activité scavenging du radical ABTS⁺

L'activité des extraits est exprimée par la capacité antioxydante Equivalent Trolox (TEAC) qui correspond à la concentration de Trolox (analogue hydrophile de la vitamine E) donnant la même capacité antioxydante qu'une concentration du composé testé. Ainsi, plus la valeur TEAC est élevée, plus l'antioxydant est efficace (figure 20).

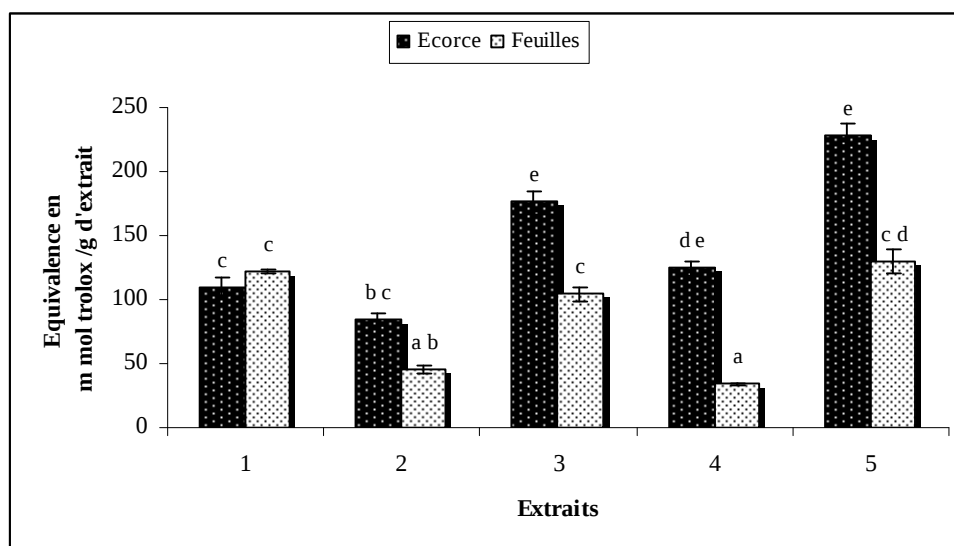


Figure 20 : Capacité antioxydant équivalent Trolox (TEAC) de *Fraxinus angustifolia*.

1: Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait de chloroforme, 5 : extrait aqueux de chloroforme.

D'après les résultats obtenus, les extraits aqueux de chloroforme et aqueux acétate d'éthyle d'écorce ont exhibés de meilleures capacités antioxydant vis-à-vis du radical $ABTS^{+}$, enregistrant ainsi des valeurs TEAC élevées, $228,30 \pm 8,5$ et $176,46 \pm 7,42$ mmol équivalent trolox respectivement, des valeurs inférieures sont montrés par l'extrait de chloroforme suivis de l'éthanol, tandis que, la plus faible valeur TEAC est enregistré par l'extrait acétate d'éthyle ($89,79 \pm 5,05$) mmol équivalent trolox.

Concernant les feuilles, la meilleure capacité antioxydant est montré par l'extrait aqueux de chloroforme avec une valeur TEAC de $129,25 \pm 9,2$ mmol équivalent trolox, suivis de l'extrait éthanolique ($121,93 \pm 1,99$) et aqueux acétate d'éthyle ($103,99 \pm 5,87$) mmol équivalent trolox, cependant les extraits organiques donnent les plus faibles valeurs TEAC avec $45,80 \pm 3,10$ et $33,67 \pm 1,23$ pour l'acétate d'éthyle et le chloroforme respectivement.

De ces résultats nous pouvons dire qu'une bonne capacité antioxydant équivalent trolox est montrée essentiellement par les extraits aqueux de *Fraxinus angustifolia* qui peut être due à leurs richesses en substance phénoliques de nature polaire ; qui comportent des groupement polaires dans leurs structures, tels que les groupements OH qui jouent un rôle primordial dans l'activité antioxydant comme donneurs d'hydrogène (Wu et al., 2007 ; Robard et al., 2009).

Nos résultats sont meilleurs par rapport à ceux rapportés par Djeridane et ses collaborateurs (2006) dans l'étude de l'activité antioxydant équivalent trolox, de plusieurs plantes algériennes, parmi *Globularia alypom* et *Thymeleae hirsuta* utilisées pour leurs propriétés anti inflammatoires. Ces dernières n'ont enregistrées que 20,31 et 17,62 mmol équivalent trolox respectivement qui sont très loin de celles de fraxinus. Une autre étude mené par Li et al., 2007 sur l'activité antioxydant de *Fraxinus rhynchophyllacée* à donné une valeur de $166,09 \pm 0,34$ μ mol équivalent trolox/g d'extrait qui reste très inférieure à celle de *Fraxinus angustifolia*.

L'évaluation du potentiel antioxydant d'une plante médicinale de la région du Taiwan à propriétés thérapeutique anti inflammatoires dite *Chailanthes glauca*, n'enregistre qu'une valeur TEAC de $852 \pm 78,7$ μ mol équivalent trolox/g d'extrait (Pasten et al., 2007). En comparant les résultats de ces études aux notres, *Fraxinus angustifolia* présent un puissant potentiel antioxydant.

En effet, l'activité scavenging est aussi exprimée en termes de pourcentage d'inhibition du radical $ABTS^+$ à une concentration de $100\mu\text{g/ml}$ montré par la figure suivante :

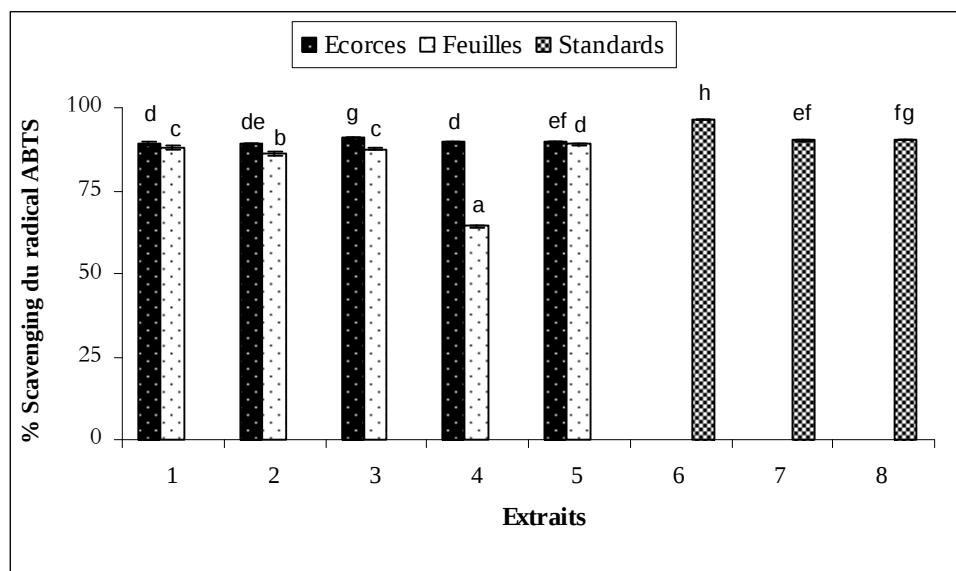


Figure 21: Activité scavenging du radical $ABTS^+$ de *Fraxinus angustifolia*.

1: Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait de chloroforme, 5 : extrait aqueux de chloroforme ,6 : quercitine, 7 : acide gallique, 8 : BHA.

*Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p \leq 0,05$).

*les barres verticales représentent les écarts types.

De cette figure, on constate qu'à l'exception de l'extrait chloroforme des feuilles, tous les extraits exhibent des pourcentages d'inhibition du radical ABTS supérieures à 80%. Ses pourcentages sont comparables à ceux montrés par la molécule de référence BHA, et légèrement inférieures à ceux enregistrés par l'acide gallique (97,14%) et quercitine (96,5%) testés dans les mêmes conditions que les extraits.

Pour l'écorce, aucune différence significative ($p \leq 0,05$) n'existe entre les extraits éthanolique, acétate d'éthyle et chloroforme enregistrant ainsi des valeurs qui oscillent de 89,13 à 89,57 %, alors que la meilleure activité inhibitrice est donnée par l'extrait aqueux acétate d'éthyle avec un pourcentage d'inhibition de $91,92 \pm 0,04$ légèrement supérieur à celui de la BHA. Quant aux feuilles, la meilleure activité inhibitrice est donnée par l'extrait aqueux de chloroforme ($89,03 \pm 0,3$) suivi de l'éthanol ($87,96 \pm 0,5$),

aqueux acétate d'éthyle ($87,6 \pm 0,2$) et acétate d'éthyle ($86,25 \pm 0,6$), alors que la plus faible activité est enregistrée par le chloroforme avec $64,35 \pm 0,4$.

Nos résultats concordent avec ceux de Mathew et ses collaborateurs dont l'extrait méthanolique de feuilles de *Cinnamomum verum* a enregistré une valeur de 87% à une concentration de $100 \mu\text{g/ml}$. L'extrait méthanolique de *Trigonella foerum* montre un effet scavenging du radical ABTS⁺. inférieur à celui de *Fraxinus angustifolia* avec un pourcentage d'inhibition de 49% (Kaviarosan et al., 2007).

Une étude menée par Arumugan et ses collaborateurs (2006) sur les feuilles *Mentha spicata* en utilisant une extraction sélective, a montré que l'effet scavenging du radical ABTS⁺ par l'extrait acétate d'éthyle (95%) et l'extrait aqueux (68%) ont exhibé une activité supérieure à celle obtenue avec l'extrait d'hexane (18%) et l'extrait du chloroforme (22%). D'après ces résultats et ceux de notre étude, on constate, qu'un très bon effet scavenging du radical ABTS⁺ est montré par les extraits aqueux et organique polaires (éthanol et acétate d'éthyle). Ceci peut être expliqué par le fait qu'ils contiennent des composés polaires riches en groupements hydroxyles tels que les flavonoïdes et les phénols simples (figure 15 et 16). En effet, une étude a établie que les composés phénoliques ne présentent pas tous la même activité scavenging du radical ABTS⁺ qui est en relation étroite avec le nombre de groupement OH ainsi que leurs position (Montoro et al., 2005 ; Mathew et al., 2006).

III.3.2.1. Activité anti radicalaire contre le radical ABTS⁺ à différentes concentrations

Dans le but d'exprimer les résultats en terme d'IC₅₀, les extraits ayant exprimés un effet scavenging important ainsi que les molécules standards sont testés sur une gamme de concentrations de : 6,25, 12,5, 25, 50,75 et 100 $\mu\text{g/ml}$ selon leurs efficacité anti radicalaire.

L'IC₅₀ est la concentration qui correspond à 50% d'inhibition du radical ABTS⁺, 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 ; Villano et al., 2007). Les résultats des différents extraits ainsi que les molécules de références à différentes concentrations et leur IC₅₀ sont illustrés dans les figures 22 et 23 et le tableau VI.

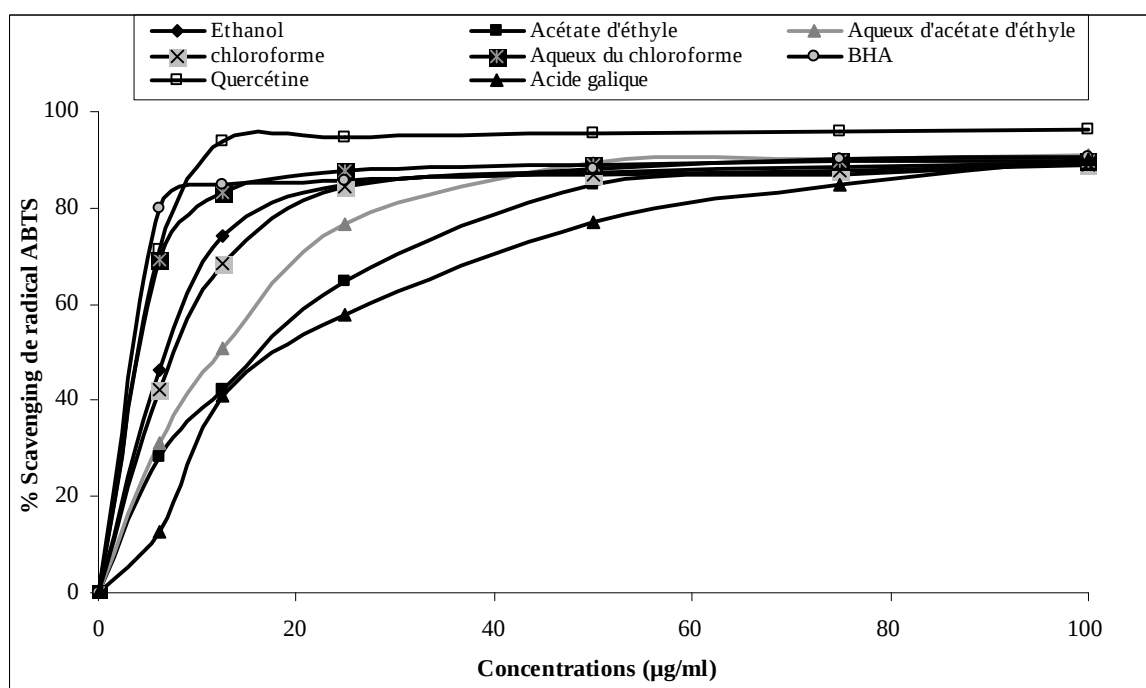


Figure 22: Effet scavenger contre le radical $ABTS^{\cdot+}$ des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* et certains standards à différentes concentrations.

Les résultats de la figure 22, nous montre que l'effet anti radicalaire de l'extrait aqueux de chloroforme d'écorce de fraxinus à différentes concentrations, diminuent progressivement jusqu'à atteindre un taux d'inhibition de 69,45% à une concentration de 6,25µg/ml, exprimant ainsi la plus faible IC_{50} (3,01µg/ml), qui est comparable à celle des molécules de référence BHA et quercétine ($p \leq 0,05$) reflétant ainsi un potentiel anti radicalaire très important. Les extraits éthanol et chloroforme atteignent des taux 46,40 et 42,05% puis des extraits aqueux et organique d'acétate d'éthyle avec 31,15 et 28,46% à 6,25µg/ml expriment alors des valeurs d' IC_{50} de 11,35 et 15,13µg/ml qui restent inférieurs à celles enregistrées par l'acide gallique (19,11 µg/ml).

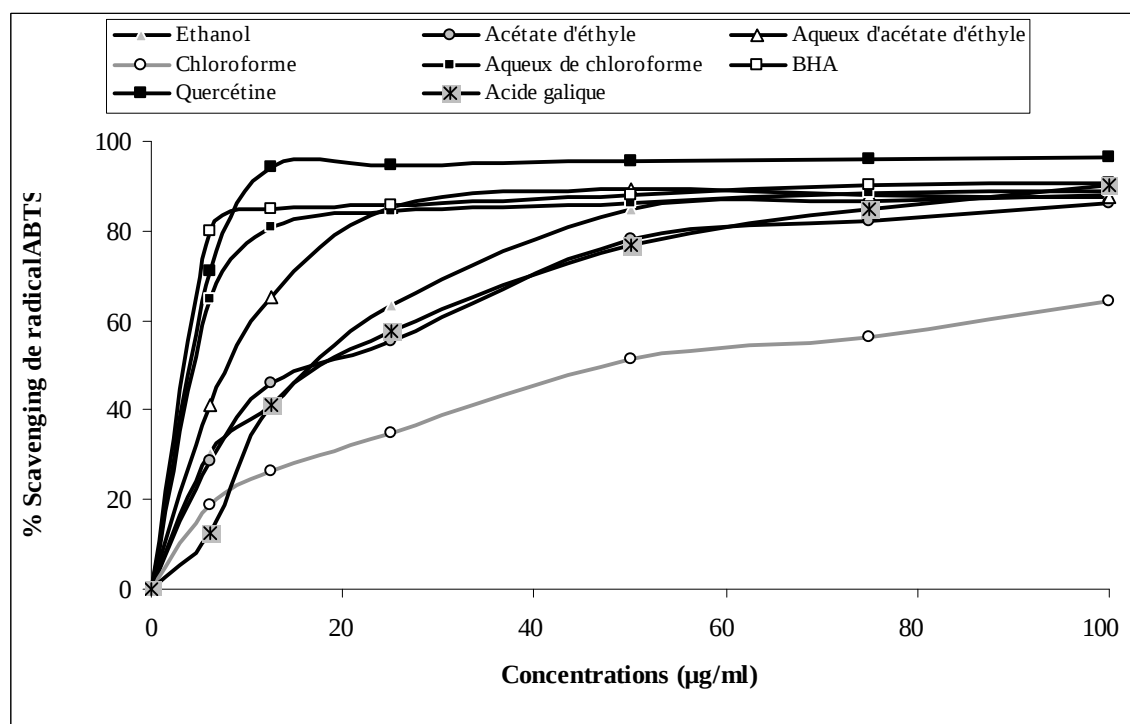


Figure 23: Effet scavenger contre le radical $ABTS^+$ des extraits de feuilles de *F. angustifolia* et certains standards à différentes concentrations.

D'après la figure ci-dessus, on constate une fois de plus que l'extrait aqueux de chloroforme présente un effet anti radicalaire important même à de très faible concentration ($6,25\mu\text{g/ml}$), en présentant un pourcentage d'inhibition supérieure à 50%, exprimant ainsi la plus faible valeur IC_{50} qui est de $3,73\mu\text{g/ml}$ et qui reste très proche de celle montré par la molécule de référence BHA ($3,90\mu\text{g/ml}$). Les extraits Aqueux acétate d'éthyle, éthanol et acétate d'éthyle enregistrent des valeurs IC_{50} très proches, mais inférieures à celles montrées par l'acide gallique, tandis que l'extrait chloroforme exprime un effet anti radicalaire modéré avec une valeur d' IC_{50} de $43,99\mu\text{g/ml}$.

De ces résultats nous pouvons conclure que les extraits d'écorce et de feuilles de *fraxinus* manifestent un effet anti radicalaire puissant contre le radical $ABTS^+$, exprimant ainsi des valeurs d' $IC_{50} < 17\mu\text{g/ml}$ à l'exception de l'extrait chloroforme des feuilles (tableau VI). De plus cet effet se retrouve essentiellement dans les extraits polaires et peu polaires qui peut être expliqué par le fait que ces extraits sont riches en phénols totaux et en flavonoïdes. Ces constatations plaident pour une activité anti radicalaire attribuée aux substances phénoliques riches en groupements hydroxyles (OH), rapporté pour leurs réductions des radicaux libres, en les stabilisant par leur atome d'hydrogène.

Tableau VI : les IC₅₀ des extraits d'écorces et de feuilles de *F. angustifolia* et des standards.

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Ecorce	Feuilles	standards
Ethanol	6,22	15,59	BHA : 3,90
Acétate d'éthyle	15,13	16,92	Quercitine: 2,26
Aqueux acétate d'éthyle	11,35	7,35	Ac-gallique:19,11
Chloroforme	6,77	43,99	
Aqueux chloroforme	3,01	3,73	

Phillips et ces collaborateurs (2010) ont rapporté des IC₅₀ de 12,1 et 8,6 µg/ml données par les extraits éthanolique et chloroforme d'une plante médicinale *Indigofera aspalathoides* ; comparées aux valeurs enregistrées par nos extraits, ces dernières sont assez proches. Une autre étude porté sur l'effet anti radicalaire des extraits acétate d'éthyle et aqueux d'écorce de *Ficus microcarpa* à rapporté des valeurs d'IC₅₀ de 1,6 et 4µg/ml respectivement, ces dernières sont inférieurs aux valeurs enregistrées par les extraits d'écorce de fraxinus (Ao et al., 2008). L'extrait méthanolique des feuilles de *Solanum pseudocapsicum*, une plante médicinale de la famille des solanacées à propriétés anti inflammatoires, montre une valeur d'IC₅₀ supérieure aux notre qui est de 49,66±0,33µg/ml (Pillay et al ., 2005).

Afin de situer les valeurs IC₅₀ retrouvées, ces dernières sont comparées à d'autres rapportées par des travaux qui se sont intéressés à l'étude de l'effet anti radicalaire contre le radical ABTS⁺ par des plantes médicinales montré dans le tableau suivant :

Tableau VII : Exemples de travaux réalisés concernant l'activité anti ABTS^{•+} des extraits de plantes.

Plantes	extraits	IC ₅₀	Références
<i>Pseudartia viscida</i>	Éthanolique	81 µg/ml	Vijayabaskaran et al., 2010
<i>Maytenus aquifolium</i> <i>Maytenus alicifolium</i>	Méthanolique	3,6 µg/ml 2 µg/ml	Velloso et al., 2007 Velloso et al., 2006
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ethanolique	8 mg/ml	Jayakumar et al., 2009
<i>Hibiscus furcatus</i>	Acétate d'éthyle Ethanolique	1,33µg/ml 96,33µg/ml	Fijesh et al., 2010
<i>Hermania althaeifolia</i> <i>Hermania flamula</i> <i>Hermania trifuca</i>	Acetonique	11,86 µg/ml 19,56 µg/ml 41,74 µg/ml	Essop et al., 2008

III.3. 3. Activité scavenging du radical superoxyde (O₂^{•-})

Le radical superoxyde est connu pour être un composé très nocif à la cellule puisque c'est un précurseur d'autres espèces radicalaires (Jayakumar et al., 2009). Le pouvoir piégeur du radical anion superoxyde (O₂^{•-}) par les différents extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été évalué spectrophotométriquement en suivant la diminution de la réduction du NBT (Nitroblue tetrazolium) en formazan (λ_{max}= 560nm) par le superoxyde produit chimiquement dans le système PMS-NADH (Wang et al., 2009). La capacité des extraits et de la molécule standard (acide caféique) à piéger le radical super oxyde est exprimée en termes de pourcentages d'inhibition à une concentration de 400µg/ml illustré par la figure 24.

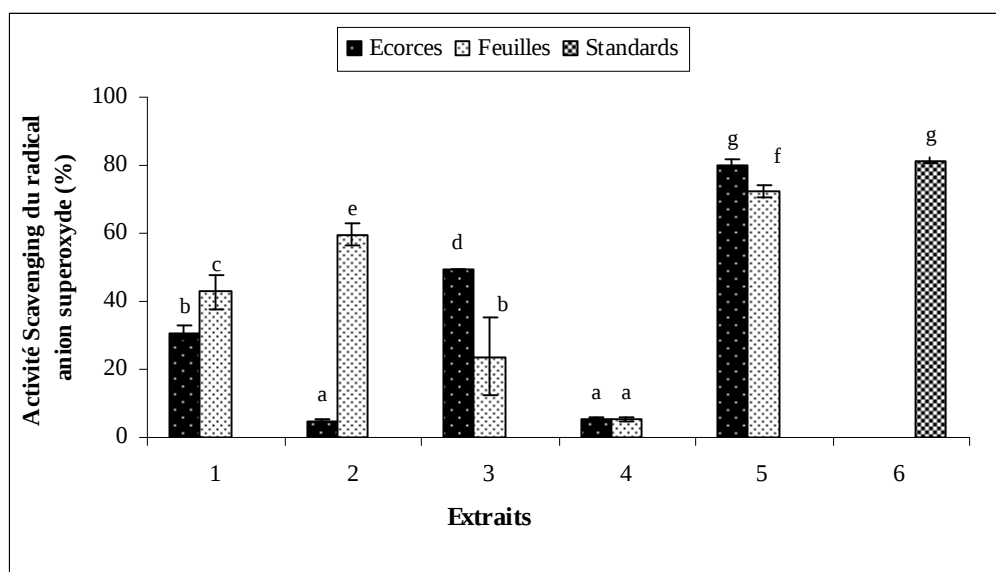


Figure 24: Activité scavenging de l'anion super oxyde de *Fraxinus angustifolia*.

1: Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait de chloroforme, 5 : extrait aqueux de chloroforme, 6 : acide caféique.

*Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p \leq 0,05$).

*les barres verticales représentent les écarts types.

L'analyse de nos résultats révèle une fois de plus la performance de l'extrait aqueux de chloroforme d'écorce qui inhibe le radical super oxyde à $79,82 \pm 2\%$ et qui ne présente aucune différence significative ($p \leq 0,05$) avec la molécule de référence testée (acide caféique) qui inhibe de $81,41\%$ le radical super oxyde, suivi de l'aqueux d'acétate d'éthyle pour lequel on note un pourcentage d'inhibition de $49,59 \pm 0,1$. L'extrait éthanolique enregistre une valeur inférieure, et n'inhibe que de $30,77 \pm 2,1\%$ le radical super oxyde.

De même pour les feuilles, la meilleure activité anti radicalaire est enregistrée par l'extrait aqueux de chloroforme avec un pourcentage d'inhibition de $72,54\%$, suivi de l'extrait acétate d'éthyle par une activité inhibitrice de l'ordre de $62,42 \pm 3,4\%$, tandis que l'extrait éthanolique inhibe le radical super oxyde de $34,36 \pm 4,9\%$. A l'exception de l'extrait chloroforme des deux parties étudiées, tous les extraits présentent un effet scavenging du radical super oxyde avec une meilleure inhibition enregistrée par les extraits polaires qui est fort probablement due à leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes particulièrement (Rakesh et al., 2010 ; Sannigrahi et al., 2010).

Liu et ses collaborateurs (1997) ont testé l'extrait éthanolique de *Cyperus rotundus* (de la famille des Cyperacées) contre l'anion superoxyde, le pourcentage étant de 89.63% à une concentration de 100µg/ml, ce dernier est très élevé par rapport à l'extrait éthanolique de *Fraxinus angustifolia* qui est de 34,36%.

Dans une étude de l'activité anti radicalaire contre le super oxyde d'une plante médicinale à propriétés anti inflammatoires *Mucuna puriens*, l'extrait méthanolique à révélé un pourcentage d'inhibition de 55% à 350µg/ml (Radjeshwar et al., 2005). Une autre étude menée par Kowti et ses collaborateurs (2010), a montré que l'extrait éthanolique des feuilles de *Spatodea campulata* a des propriétés anti inflammatoires et présente un effet scavenging du super oxyde en inhibant ce dernier avec un pourcentage de 70% à 500µg/ml. On comparant ces résultats avec les nôtres, ces derniers restent supérieurs à ceux montrés par l'extrait éthanolique des feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

Selon Rakesh et ses collaborateurs (2010), l'extrait aqueux de *Nymphaea stellata* inhibe le super oxyde généré chimiquement dans le système PMS-NADH de 26,22% à une concentration de 500µg/ml, un résultat inférieur à celui enregistré par les extraits aqueux de *Fraxinus angustifolia*. D'après ces auteurs, cet effet scavenging du radical $O_2^{\cdot -}$ est attribué aux composés phénoliques et aux flavonoïdes présents dans cette plante notamment l'acide gallique.

III.3.3.1. Effet anti radicalaire contre le radical $O_2^{\cdot -}$ à différentes concentrations

Les extraits ayant exhibés des pourcentages d'inhibition supérieures à 50% ainsi que l'extrait éthanolique et l'acide caféique ont été testés pour leurs effets scavenging du radical super oxyde sur une gamme de concentration de : 50, 100, 200, 300 et 400µg/ml, leurs valeurs d'IC50 sont calculées et les résultats sont illustrés par les figures 25 et 26 ci dessous.

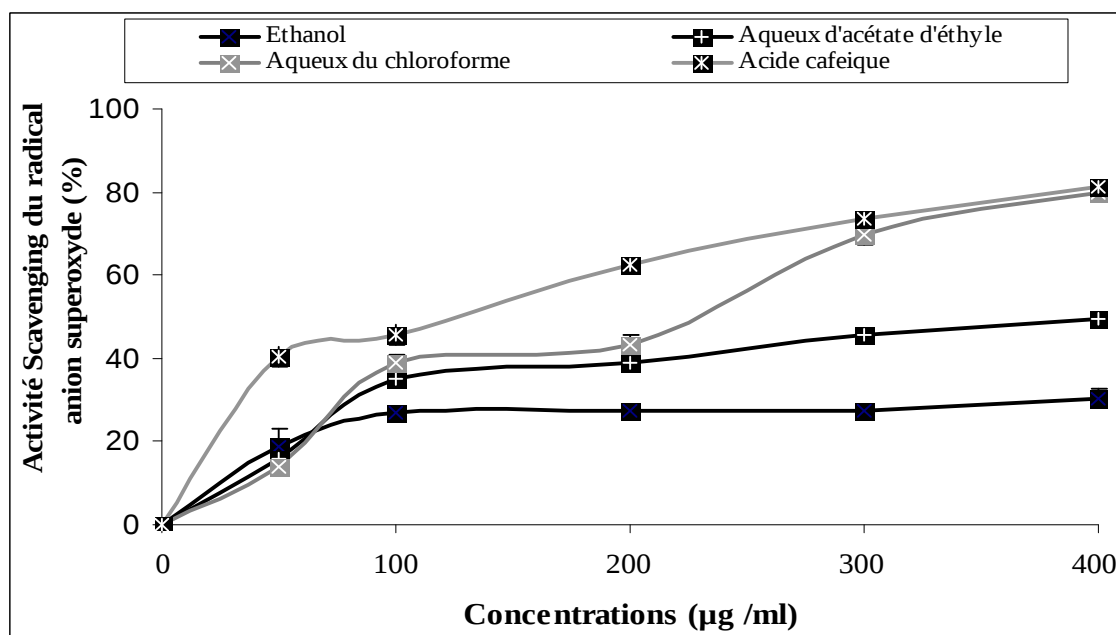


Figure 25: Effet scavenger contre l'anion super oxyde des extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia* et de l'acide caféique à différentes concentrations.

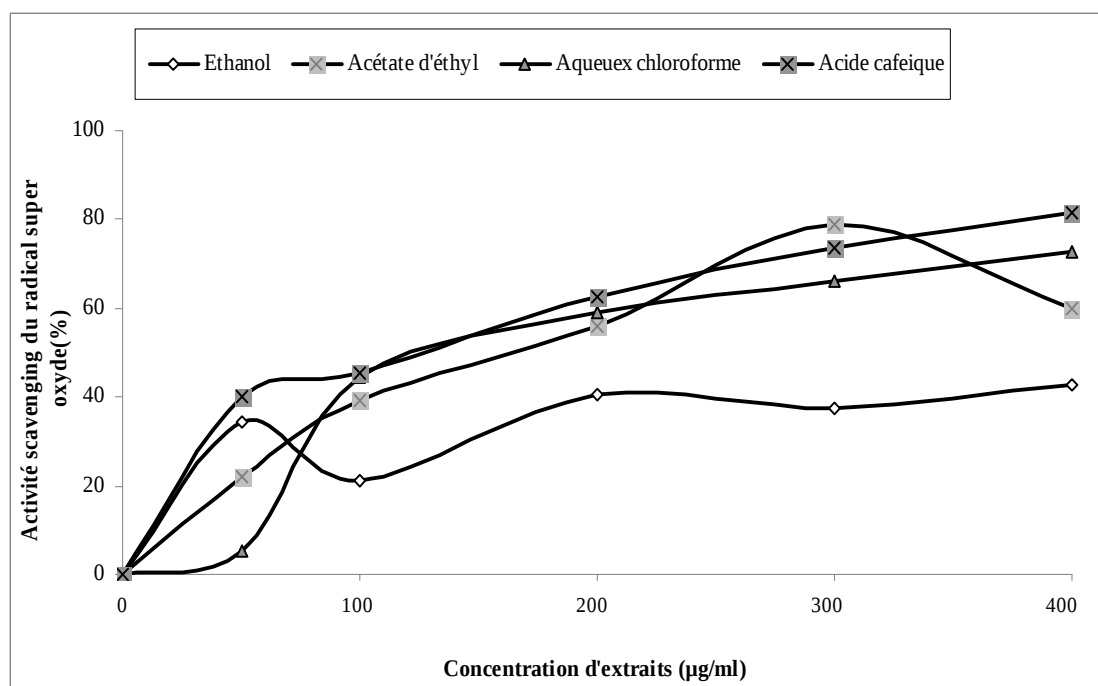


Figure 26: Effet scavenger contre l'anion super oxyde des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* et de l'acide caféique à différentes concentrations.

D'après la figure(25), L'extrait aqueux de chloroforme présente un profile très proche de l'acide caféique, montrant ainsi des pourcentages d'inhibition élevés 79,82% et 81,41% respectivement. Cela peut être attribué à sa teneur élevée en composés phénoliques et en flavonoïdes, d'ailleurs il a montré la valeur d'IC₅₀ la plus faible (tableaux XII) comparé aux autres extraits, mais qui est supérieur à celle donnée par la molécule standard, on remarque également une absence d'activité scavenging de l'anion super oxyde à une concentration inférieure à 50µg/ml de cet extrait se qui n'est pas le cas pour la molécule standard, cela peut s'expliquer par le fait que l'acide caféique est une molécule pure alors que l'extrait aqueux de chloroforme est un mélange de composés. Les autres extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle augmentent légèrement en fonction de la concentration avec un maximum d'activité inférieure à 50%.

Les résultats obtenus (figure 26) montrent que les extraits testés ; aqueux de chloroforme acétate d'éthyle et l'acide caféique piège le radical superoxyde d'une manière dose dépendante. Excepté l'extrait acétate d'éthyle qui présente un profil d'activité biphasique : dans la première phase, il manifeste un effet scavenger dose dépendant jusqu'à atteindre un maximum d'activité de 78,64% pour une concentration de 300µg/ml. Au delà de cette concentration son effet s'inverse et s'exprime par une diminution de son effet scavenger jusqu'à 62,42% pour une concentration de 400µg/ml. Ce phénomène peut être expliqué par un changement du comportement de l'extrait de l'effet antioxydant à l'effet pro oxydant (encombrement stérique entre les composés phénoliques de cet extrait), ou par le fait que la concentration des molécules pro oxydantes dépasse largement celle des molécules anti oxydantes (Hung et *al.*, 2005). Ceci n'est pas vraiment surprenant dans la mesure où les composés phénoliques agissent généralement comme antioxydants à faible concentration, mais peuvent devenir pro oxydants à forte concentration; par leur auto oxydation conduisant à la formation de semi quinone et du radical superoxyde (Mochizuki et *al.*, 2002 ; Jayaprakasha et Patil, 2007).

L'extrait aqueux de chloroforme a montré la plus faible IC₅₀ ($p \leq 0,05$) reflétant ainsi un potentiel anti radicalaire important, tandis que l'extrait éthanolique enregistre un faible effet scavenger d'une valeur de 34,36%.

Tableau VIII: les valeurs d'IC₅₀ des extraits d'écorce et de feuilles de *F. angustifolia* et de l'acide caféique.

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Ecorce	Feuilles	standards
Ethanol	/	/	Ac- caféique : 116,68
Acétate d'éthyle	/	146,66	
Aqueux acétate d'éthyle	400	/	
Aqueux chloroforme	147,68	99,4	

D'après les résultats obtenus, notons que l'activité anti radicalaire des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* manifestent des effets plus prononcés que ceux de l'écorce, qui eux même restent relativement importants. Cela peut s'expliquer par la différence de parties végétales utilisées (écorce et feuilles) d'une part et que les feuilles sont probablement plus riches en composés phénoliques (figure 15) vu que ces dernières sont le siège de la photosynthèse.

Pour mieux situer nos valeurs d'IC₅₀ retrouvées, nous les avons comparés à celles rapportées par des travaux qui se sont intéressés à l'étude de l'inhibition du radical super oxyde généré dans un système purement chimique PMS-NADH par des extraits de plantes médicinales (tableau XIV). Il ressort que la plupart des études, ont rapportées des valeurs d'IC₅₀ > 100µg/ml reflétant des effets anti radicalaires plus au moins importants. L'effet exprimé par les extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* est donc inférieur. Pour conclure, ces résultats ne nous renseignent pas sur le mode d'action de ces extraits qui agissent comme des piègeurs de l'anion super oxyde.

Tableau IX : Exemples d'études concernant l'effet scavenging de l'anion super oxyde par les extraits de plantes.

plante	Extrait	IC50	Références
<i>Sesamum indicum</i>	aqueux	135,4 µg/ml	Visavadiya et al., 2009
<i>Enhydra fluctuans</i>	Ethanolique	>100 µg/ml	Sannigrahi et al., 2010
	Chloroforme	>100 µg/ml	
	Acétate d'éthyle	56,7 µg/ml	
<i>Ficus microcarpa</i>	Ethanolique (écorce)	97,5 µg/ml	Ao et al., 2008
	Acétate d'éthyle (écorce)	63,2 µg/ml	
	Aqueux écorce	83,9µg/ml	
	Méthanolique (feuilles)	223(µg/ml)	
<i>Veronica orientalis</i>	Méthanolique	189,91(µg/ml)	Harput et al., 2011
<i>Veronica peduncularis</i>		186,31(µg/ml)	
<i>Veronica chamaedrys</i>		113,39(µg/ml)	
<i>Spathodea campanulata</i>	Ethanolique	198(µg/ml)	Kowti et al., 2010
<i>Tamarindus indica</i>	Acétate d'éthyle	79,58(µg/ml)	Ay et al., 2007
	Méthanolique	77,10(µg/ml)	
Mushroom pleurotus	Ethanolique	8 mg/ml	Jayakumar et al, 2009

III.3. 4. Activité scavenging du radical nitrique oxyde (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est un puissant vasodilatateur qui est produit par de nombreux types cellulaires incluant les cellules endothéliales vasculaires (Maeda et al., 2003) . Des concentrations élevées de NO sont cytotoxiques et sont associées à un système de défense non spécifique contre les microorganismes (Green, 1995).

Les résultats du pouvoir scavenging du radical nitrique oxyde des extraits d'écorce et de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont exprimés en termes de pourcentage d'inhibition et illustrés dans la figure suivante :

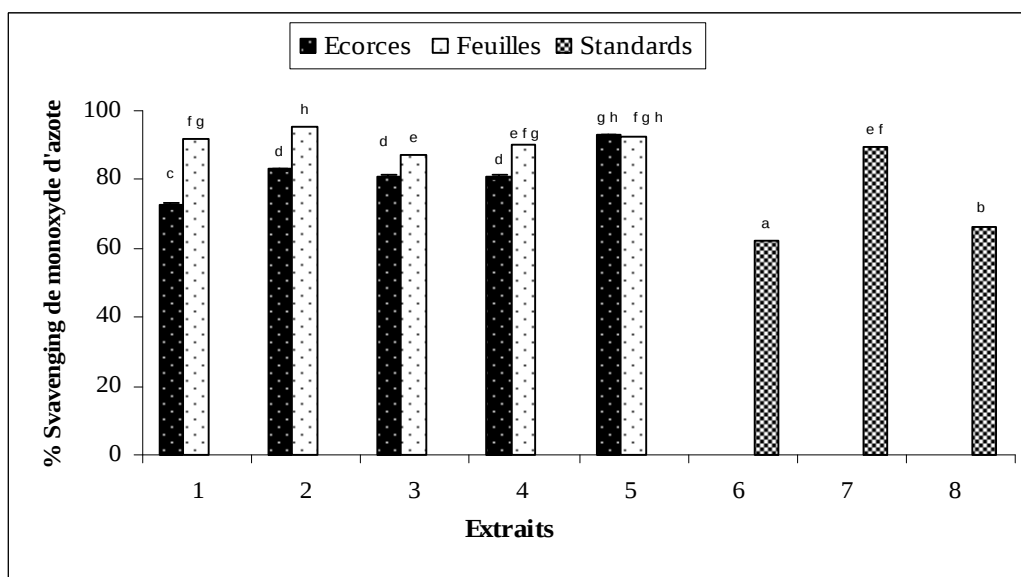


Figure 27: Activité scavenging du mono oxyde d'azote de *Fraxinus angustifolia*.

1: Extrait éthanolique, 2 : Extrait acétate d'éthyle, 3 : extrait aqueux acétate d'éthyle, 4 : extrait de chloroforme, 5 : extrait aqueux de chloroforme ,6 : BHA, 7 : acide gallique, 8 : quercitine.

*Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p \leq 0,05$).

*les barres verticales représentent les écarts types.

Des différences significatives ($p \leq 0,05$) sont révélées entre les extraits ; néanmoins, aucune différence significative n'est notée entre les extraits acétate d'éthyle, aqueux acétate d'éthyle et chloroforme d'écorce, ni entre l'extrait éthanolique, chloroforme et aqueux de chloroforme des feuilles. On note aussi une meilleure activité montrée par les extraits de feuilles comparée à ceux d'écorce excepté le chloroforme. De cette figure, tous les extraits étudiés enregistrent des pourcentages d'inhibition supérieurs à 70% et aux molécules de références utilisées BHA (61%) et quercitine (68%).

Pour l'écorce, l'extrait chloroforme a montré la meilleure activité inhibitrice du monoxyde d'azote avec une valeur de 92% comparable à celle enregistré par l'acide gallique (91%), suivi de l'acétate d'éthyle, aqueux acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme avec des pourcentages de $82,91 \pm 0,24$, $81,06 \pm 0,28$ et $80,95 \pm 0,46$ respectivement, tandis que l'extrait éthanolique enregistre le plus faible pourcentage d'inhibition $72,55 \pm 0,8\%$.

Concernant les feuilles, le plus fort effet scavenger est donné par l'extrait acétate d'éthyle (95,29%), suivi de l'aqueux de chloroforme (92,27%) et l'éthanol (92,10%), la plus faible activité est de (87,50%) enregistré par l'extrait aqueux acétate d'éthyle. L'ensemble de ces résultats nous indique que les extraits de *Fraxinus angustifolia* exhibent un puissant effet scavenging du radical nitrique oxyde.

L'étude de Sannigrahi et ses collaborateurs (2010), a montré que l'activité anti nitrique oxyde à une concentration de 100µg/ml donne des pourcentages d'inhibition de 80%, 50% et 20% enregistrés par les extraits acétate d'éthyle, méthanolique et chloroformique des feuilles de *Enhydra fluctuans* respectivement. Dans une autre étude, l'activité inhibitrice du radical NO par l'extrait méthanolique des feuilles de *Leea indica*, *Chasalia chartacea* et *Lasianthus oblongus*, plantes médicinales de la région de Malaisie ont exhibées des pourcentages d'inhibitions de 80,42, 81,84 et 79,16% respectivement à une concentration de 125µg/ml (Saha et al., 2004). L'étude faite par Razali et ses collaborateurs (2008) a montré que l'extrait méthanolique a exhibé une meilleure activité (55%), suivie de l'extrait éthyle acétate et de l'hexane avec 5% à une concentration 500µg/ml. Ce qui n'est pas en accord avec nos résultats car les extraits de *Fraxinus angustifolia* ont montré des pourcentages d'inhibition supérieurs.

A partir de ces observations, nous constatons que l'activité scavenging de NO^+ peut être justifiée par la concentration des composés phénoliques dans les extraits, car la présence des tannins, des flavonoïdes et des acides phénoliques jouent un rôle important dans cette activité (Kowti et al., 2010).

III.3.4.1. Effet anti radicalaire contre le radical NO^+ à différentes concentrations

Les extraits d'écorce et de feuilles, ayant exprimés des effets importants ainsi que les molécules standards ont été testés sur une gamme de concentration de : 6,25, 12,5, 25, 50,75 et 100 µg /ml (figures 28 et 29) dans le but d'exprimer les résultats en terme d'IC50.

Les résultats de la figure (28) nous montrent que, les extraits organique et aqueux de chloroforme gardent leurs activités supérieures à 50% même à de très faibles concentrations (6,25µg/ml) exprimant ainsi des valeurs d'IC₅₀ très proches de 6,94 et 7,07µg/ml respectivement qui sont inférieures à celles enregistrées par les molécules de références utilisées, les autres extraits montrent des valeurs IC₅₀ qui oscillent de 10,13 à 15,30µg/ml (Tableau X). De même pour les feuilles, à l'exception de l'extrait aqueux acétate d'éthyle.

Tous les extraits montrent des pourcentages d'inhibition du radical nitrique oxyde supérieurs à 50% à une concentration de 6,25µg/ml et enregistrent des valeurs IC₅₀ très faibles qui varient entre 4,07 et 7,26 µg/ml, reflétant ainsi un potentiel anti radicalaire très important.

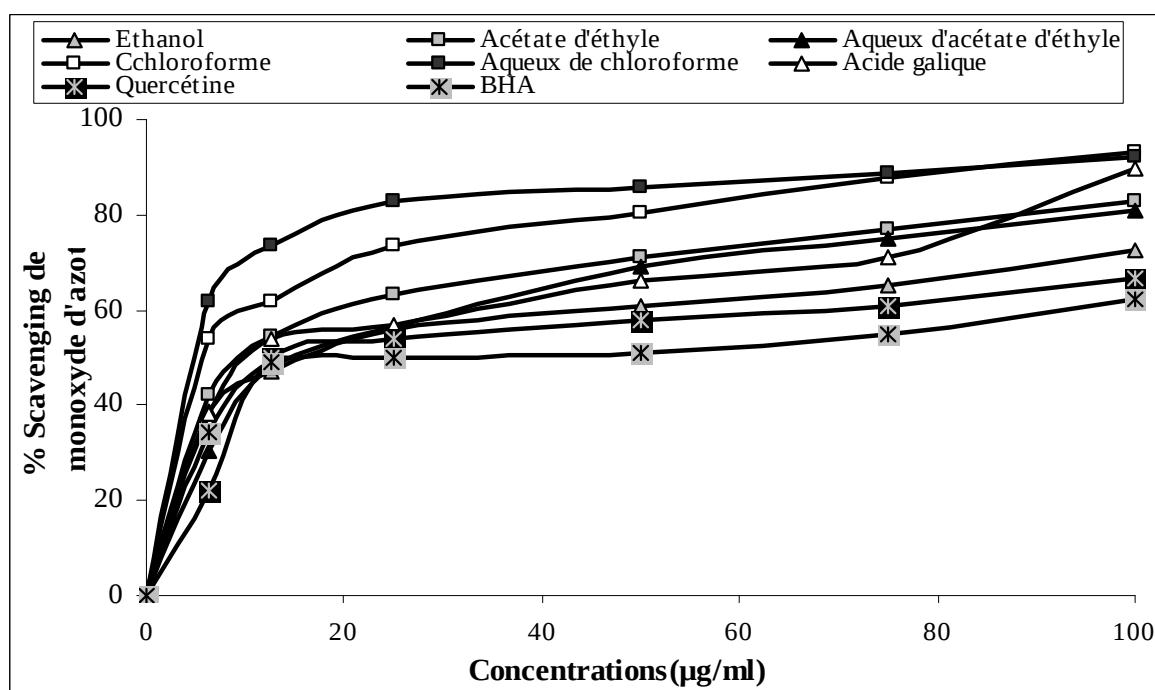


Figure 28: Effet scavenger contre le radical NO· des extraits d'écorce de *F. angustifolia* et certains standards à différentes concentrations.

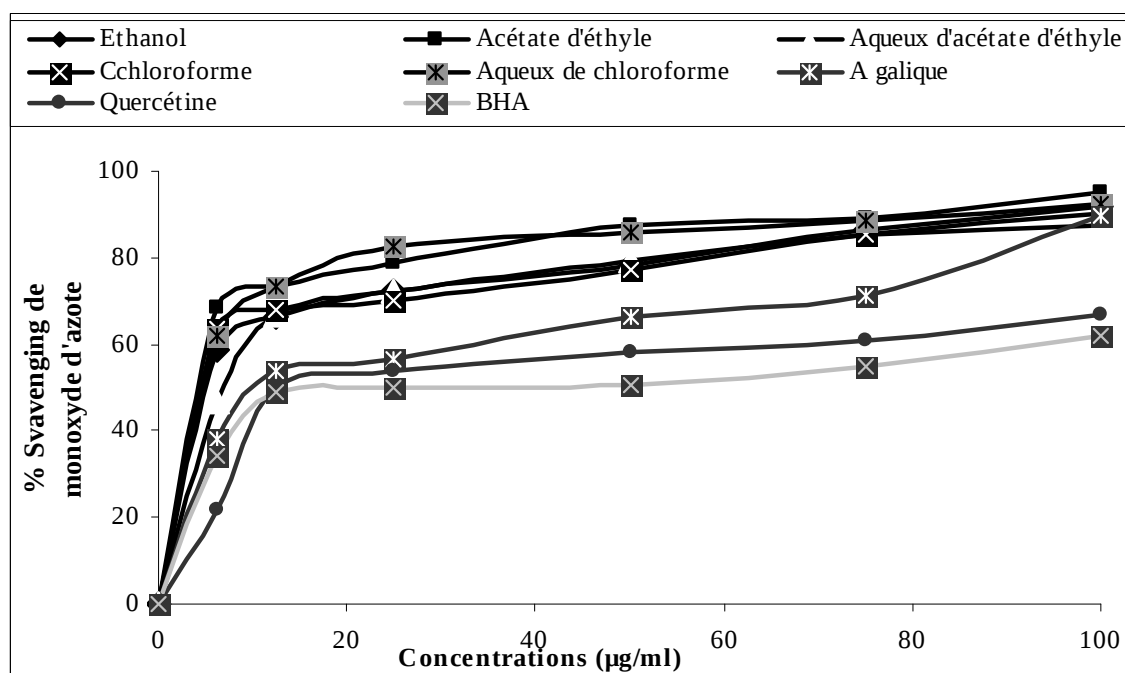


Figure 29: Effet scavenger contre le radical $\text{NO}^\bullet$ des extraits de feuilles de *F. angustifolia* et certains standards à différentes concentrations.

Tableau X : les valeurs d'IC₅₀ des extraits d'écorce et de feuilles de *F. angustifolia* et de molécules de références

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)		
	Ecorce	Feuilles	standards
Ethanol	12,59	5,85	Ac-gallique : 11,78
Acétate d'éthyle	10,13	4,47	Quercitine : 12,50
Aq- acétate d'éthyle	15,30	7,26	BHA : 25
Chloroforme	7,07	4,07	
Aqueux chloroforme	6,94	5,59	

Nos valeurs d'IC₅₀ retrouvées, sont comparées à d'autres rapportées par des études qui s'intéressent à l'inhibition du radical nitrique oxyde par des extraits de plantes médicinales. D'après le tableau ci-dessous, il ressort que toutes les études ont rapportées des valeurs IC₅₀ élevées $\geq 30 \mu\text{g/ml}$ reflétant des activités anti radicalaires assez fortes, l'effet exprimé par les extraits de *Fraxinus angustifolia* est donc plus fort car la plus fortes valeur IC₅₀ enregistré est de $15,30 \mu\text{g/ml}$.

Tableau XI : Exemples d'études concernant l'effet scavenging du radical nitrique oxyde par les extraits de plantes.

plante	Extrait	IC50 (µg/ml)	Références
<i>Spathodea campanulata</i>	Ethanol	160	Kowti et <i>al.</i> , 2010
<i>Veronica orientalis</i> <i>Veronica officinalis</i>	Méthanol	824,24 570,33	Harput et <i>al.</i> , 2011
<i>Enhydra fluctuans</i>	Méthanol Acétate d'éthyle Chloroforme	>100 56,7 >100	Sannigrahi et <i>al.</i> , 2010
<i>Sesamum indicum</i>	Ethanol Aqueux	98,8 238	Visavadiya et <i>al.</i> , 2009
<i>Mucuna pruriens</i>	Méthanol	50	Rajeshwar et <i>al.</i> , 2005
<i>Indigofera aspalathoides</i>	Ethanol Chloroforme	35,2 29,9	Philips et <i>al.</i> , 2001

III.4. Corrélations entre l'activité antioxydant et les teneurs en composés phénoliques.

Dans le but de déterminer la relation existante entre l'activité antioxydant et la teneur en composés phénoliques des extraits d'écorce et de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, les facteurs de corrélation sont déterminés et résumé dans les tableaux suivant :

Tableau XII : Corrélations entre le pouvoir réducteur et l'effet anti ABTS⁺ et composés phénoliques

	FRAP (acide ascorbique et caféique)				ABTS	
	Ecorce	Feuilles	Ecorce	Feuilles	Ecorce	Feuilles
Polyphénols	0,94	0,53	0,91	0,68	0,24	0,59
Flavonoïdes	0,29	-0,08	0,23	-0,17	-0,15	0,62
Tannins	-0,66	-0,32	-0,64	-0,49	-0,45	-0,79

Tableau XIII : Corrélations entre l'effet anti O₂⁻ et NO[•] et composés phénoliques

	Superoxyde		Nitrique oxyde	
	Ecorce	Feuilles	Ecorce	Feuilles
Polyphénols	0,82	0,76	0,12	0,032
Flavonoïdes	0,29	0,26	0,21	-0,55
Tannins	-0,88	-0,57	0,60	0,27

III.4.1. Activité réductrice (FRAP) et teneur en composés phénoliques

L'activité réductrice des extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia* étudiés serait étroitement liée à leurs teneurs en phénols totaux d'après le tableau XII qui montre des coefficients de corrélations respectifs de 0,94 et 0,91 pour l'acide ascorbique et l'acide caféique, qui est en accord avec l'étude menée par Li et ses collaborateurs (2008) qui ont révélés un coefficient de corrélation de 0,86, ce résultat s'explique par le fait que les composés phénoliques sont les composés majoritaires des extraits de plantes médicinales (Cai et al., 2005, Wong et al., 2006), tandis que les extraits de feuilles présentent une corrélation moyenne (0,68). Des corrélations faibles entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes des extraits d'écorces (0,29 et 0,23) sont obtenues, alors que les extraits de feuilles ne présentent aucune corrélation (-0,08).

Les corrélations entre l'effet réducteur des extraits de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* et leurs teneurs en tannins sont négatives (-0,66 et -0,49) suggérant ainsi que le pouvoir réducteur est inversement proportionnel aux teneurs en tannins. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les tannins, à des concentrations élevées peuvent interagir entre eux et réduit par conséquent la disponibilité des fonctions hydroxyles impliqués dans cette activité.

III.4.2. Activité scavenger du radical ABTS^{•+} et teneur en composés phénoliques

Les composés phénoliques d'écorce affichent des corrélations faibles respectives de (0,24, -0,15) pour les phénols totaux et les flavonoïdes ce qui indique que l'effet anti radicalaire contre l'ABTS^{•+} n'est pas proportionnel à la concentration en ces composés, un tel résultat peut être interprété d'une part, par le fait que la solution d'extrait est un mélange complexe de composés et d'autre part, par la présence d'autres composés de nature antioxydants qui pourrait interférer (Dawidowicz et al., 2006). Cependant la corrélation entre l'effet anti ABTS^{•+} des extraits de feuilles et leurs teneurs en phénols totaux et flavonoïdes est de 0,59 et 0,62 respectivement, suggérant un rôle modeste de ces composés. L'étude réalisée par Djeridane et ses collaborateurs (2006) sur une série de plantes médicinales algériennes, suggèrent que 79% de leur capacité antioxydant est attribué aux phénols totaux et aux flavonoïdes présents dans leurs tissus.

La corrélation entre l'effet anti-ABTS^{•+} des extraits de *F.angustifolia* et leurs teneur en tannins est de -0,45 pour l'écorce et -0,79 pour les feuilles, suggérant probablement un effet anti-radicalaire inversement proportionnel à la concentration en tannins.

III.4.3. Activité scavenger du super oxyde et teneur en composés phénoliques

Le tableau XIII révèle l'existence d'une corrélation linéaire et significative entre le pouvoir anti radicalaire des extraits de *Fraxinus angustifolia* et leur teneur en phénols totaux ($r = 0,82$ et $0,76$) pour l'écorce et les feuilles respectivement, également une faible corrélation est obtenue entre les teneurs en flavonoïdes ($r = 0,08$ et $r = 0,06$) et l'activité scavenging du radical super oxyde, un résultat expliqué par le fait que l'activité antioxydant n'est pas toujours liée à la présence de grandes quantités de composés phénoliques, et par le fait que cette dernière dépend de la nature et non de la quantité des polyphénols (Yokozawa et al., 1997 ; Amarowicz et al., 2004). Cependant, ce n'est pas le cas pour les tannins d'écorce qui affichent une bonne corrélation négative ($-0,88$), impliquant ainsi les tannins dans l'effet anti-radicalaire contre l'anion super oxyde qui est inversement proportionnel aux teneurs en ces composés. En effet, les composés phénoliques sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydant ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Ba et al., 2010).

III.4.4. Activité scavenger du monoxyde d'azote et teneur en composés phénoliques

Les coefficients de corrélation entre l'activité anti radicalaire contre le nitrique oxyde et la composition en phénols totaux et flavonoïdes des extraits de *F. angustifolia* sont de ($0,12$ et $0,032$) et ($0,21$ et $-0,55$) respectivement, ces résultats n'excluent pas l'implication de ces derniers dans cette activité. Il a été montré qu'il existe une relation directe entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques de plusieurs façons: la fraction phénolique totale n'intègre pas tous les antioxydants, des interactions synergiques entre les antioxydants et que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la quantité, mais également de la qualité et de la structure des antioxydants (Nakiboglu et al., 2007). En effet une corrélation moyenne ($0,60$) est obtenue avec les tannins des extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia* et l'activité scavenging du monoxyde d'azote, suggérant un effet modeste de ces derniers.

III.5. Evaluation de l'activité antioxydant des fractions chromatographique des extraits actifs de *Fraxinus angustifolia*

Afin de déterminer la nature des composés responsables de l'activité antioxydant dans les extraits actifs, ces derniers en fait l'objet d'un fractionnement sur colonne de gèle de selice et cinq fractions ont été récupérées progressivement, avec une élution de polarité croissante : chloroforme/acétate d'éthyle (90 :10/v : v), acétate d'éthyle /méthanol (50 :50/ v : v), acétate d'éthyle/méthanol (20 :80/ v : v), méthanol/eau (10 :90/ v : v) et eau/acide acétique (99,75 : 0,25/ v : v).

III.5.1. Activité réductrice des fractions des extraits actifs de *Fraxinus angustifolia*

Le pouvoir réducteur des fractions des deux extraits actifs ainsi que l'extrait éthanolique d'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* à 100µg/ml sont montrés par les figures 30 et 31.

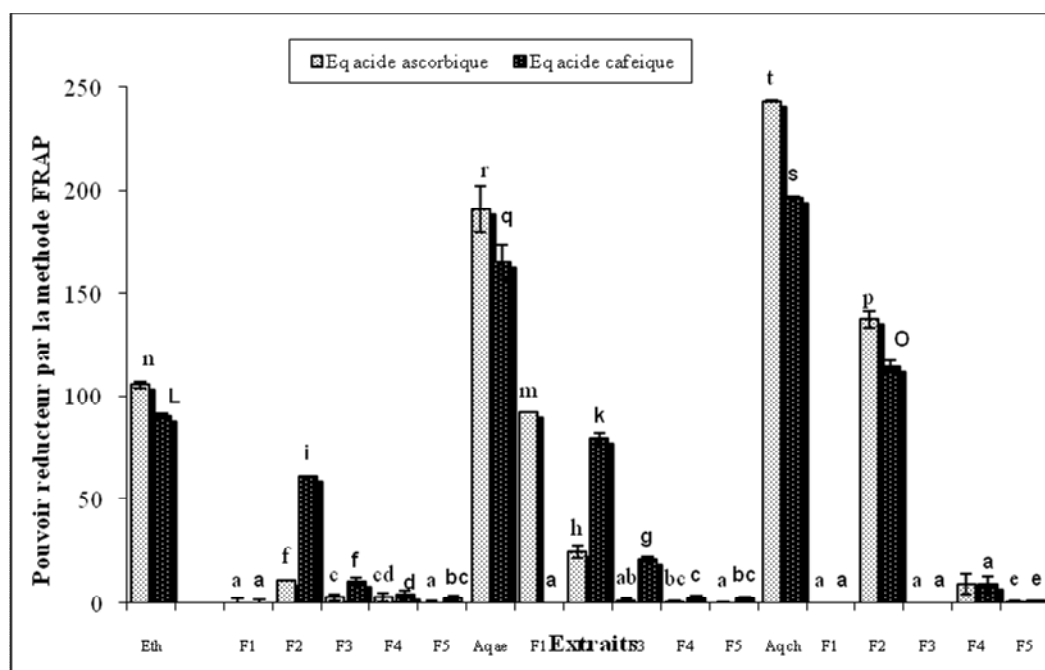


Figure 30 : Pouvoir réducteur des fractions des extraits actifs d'écorce de *F.angustifolia* à 100µg/ml. Eth : éthanol ; Aq ae : aqueux acétate d'éthyle et Aqch : aqueux de chloroforme.

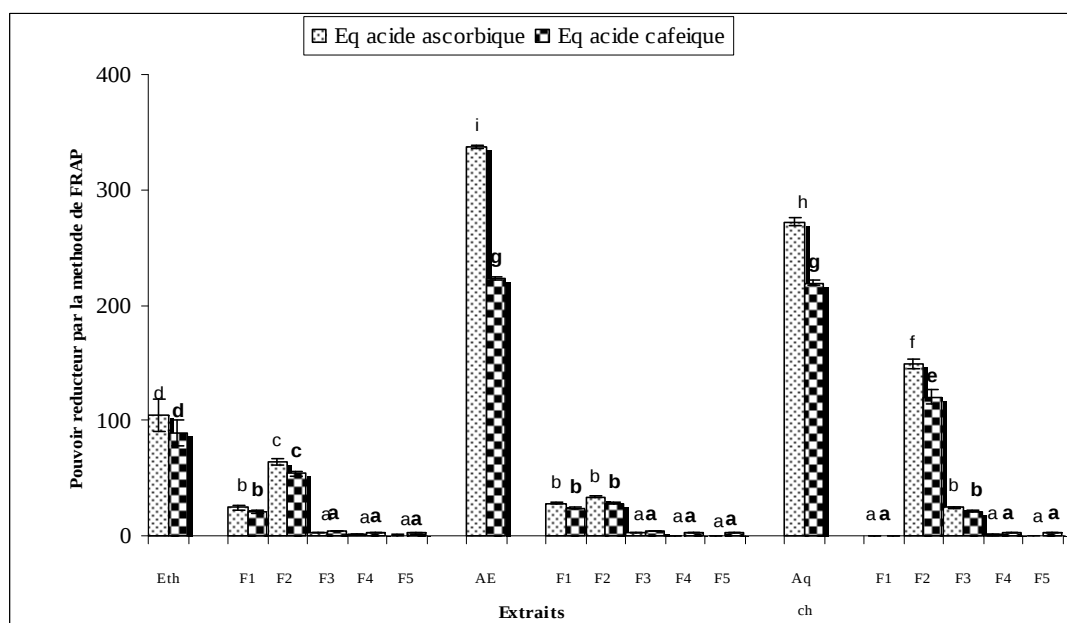


Figure 31 : Pouvoir réducteur des fractions des extraits actifs de feuilles de *F.angustifolia* à 100µg/ml. Eth : éthanol ; AE: acétate d'éthyle et Aqch : aqueux de chloroforme.

De la figure 30, on constate clairement que le pouvoir réducteur (FRAP) des trois extraits réside essentiellement dans la fraction F2, élue par le mélange acétate d'éthyle /méthanol (50 :50/ v : v), celles-ci à enregistrées des valeurs de 137,47, 92,05 et 68,61 mg équivalent acide ascorbique /g d'extrait pour les extraits aqueux de chloroforme, aqueux acétate d'éthyle et éthanol d'écorce respectivement, suivi de la F3 de l'aqueux d'acétate d'éthyle (24,73) , le reste des fractions présentent des valeurs très inférieures.

De même pour les feuilles ce sont les fractions F2 de l'aqueux de chloroforme et d'éthanol qui enregistrent le meilleur pouvoir réducteur avec 148,86 et 64,44 mg équivalent acide ascorbique/g d'extrait, les fractions trois de l'aqueux de chloroforme et d'acétate d'éthyle montrent des valeurs inférieures suivies de F1 de l'éthanol et acétate d'éthyle.

Ces résultats nous permettent de déduire que les principales parties des composés réducteurs de *Fraxinus angustifolia* sont de nature polaire pour l'écorce et moins polaire pour les feuilles.

III.5.2. Activité scavenging des fractions sur le radical ABTS^{•+}

Les résultats du test ABTS^{•+}, mené par les fractions chromatographiques des extraits actifs exprimés en terme d'équivalence Trolox sont représentés dans les figures ci-dessous :

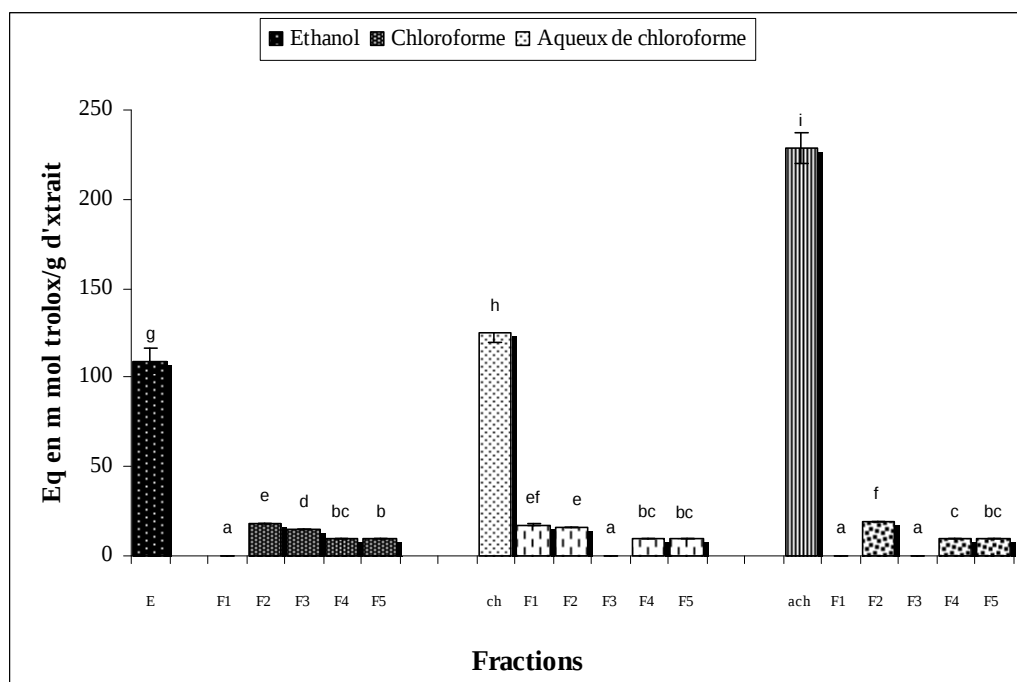


Figure 32 : Capacité antioxydant équivalent Trolox des fractions des extraits actifs d'écorce.

De la figure 32, les meilleures capacités antioxydant équivalent trolox et obtenue par la fraction F2 des trois extraits qui montrent des valeurs supérieures à 16 mmol trolox/g d'extrait ainsi que la F1 de l'extrait de chloroforme, la F3 de l'éthanol enregistre une valeur inférieure (14,59 mmol trolox), tandis que les fractions 4 et 5 donnent des valeurs très proches qui oscillent de 9,44 à 9,99 mmol trolox /g d'extrait. Concernant les feuilles de *Fraxinus angustifolia* (figure 33), toutes les fractions enregistrent des valeurs importantes qui sont supérieures à 16 mmol trolox/g d'extrait, excepté les fractions 3, 4 et 5 de l'extrait aqueux de chloroforme qui montrent des valeurs de 12,84, 10,03 et 9,44 mmol trolox/g d'extrait.

De tels résultats nous permettent de conclure que Les composés responsables de la capacité antioxydant des extraits d'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont de polarités variables ainsi que les extraits natifs présentent des capacités antioxydant très supérieur comparé à leurs fractions, qui peuvent être expliqués par un effet synergique des fractions.

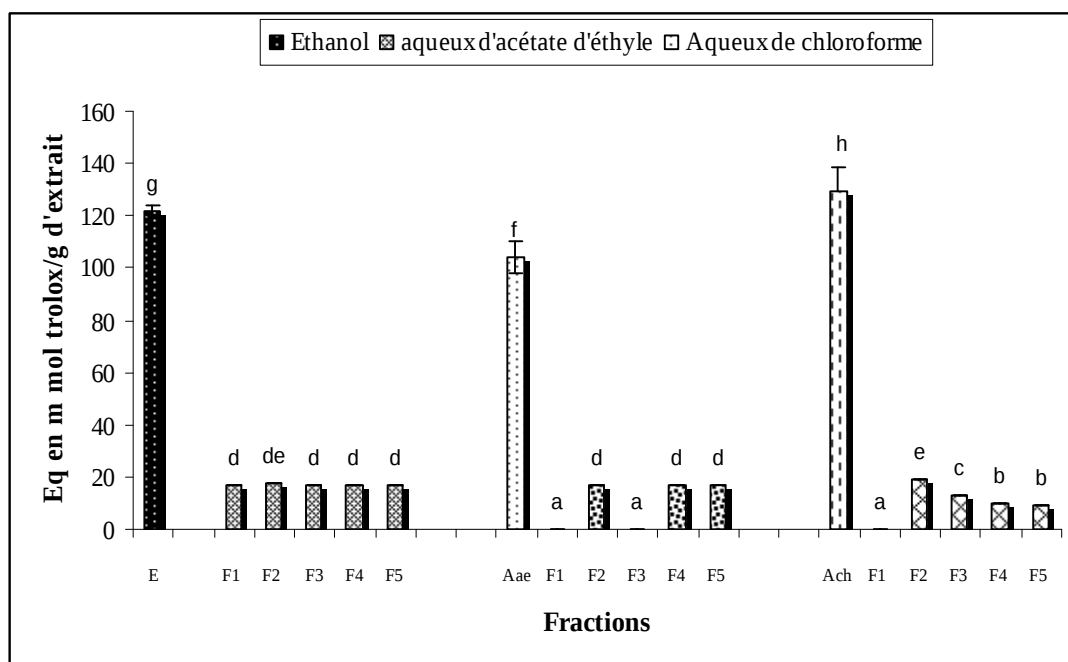


Figure 33 : Capacité antioxydant équivalent Trolox des fractions des extraits actifs des feuilles.

Les figures suivantes (34 et 35) illustrent les résultats de l'activité anti radicalaire contre l'ABTS⁺ exprimés en pourcentages d'inhibitions.

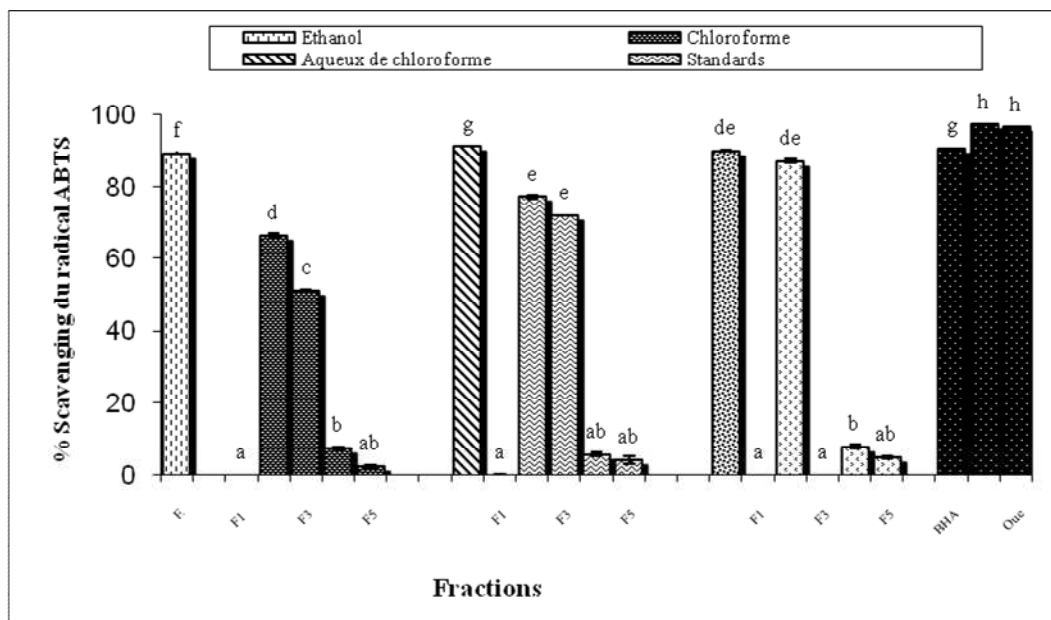


Figure 34 : Effet scavenger contre l'ABTS⁺ des fractions des extraits actifs d'écorce et des standards à 100µg/ml ; ; quer :quercitine, gal :acide gallique et BHA .

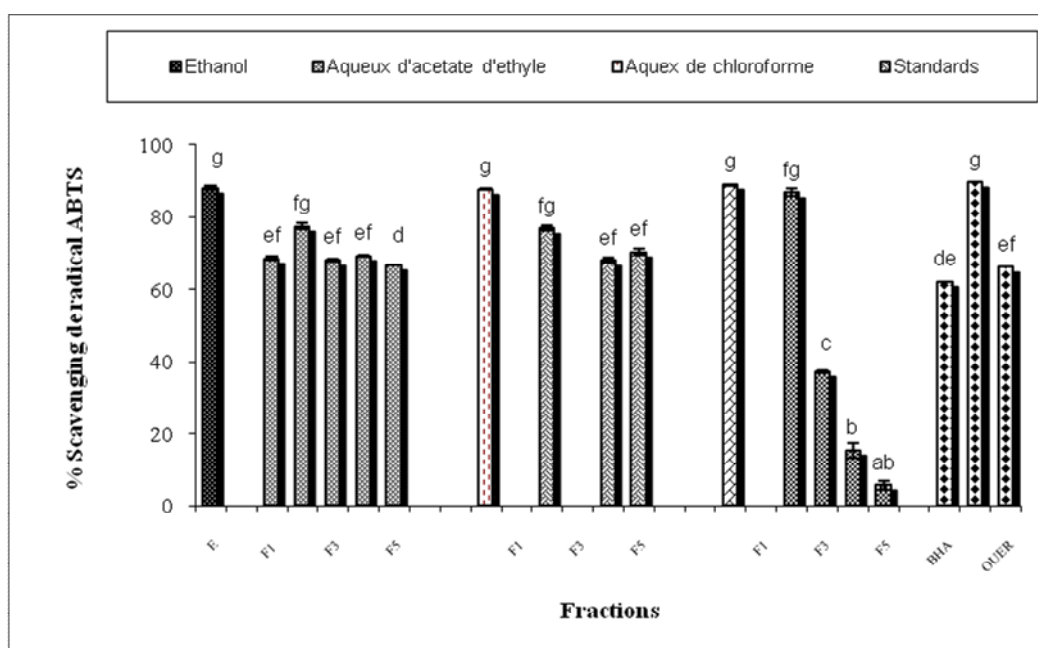


Figure 35 : Effet scavenger contre l'ABTS^{•+} des fractions des extraits actifs des feuilles et des standards à 100µg/ml ; quer : quercitine, gal : acide gallique et BHA .

Selon la figure 34 ci-dessus, on remarque que l'activité anti radicalaire des extraits d'écorce s'est concentrée au niveau des fractions 2 et 3 où de puissants effets scavengers contre le radical ABTS^{•+} sont enregistrés, la fraction F2 de l'extrait aqueux de chloroforme montre une valeur de 87,07% suivi des fractions 2 et 3 de chloroforme avec des pourcentages d'inhibitions de 77,16 et 71,99 % puis par la F2 et F3 de l'éthanol par 66,38 et 51,08 % respectivement, les fractions 4 et 5 ont montrées de très faibles pourcentages d'inhibitions(<8%). De ces résultats nous pouvons dire que les composés responsables de l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} dans les extraits d'écorce sont de nature polaire puisque ces fractions ont été éluées par un système polaire(méthanol/acétate d'éthyle), probablement des flavonoïdes connus pour leurs activité anti radicalaire (Montoro et *al.*, 2005 ; Mathew et *al.*, 2006) .

En ce qui concerne les feuilles, à l'exception de la fraction 5 de l'extrait aqueux de chloroforme toutes les fractions inhibent le radical ABTS^{•+}. le meilleur pourcentage d'inhibition est obtenu par les fractions 2 et 3 de l'extrait acétate d'éthyle qui enregistre des valeurs supérieures à 91% comparables à celles des molécules de références utilisés.

Les fractions 1, 2, 3 de l'éthanol et 3 de l'acétate d'éthyle montrent des pourcentages d'inhibitions supérieurs à 80%, suivis de la fraction éthanolique 4, 4 et 5 de l'acétate d'éthyle avec un pourcentage 70%, les fractions issues de l'aqueux de chloroforme montrent des valeurs inférieures qui varient de 62,19 à 63,10%.

Cela peut être expliqué par le fait que les molécules responsables de l'effet scavenger des feuilles de *Fraxinus* sont de polarités variables.

III.5. 3. Activité scavenging des fractions sur le radical super oxyde

Les résultats de l'effet scavenger du radical super oxyde des différentes fractions chromatographiques obtenues à partir des extraits actifs d'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* ainsi que l'acide caféique à une concentration de 400 µg/ml sont illustrés par les figures 36 et 37.

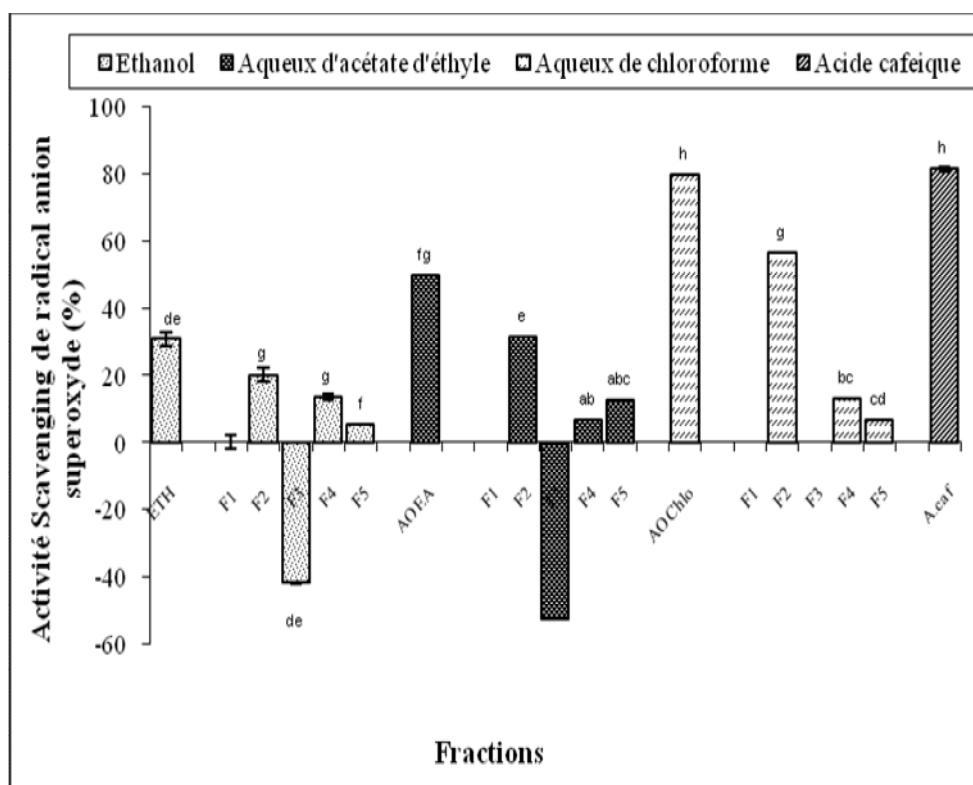


Figure 36 : Effet scavenger contre l'anion super oxyde des fractions des extraits actifs d'écorce et de l'acide caféique à 400 µg/ml.

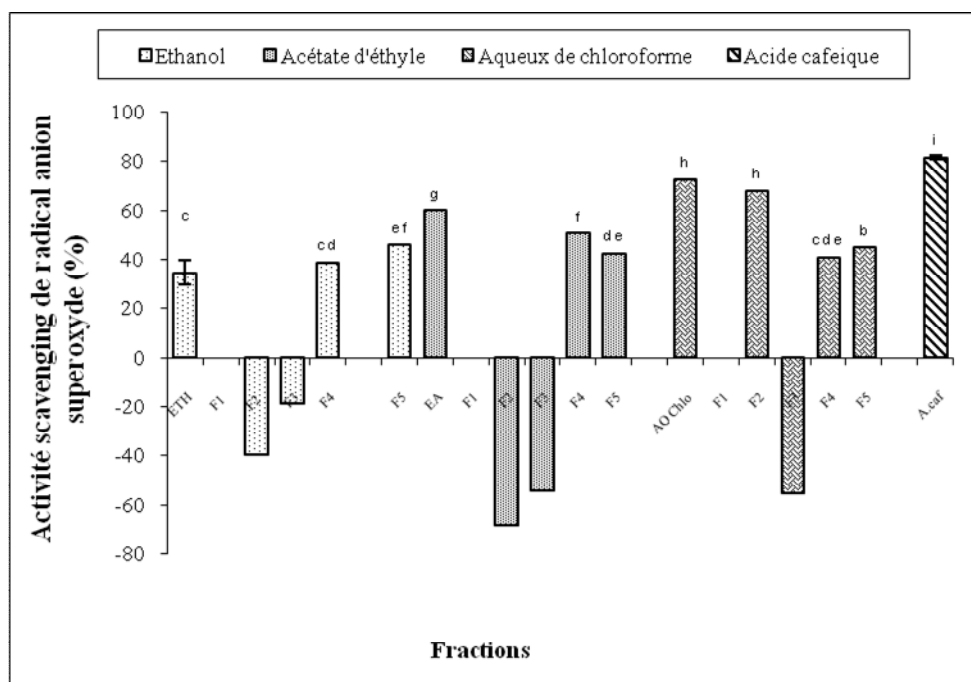


Figure 37 : Effet scavenger contre l'anion super oxyde des fractions des extraits actifs des feuilles et de l'acide caféique à 400µg/ml.

De la figure 35, l'inhibition du radical super oxyde est exercée par les composés contenus dans les fractions 2 issues des extraits éthanol, aqueux acétate d'éthyle et de chloroforme en enregistrant des taux modestes et inférieur à 50%, suivi des fractions 4 issues de l'éthanol et de l'aqueux de chloroforme ainsi que la F5 de l'aqueux de acétate d'éthyle, alors que les F5 issues de l'éthanol et de l'aqueux de chloroforme et la F4 issues de l'aqueux d'acétate d'éthyle enregistrent de très faibles pourcentages d'inhibitions (<7%). On ce qui concerne la fraction 3, elle s'avère proxydante quant elle est issue de l'extrait éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle indiqué par des valeurs négatives.

De même pour les feuilles (figure36), les fractions 2 et 3 issues des extraits éthanolique, acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme sont pro oxydantes et enregistrent des valeurs négatives, excepté la F2 de l'aqueux de chloroforme qui enregistre le taux d'inhibition le plus puissant avec 67,68%. Les F4 et F5 issues de ces extraits montrent des pourcentages d'inhibitions modestes qui oscillent de 38,76 à 50,51%, ces derniers sont supérieurs à ceux données par les fractions issues des extraits d'écorce et inférieurs à celui donné par la molécule de référence (81,41%).

Ces résultats indiquent une fois de plus que les composés actifs responsables de l'effet scavenger de l'anion super oxyde sont de nature polaire pour les feuilles et peut polaire pour l'écorce. L'effet pro oxydant des fractions 2 et 3 indiqué par des valeurs négatives des différent extraits peut s'expliquer par la concentration élevées des composés anti oxydant, devenus pro oxydant sous effet de la concentration ou bien par la décomposition des composés contenus dans ces fractions sous effet du fractionnement conduisant ainsi à des composés oxydants.

III.5. 4. Activité scavenging des fractions sur le radical monoxyde d'azote

Les résultats de l'effet scavenger du monoxyde d'azote des différentes fractions chromatographiques obtenues à partir des extraits actifs d'écorce et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* ainsi que les molécules de références à 100µg/ml sont illustrés par les figures 38 et 39.

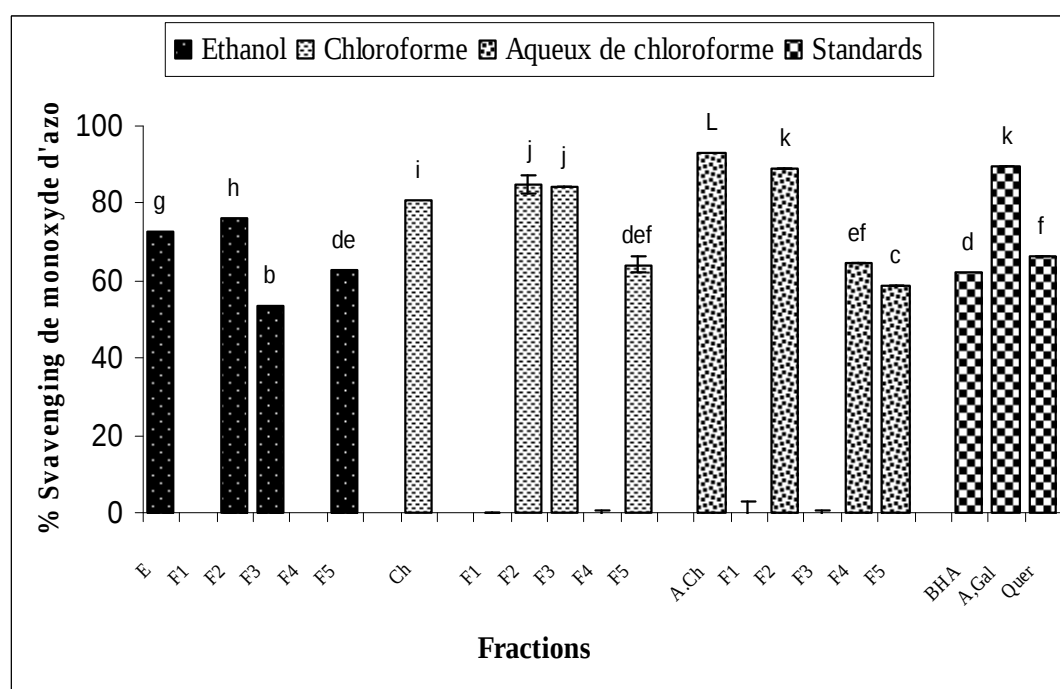


Figure 38 : Effet scavenger contre le monoxyde d'azote des fractions des extraits actifs d'écorce et des standards à 100µg/ml ; E : éthanol, Ch : chloroforme, A-Ch : aqueux chloroforme, A-Gal : acide gallique et Quer : quercitine.

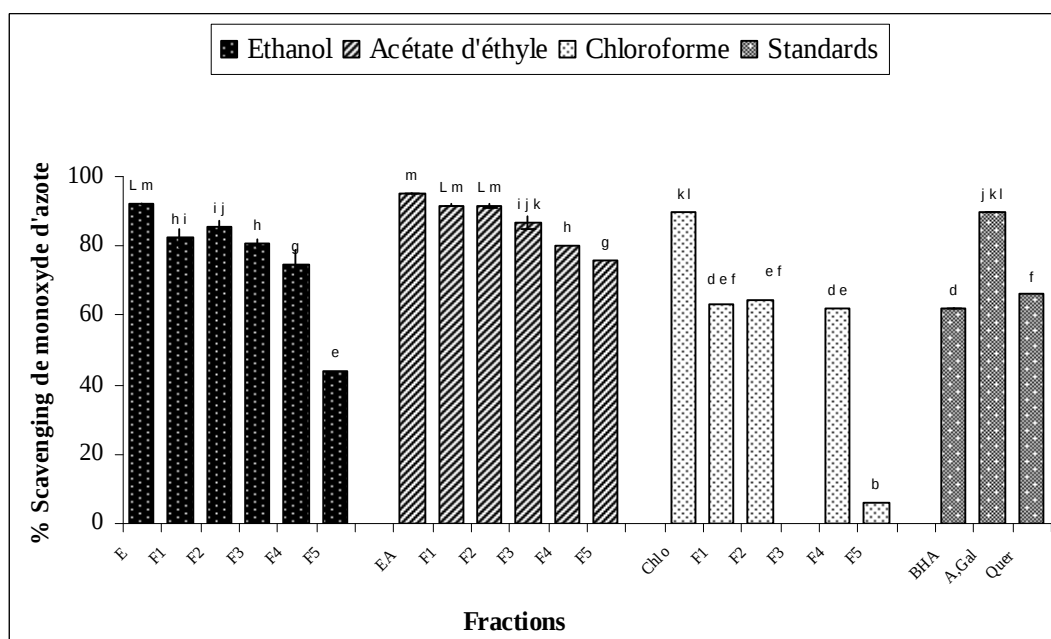


Figure 39 : Effet scavenger contre le monoxyde d'azote des fractions des extraits actifs des feuilles et des standards à 100µg/ml ; E : éthanol, AE : acétate d'éthyle, Ch : chloroforme, A-Gal : acide gallique et Querc : quercitine.

D'après la figure (39) ci-dessus, toutes les fractions issues des extraits éthanol, chloroforme et aqueux de chloroforme d'écorce présentent un effet anti nitrique oxyde important qui dépasse 50%. Les meilleures activités inhibitrices sont obtenues avec la fraction 2 des extraits aqueux de chloroforme et chloroforme et fraction 1 de l'éthanol avec des valeurs de 89,09, 84,75 et 84,51% respectivement comparable à celles obtenues par les molécules de références, suivi de F2 de l'éthanol et F4 du chloroforme, puis F4 de l'aqueux de chloroforme et F5 de chloroforme, le plus faible taux d'inhibition est enregistré par la F3 de l'éthanol avec 53,75%.

Quant aux feuilles, à l'exception de la fraction 5 issue de l'aqueux de chloroforme qui a enregistré un taux d'inhibition très faible (5,86%) et la F5 de l'éthanol avec une valeur de 44,24%, les autres fractions présentent un effet inhibiteur important en enregistrant des pourcentages d'inhibition supérieurs qui oscillent de 62,19 à 86,76%, tandis que les fractions 1 et 2 de l'acétate d'éthyle montrent des valeurs comparables à celles de molécules de références utilisées acide gallique et quercitine qui sont de 91,85 et 91,66%. À partir de ces résultats on conclut que la nature des composés actifs responsable de l'effet scavenger du monoxyde d'azote est polaire pour les extraits d'écorce et de feuilles de *Fraxinus angustifolia* probablement des tannins, des flavonoïdes et des acides phénoliques (Kowti et al., 2010).

III.6. Caractérisation de l'activité antioxydant par CCM

Les résultats précédents indiquent que les composés phénoliques sont les antioxydants majoritaires des extraits bruts et de leurs fractions, des deux parties de la plante étudiée, mais sans parvenir à attribuer cet effet à un composé phénolique bien déterminé ou à plusieurs composés.

Dans cette partie, l'utilisation de la chromatographie sur couche mince permettra, non seulement, le fractionnement des différents composés contenus dans les extraits et dans leurs fractions mais aussi de mettre en évidence l'activité antioxydante en visualisant les fractions responsables de cet effet sous forme de taches colorées.

En effet deux systèmes de séparations sont utilisés ; le système (Acétate d'éthyle-acide formique-acide acétique-eau : AE-AF-AA_C-H₂O) pour les extraits aqueux et le système (Acétate d'éthyle-Hexane- acide formique : AE-Hex-AF) pour les extraits organiques.

III-6-1- Caractérisation de l'activité antioxydante des extraits d'écorce de *F. angustifolia*

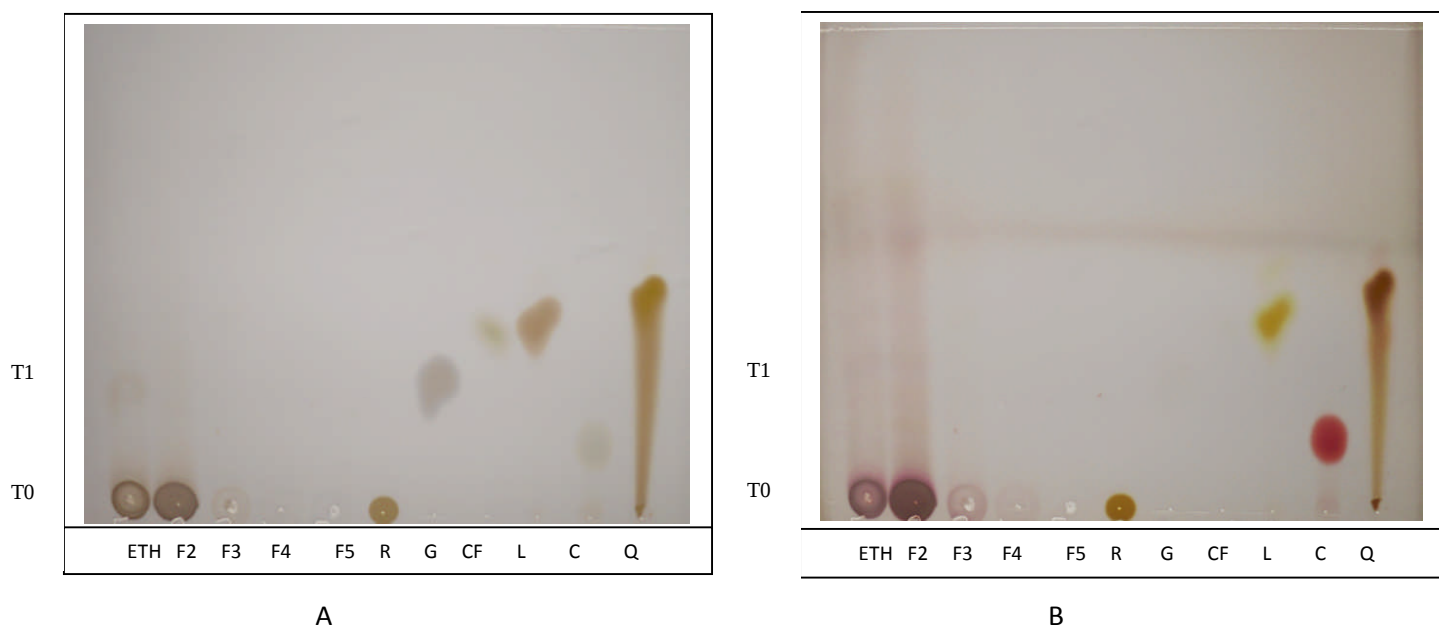


Figure 40: Chromatogrammes de l'extrait éthanolique et ses fractions ; A : à la lumière du jour, B : révélés par la vanilline sulfurique ; ETH : éthanol, R : rutine, G : acide gallique, CF : acide caféique, L : lutéoline, C : catéchine et Q : quercitine.

L'utilisation d'un système de séparation apolaire AE-HEX-AF, nous à permis d'obtenir les chromatogrammes montrés dans la figure 40. L'observation à la l' lumière du jour nous à permis de détecter une tache(T0) de couleur marron observée sur le point de dépôt de l'extrait et la fraction deux, qui peut correspondre à des tannins condensés de haut poids moléculaire et une deuxième tache T1 de couleur plus claire toujours pour l'extrait. On remarque également que la rutine (flavonoïde glycosylé) na pas migrée dans ce système apolaire. La pulvérisation à la vanilline sulfurique à permis la révélation d'autres taches de couleur marron très claire non visibles à la l' lumière du jour qui peuvent correspondre à des monomère de tannins condensés issue de l'hydrolyse de ces derniers par la vanilline sulfurique présent dans notre cas à de très faibles concentrations ou par le fait que le système de séparation utilisé est non adéquat.

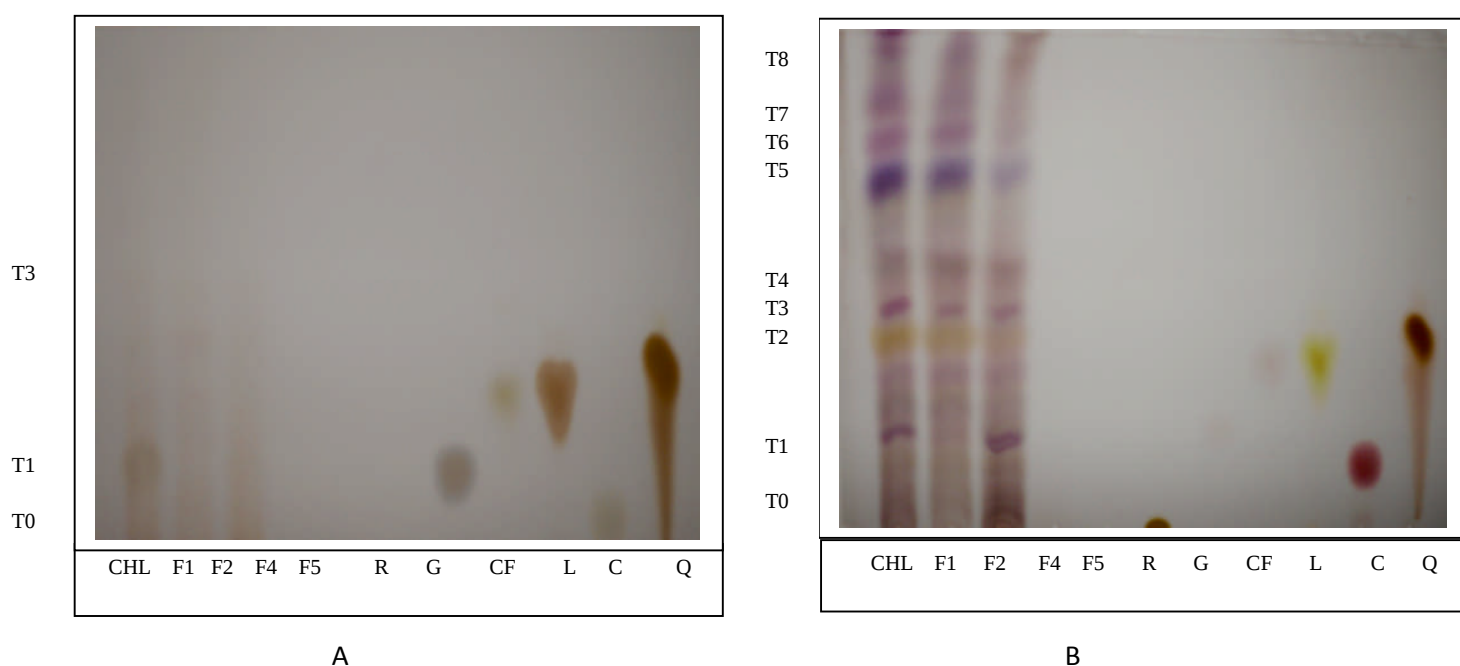


Figure 41 : Chromatogrammes de l'extrait chloroforme et ses fractions ; A : à la lumière du jour, B : révélés par la vanilline sulfurique ; CHL: chloroforme, R : rutine, G : acide gallique, CF : acide caféique, L : lutéoléine, C : catéchine et Q : quercitine.

D'après cette figure, l'observation à la lumière du jour nous à permis de visualiser deux taches de couleurs marron claires qui correspondent à des tannins, la première T0 sur la ligne de dépôt correspondant probablement à des composés de haut poids moléculaire, T1 de l'extrait et de sa F2 et T3 au niveau de l'extrait et sa fraction 1.

Tableau XIV : Caractéristiques des chromatogrammes du chloroforme de l'écorce de *F. angustifolia*

Taches	RF	Observation à la lumière du jour	Révélation par la vanilline sulfurique
T1	0,20	Marron claire	Rose
T2	0,40	Invisible	Jaune
T3	0,47	Marron claire	Mauve
T4	0,54	Invisible	Gris bleu
T5	0,71	Invisible	Violet
T6	0,79	Invisible	Rose
T7	0,83	Invisible	Rose
T8	0,87	Invisible	Mauve

La vanilline sulfurique nous à permis la révélation d'autre taches de couleurs et de RF variables (tableau) commune pour l'extrait et sec fractions 1 et 2, tel que les terpènes (violet), les cardénolides aglycones (bleu) et flavonoïdes (jaunes vert) (Jork et al ., 2004), suggérant ainsi la richesse de cet extrait en ces composés.

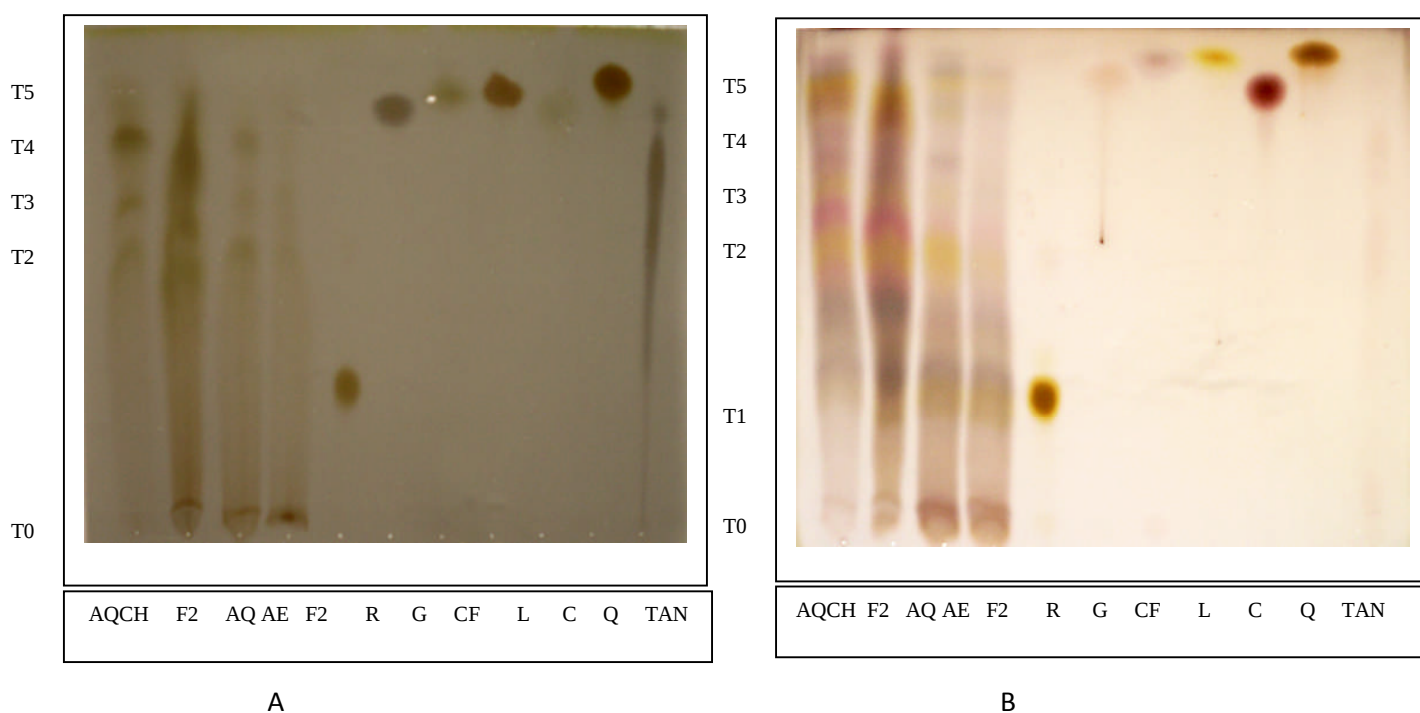


Figure 42 : Chromatogrammes des extraits aqueux et leurs fractions 2 ; A : à la lumière du jour, B : révélés par la vanilline sulfurique ; AQCH : aqueux chloroforme, AQAE : aqueux acétate d'éthyle R : rutine, G : acide gallique, CF : acide caféique, L : lutéoline, C : catéchine, Q : quercitine et TAN : acide tannique.

Tableau XV : Caractéristiques des chromatogrammes des extraits aqueux et leurs fractions F2

Taches	RF	Observation à la lumière du jour	Révélation par la vanilline sulfurique
T1	0,30	aucune couleur	Jaune
T2	0,57	Jaune vert	Jaune
T3	0,62	Jaune vert	rose
T4	0,69	Vert claire	Rose claire
T5	0,82	Vert claire	Jaune

D'après la figure (42) et après pulvérisation par la vanilline sulfurique, des taches de différentes couleurs et RF sont révélées (tableau XV),

une tache (T1) de même couleur et RF que la rutine est remarquée pour l'extrait aqueux acétate d'éthyle et sa fraction F2 ainsi que pour la fraction 2 de l'aqueux de chloroforme confirmant ainsi la présence de la rutine dans cet extrait et ces fractions, une autre tache T5 de couleur identique à la lutéoline mais de RF inférieur est détectée pour l'extrait aqueux de chloroforme et sa fraction F2 qui s'explique par le fait qu'un composé présent dans un mélange complexe, acquière des propriétés différentes de celles du même composé pur.

III.6.2. Caractérisation de l'activité antioxydant des extraits de feuilles de *F. angustifolia*

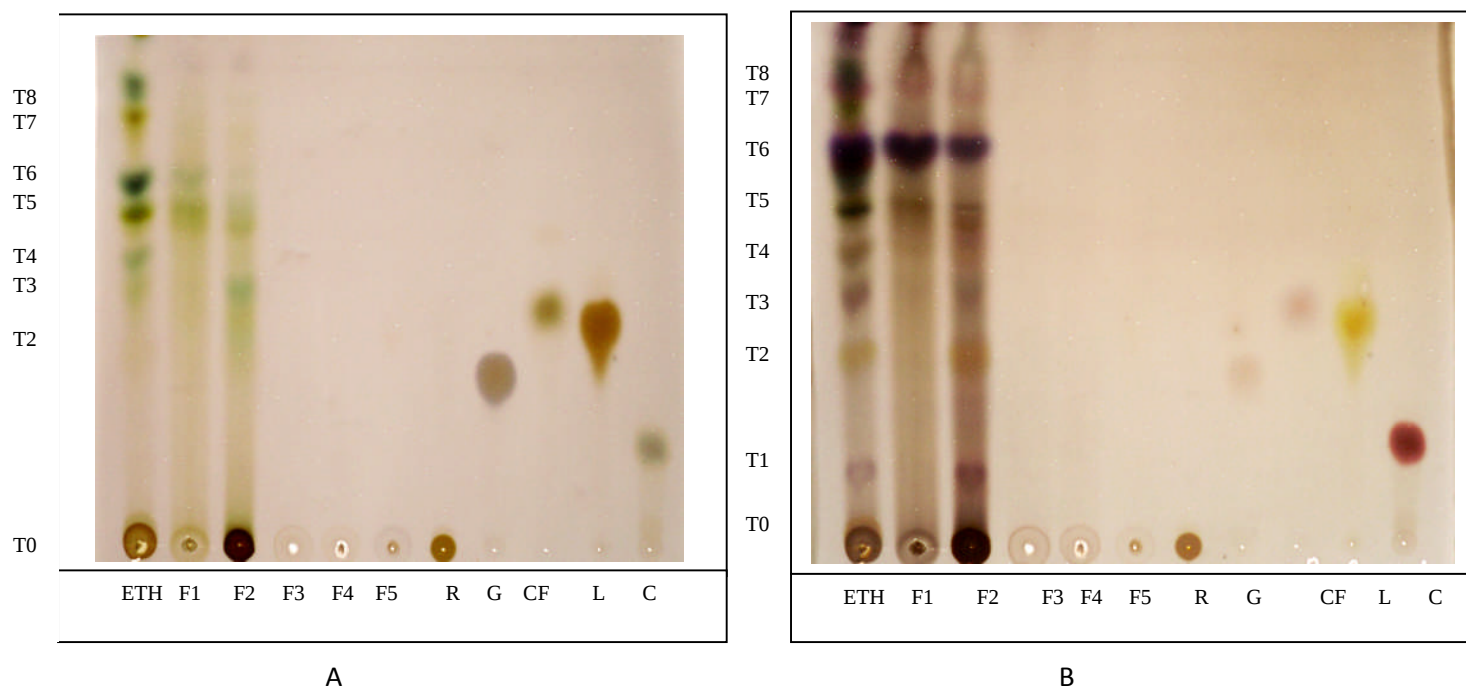


Figure 43 : Chromatogrammes de l'extrait éthanolique et ces fractions ; A : à la lumière du jour, B : révélés par la vanilline sulfurique ; ETH : éthanol ; R : rutine, G : acide gallique, CF : acide caféique, L : lutéoline, C : catéchine.

Table au XVI : Caractéristiques des chromatogrammes de l'éthanol et ces fractions.

Taches	RF	Observation à la lumière du jour	Révélation par la vanilline sulfurique
T1	0,15	Invisible	Rose
T2	0,37	Jaune	Jaune
T3	0,44	Jaune verdâtre	Grise
T4	0,48	vert	Jaune
T5	0,56	Jaune verdâtre	Marron
T6	0,63	vert	Violet
T7	0,75	Jaune	Rose
T8	0,87	vert	Vert

D'après la figure ci dessus, l'observation à la lumière du jour montre des taches de couleurs jaune et vert qui peuvent correspondrai probablement au sucres et flavonoïdes, tandis que, la vanilline sulfurique révèle d'autre couleurs qui tel que le rose, le violet et le gris suggérant dans ce cas la présence d'autres composés, en effet la tache T2 est de couleur plus claire mais de même RF que la lutéoline, de ces observations on peut suggérer la richesse de cet extrait et de ses fraction 1 et 2 en composés polaires notamment les flavonoïdes.

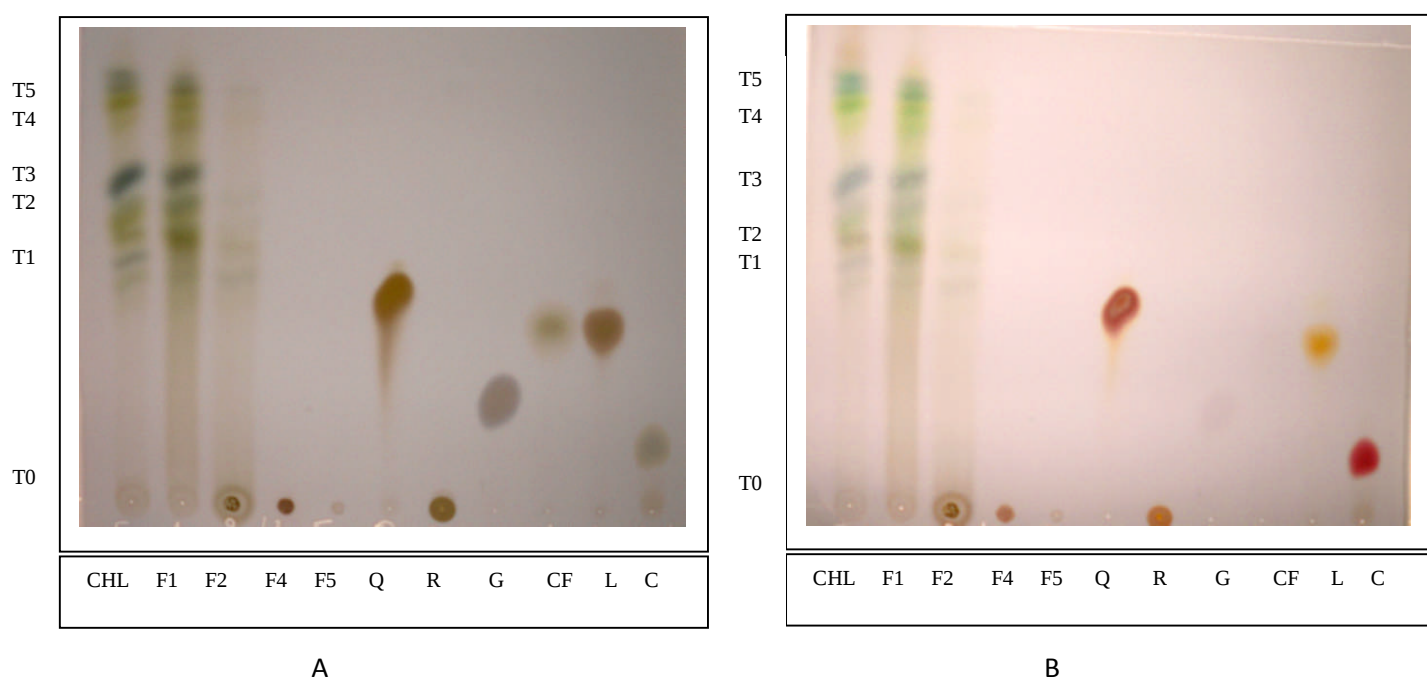
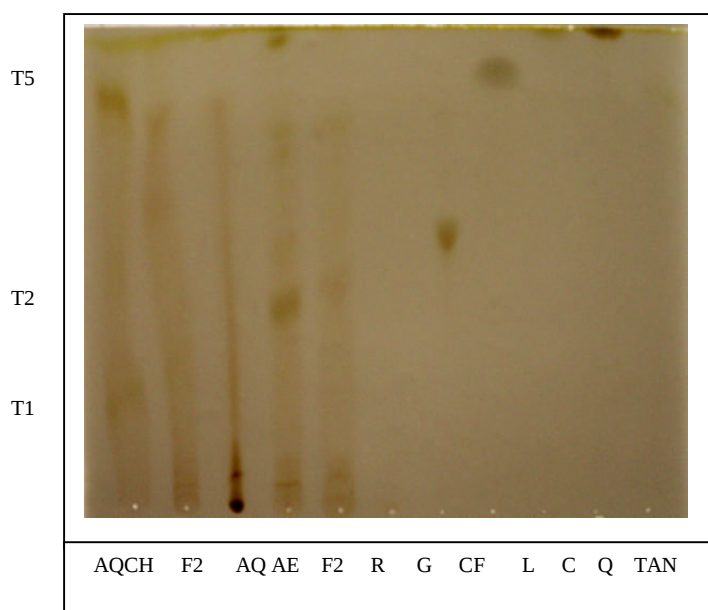


Figure 44 : Chromatogrammes de l'extrait chloroforme et ses fraction ; A : à la lumière du jour, B : : révélés par la vanilline sulfurique; CHL : chloroforme, Q : quercitine R : rutine, G : acide gallique, CF : acide caféique, L : lutéoline et C : catéchine.

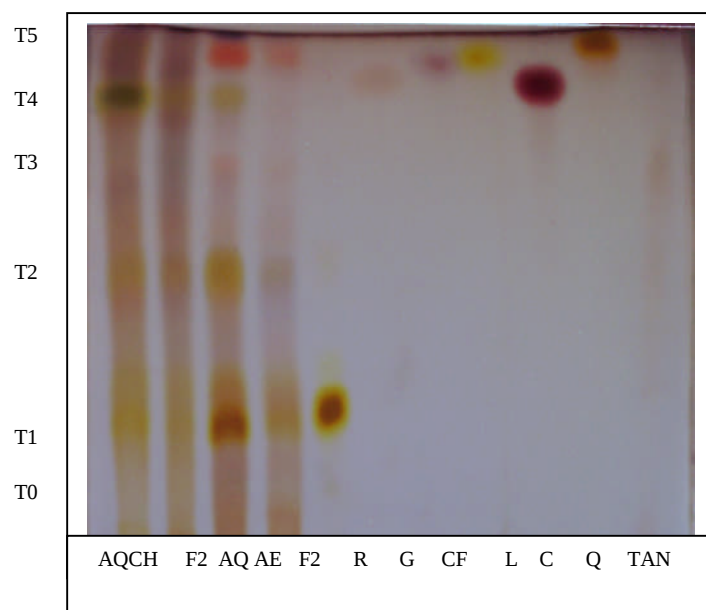
Concernant le chloroforme, après observation à la lumière du jour et révélation par la vanilline sulfurique, on remarque la présence de plusieurs taches de couleur différente ; vert, gris et jaune, la comparaison des couleurs et des rapports frontaux correspondant à ces taches indique qu'aucune correspondance n'existe entre les taches révélées et les molécules de références utilisées.

Tableau XVII : Caractéristiques des chromatogrammes du chloroforme et ces fractions.

Fractions	RF	Observation à la lumière du jour	Révélation par la vanilline sulfurique
T1	0,45	Gris	Gris
T2	0,52	Jaune verdâtre	Jaune
T3	0,62	Vert	Gris
T4	0,82	Jaune verdâtre	jaune
T5	0,87	Vert	Vert



A



B

Figure 45 : Chromatogrammes des l'extraits aqueux et leurs fractions ; A : à la lumière du jour, B : révélés par la vanilline sulfurique; AQCH: aqueux chloroforme, AQAE : aqueux acétate d'éthyle, R : rutine, G : acide gallique, CF : acide caféique, L : lutéoline, C : catéchine, Q : quercitine et TAN : acide tannique.

Tableau XVIII : Caractéristiques des chromatogrammes des extraits aqueux et leurs fractions.

Fractions	RF	Observation à la lumière du jour	Révélation par la vanilline sulfurique
T1	0,3	Vert gris	Jaune
T2	0,53	Jaune claire	Jaune claire
T3	0,71	Invisible	Jaune
T4	0,87	Invisible	jaune verdâtre
T5	0,94	Vert jaune	Rose orange

Le chromatogramme des extraits aqueux de chloroforme et acétate d'éthyle ainsi que leurs fractions de feuilles de *fraxinus angustifolia*, révèle à la lumière du jour des taches de couleur jaune et vert très claire, alors que la révélation par la vanilline sulfurique montre d'autre taches invisible à la lumière du jour de couleurs et de rapports frontaux variables, la tache T1 au niveau de l'extrait aqueux de chloroforme et aqueux acétates d'éthyle ainsi que leurs fractions (F2) correspondantes, montre une couleur similaire à celle de la rutine et partage un rapport frontal (RF) identique avec cette dernière. Dans leur récente étude, Kostova et Iossifova (2007) ont isolé la rutine au niveau des feuilles de *Fraxinus angustifolia*, ce qui correspond à notre résultat.

L'étude réalisée a pour but l'évaluation quantitative et qualitative des substances antioxydant contenue dans les extraits d'écorce et de feuilles d'une plante médicinale locale *Fraxinus angustifolia* et d'estimer leurs activités biologiques dont l'activité antioxydant *in vitro* par différentes méthodes à savoir , le pouvoir réducteur (FRAP), l'effet scavenging du radical cationique ABTS^{•+}, de l'anion super oxyde et du monoxyde d'azote , l'étude des effets anti radicalaires des fractions récupérées par chromatographie sur colonne de gel de silice des extraits actifs et enfin de les caractériser par chromatographie sur couche mince.

Le procédé d'extraction utilisé nous a permis de retenir 5 extraits, le dosage des différents composés phénoliques montre que ces derniers sont riches en phénols totaux, flavonoïdes et tannins. Les extraits aqueux du chloroforme d'écorce et acétate d'éthyle des feuilles sont intéressants en raison de leurs teneurs élevées en phénols totaux ; les extraits aqueux d'écorce, aqueux de chloroforme et acétate d'éthyle des feuilles pour leur teneur en flavonoïdes et les extraits organiques (chloroforme et acétate d'éthyle) pour leur richesse en tannins.

L'activité antioxydant des extraits de *Fraxinus angustifolia* varie considérablement d'un extrait à un autre et d'une partie de plante à une autre, elle est fonction de la concentration et de la nature des composés phénoliques. Les extraits aqueux de chloroforme et d'acétate d'éthyle d'écorce et acétate d'éthyle et aqueux chloroforme des feuilles se montrent plus performants avec les meilleures activités réductrices, l'effet scavenging du radical ABTS^{•+} s'avère très puissant avec des pourcentages d'inhibitions supérieurs à 80% enregistrant ainsi de très faibles valeurs IC₅₀ qui oscillent de 3,01 à 16,92 µg/ml excepté l'extrait chloroforme des feuilles.

La capacité antioxydant équivalent Trolox est très importante pour l'extrait aqueux de chloroforme d'écorce avec une valeur de 228,30 m mol trolox/g d'extrait, alors que les autres extraits montrent des valeurs inférieures qui varient de 109,47 à 176,64 m mol trolox. Quant aux extraits organiques, ils enregistrent des valeurs <100 m mol Trolox.

Concernant l'anion super oxyde, l'extrait aqueux de chloroforme des deux parties étudiées présente le meilleur effet scavenging de ce radical avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 70%. Par conséquent, la valeur IC₅₀ qui exprime le potentiel anti radicalaire le plus puissant est celle de l'extrait aqueux chloroforme de feuilles avec 99,4 µg/ml inférieure à celle donnée par l'acide caféique (116,02µg/ml).

L'évaluation de l'activité anti nitrique oxyde, à une concentration de 100µg/ml, a prouvé que les extraits d'écorce manifestent des effets relativement très importants, supérieurs à 87% et enregistrent de très faibles valeurs IC₅₀ allant de 4,07 à 7,26µg/ml, tandis que les extraits de feuilles enregistrent des valeurs légèrement inférieurs mais comparables à celles montrées par les molécules de référence et enregistrent ainsi des valeurs IC₅₀ très proches.

Les résultats de l'étude de l'activité antioxydant des fractions récupérées à partir des différents extraits à montré que l'effet réducteur et scavenging de l'anion super oxyde se concentre essentiellement au niveau de la fraction 2, la plupart des fractions montrent des pourcentages d'inhibitions >50% contre le radical ABTS^{·+} et NO[·], suggérant ainsi une polarité variable de composés responsables de ces activités scavenging.

L'analyse par chromatographie sur couche mince des extraits et de leur fractions à montré la présence probable de la rutine dans les extraits aqueux acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme d'écorce et de feuilles et leur fraction 2, également de la lutéoline dans les extraits éthanol et chloroforme de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* ce qui témoigne la richesse de cette plante en divers composés notamment les flavonoïdes.

Il serait nécessaire d'approfondir ce travail par l'évaluation de l'activité antioxydant *in vitro* contre d'autres radicaux libres tel que le Peroxynitrite ONOO[·] l'acide hypochlorique OHCL, l'anion super oxyde et le monoxyde d'azote générés par des systèmes enzymatiques. L'isolement et l'identification des composés phénoliques par des méthodes plus performantes (HPLC) et la réalisation des tests *in vivo*, à savoir, l'activité anti diabétique et anti-inflammatoire permettraient une meilleure évaluation de l'activité biologique générale de *Fraxinus angustifolia* et une justification scientifique de son utilisation en médecine traditionnelle.

- Afonso, V. ; Romuald, C. ; Dragoslav, M.; Pascal, C, Abderrahim, L. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et Superoxyde dismutase : rôle dans les maladies rhumatismales *revue du rhumatisme*, **74** :636-643.
- Amarowicz, R. ; Dykes, G. A ; and Pegg, R. B.(2008). Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia*. **792**: 17-219.
- Ani, V.; Varadaraj, M.C.; Akhilender Naidu, K. (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L). *European food research and technology*. **224**: 109-115.
- Ao, C.; Li, A.; Elzaawely. A. A. and Tawata. T. D. X. S. (2008). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. Extract. *Food Control*. **19**: 940-948.
- Arumugan, P.; Ramamurthy, P.; Santhiya, S-T. and Ramesh, A. (2006). Antioxydant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn.: An analysis by ABTS.+ decolorization assay. *Journal of Clinical Nutrition*.119-124.
- Ay, M.; Bahadori, F.; Öztürk, M.; Kolak, U.; Topçu, G . (2007). Antioxidant activity of *Erica arborea*. *Fitoterapia*. **78**: 571–573.
- Ba, K.; Tine, E.; Destain, J.; Cissé, N. et Thonart, P. (2010). Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. **14** :131-139.
- Baba Aissa, F. (2000). Encyclopédie des plantes Utiles .Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident. Librairie Moderne- Ruiba. *Dépôt légal* .N°91, P1-294.
- Babior, B.M.; Lambeth, J.D.; Nauseef, W. (2002). The neutrophil NADPH Oxidase. *Archive of Biochemistry and Biophysics*. **397**: 342-344.
- Badeau, M. (2006). Effet d'un antioxydant, le tempol, sur les actions métaboliques et vasculaire de l'insuline chez le rat insulino-résistant avec un surplus de poids, effet de l'insuline sur le transport de glucose dans le muscle squelettique, la réactivité vasculaire, l'expression des protéines NOS le stress oxydatif et les effets hémodynamiques régionaux. *Thèse de grade de maitre des sciences Université Laval Québec*
- Baillly R. (2004). Première floraison et changement de phyllotaxie chez *Fraxinus angustifolia* Vahl: Approche architecturale et morphologique. **P**: 5.
- 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.
- Bamforth, C. W. (1999). Beer haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. **57**: 81–90.

- Bartosz, G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. **9**: 5-21.
- Beaudeau, J. L. and Vasson, M. P. (2005).** Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène in: Radicaux libres et stress oxydant Aspects biologiques et pathologiques. Editions Lavoisier, Paris, page: 45-86.
- Beaudeau, J. L.; Delattre, J. ; Therond, P. ; Bonnefont-Rousselot, D.; Legrand, A. and Peynet, J. (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose .*immuno-analyse & Biologie spécialisée* ,**21** :144-150.
- 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.
- Beiler, J. M. and Mactin, G. J. (1951):** Flavonoids as protein tyrosine kinase inhibitors. *J Bioi Chem* **192**:831-40.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*: **239**, 70-76.
- Berger, M. M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **20**: 48-53.
- Bernard, B. (1997).** Dictionnaire : Plantes et champignons. *Edition ESTEM*, **P**: 190-345.
- Berthrod, A.; Billardello, B. and Geoffroy, S. (1999).** Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation 1. *Analysis.EDP Sciences, Wiley-VCH*. **27**:750-757.
- Boizot, N. and Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier .*Le Cahier des Techniques de l'Inra*. **P**: 79-82
- Borg et Reeber A. (2004).** le stress oxydant .in Biochimie métabolique .Ellipses, Paris: 217-228.
- Bruneton, J. (1993).** Composés phénoliques: Shikimate-acétate. In Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. Technique et documentation Lavoisier (Paris) ; Partie **P**: 310-345.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales, Edition. *Technique et documentation* Lavoisier, Paris.
- Bruneton, J. (2008).** Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. Edition. *Technique et Documentation*. **P**: 199-339.
- Bruneton, J. (2009).** *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 4^{ème} édition. Lavoisier. *Technique et Documentation*., Paris, 1288p.
- Buettner, G. R. and Jurkiewicz, B. A. (1996).** Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*, **145**: 532-541.
- Substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident. Librairie Moderne- Ruiba. *Dépôt légal*

- Cai, Y.; Luob, O.; Sunc, M. and Corkea, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*. **74**: 2157–2184.
- Çanakçı, C.; Fçiçek, Y. and Çanakçı, V. (2005). Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Moscow)*. **70** (6):619-628.
- Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M. et Arnao, M. B. (2002). Antioxidant activity determination: comparaison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{°+} assay. *Redox Report*, **7**, 103-109.
- Cash, T.; Pan, Y.; Simon, M.C. (2007). Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free radical biology and medicine*. **43**: 1219-1225.
- Ceriello, A. (2004). La glycémie après le repas : Métabolisme et alimentation .*Diabètes Voice* ,**49** :8-11.
- Chabaud, M. (2007). Utilisation des antioxydants en hépatologie chez les carnivores domestiques. *Thèse de doctorat Université Claude Bernard - Lyon I*.
- Chan, E.W.C.; Lim, Y.Y. and Mohammed, O. (2007): Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae) in peninsular Malaysia. *Food Chemistry*. **104**: 1586-1593.
- Chang, W. S.; Lee, Y. J.; Lu, F. J. and Chiang, H. C. (1993). Inhibitory effect of flavonoïds on xanthine oxydase. *Anticancer Reserche*. **13**: 2165-2170.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Chimistry Nutrition.*, **81**: 223-229.
- Chiang H.C., Lo Y.J. et Lu F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila Spinulose* (hook) Tryon. *Journal of enzyme inhibition*. **8**: 16-71.
- Chiarugi, P. and Fiaschi, T. (2007). Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cellular Signalling*. **19**: 672-682.
- Chira, K.; Suh, J.H. and Teissédre, P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*. **6**: 75-82.
- Chryssavgi, G.; Vassiliki, P.; Athanasios, M.; Kibouris, T.; and Michael, K. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, **107**:1120-1130.
- Cia, Y. Z.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q. and Corke, H. (2005). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*. **78**: 2872-2888.
- Contini, M.; Baccelloni, S.; Massantini, R. and Anelli, G. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*acaorylus avellana* L) shell and skin wastes by maceration at room temparature. *Food Chemestry*. **1**: 569-590.
- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Van-Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J. and Vanden Berghe, D. (1998). Structure-Activity Relationships and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Free Radicals. Biology Medecine*. **22**: 749-760

- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**(4): 564-582.
- Dean, R. T.; Fu, S.; Stocker, R. and Davies, R. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemistry Journal*, **324**: 1-18.
- Del Rio, L.A.; Corpus, F.J.; Sandalio, L.M.; Corpus, F.J.; Pastori, G.M.; Bueno, P. and Lopez-Huertas, E. (1996). Peroxisoms as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society Transactions*. **24**: 434-438.
- Densiov, E.T. and Afanas'ev, I. B. (2005). IN: *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A). P: 703-861.
- Derbel, S. et Ghedira, K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et Nutrition*. **1**: 28-34.
- Djeridane. A. ; Yousfi . M. ; Nadjemi .B. ; Boutassouna .D. ; Stocker. P. ;Vidal. N. (2006). Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. **97**: 654-660.
- Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, **5** :246-270.
- 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.
- Essop, A.B.; Zyl van, R.L.;Vuuren van, S.F.. Mulholland, D. and Viljoen, A.M. (2008). The *in vitro* pharmacological activities of 12 South African *Hermannia* species. *Journal of Ethnopharmacology*. **119**: 615-619.
- Falleh, H.; Ksouri, R.; Chaieb, K.; Karray-bouraoui, N.; Trabelsi, N. ; Boulaaba, M. and Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organ, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. **331**: 372-379.
- 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.
- Flourie, F.; Arab, K.; Rossary, A.; and Steghens.; J. P. (2006). Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation *in vitro* initiée par le radical °OH. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*. **21**: 229-233.
- Fontaine, E, D. ; Barnoud, C. ; Schwebel, X. ; Leverve. (2002) .Place des antioxydants dans la nutrition de patient septique .*Réanimation* , **11** :411-20.
- Frederiks, W. M. and Bosch, K. S. (1996). The proportion of xanthine oxydase activity of total xanthine oxydorèductase activity *in situ* remains constant in rat liver under. *Journal Hepathology*. **21**:1180-1184.
- Fukagawa, N.K. (1999). Aging: is oxidative stress a marker or is it a causal?. *Society for Experimental Biology and Medicine*. **222**: 293-298.

- Gardeli, C. ; Vassiliki, P. ; Athanasios, M.; Kibouris, T. and Michael, K. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food chemistry*. **107**:1120-1130.
- Gardès-Albert, A. M.; Bonnefont, D. R.; Abedinzadeh, Z. et Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité Chimique*, 91-95.
- Gaussen, H. ; Leroy, J.F. et Ozenda, P. (1982). Précis de botanique. Végétaux supérieurs. 2^{ème} édition. Masson, Paris. P: 417.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **4**: 162-169.
- Gorinstein, S.; Cvikrova, M.; Machackova, I.; Haruenkit, R.; Park, Y. S. ; Jung, S. T.; Yamamoto, K.; AYALA, A. L. M.; Katrich, E. and Trakhtenberg, S. (2004). Characterization of antioxidant compounds in Jaa sweets and white grapefruits. *Food Chemistry*. **84**: 503–510.
- Goudable, J. et Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **11**: 115-20.
- Gourine, N.; Yousfi, M.; Bombarda, I. ; Nedjmi, B. ; Stocher, P and Gaydou, E.M. (2010). Antioxidant activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Phytotherapy research*. **9**:1237-1242.
- Green, S.J. (1995). Nitric oxide in mucosal immunity. *Nature Medicine*, **1** (6) : 515-517.
- 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.
- Groussard, C. (2006). Stress oxydatif et exercice anaérobie. *Science et sports*, **21** :62-67.
- Gutteridge, J. M. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free radical research communications*. **19**:141-158.
- Guignard, J.L. (2000). Biochimie végétale, 2^{ème} édition. Dunod, Paris, p : 169.
- Guignard, J. L. (2004). Biochimie végétale. 3^{ème} édition. Dunod, Paris : p : 274.
- Hagerman, A.E and Bulter, I. G. (1978). Proteine precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Agriculture and food chemistry*. **26**: 809-812.
- Halliwell, A. and Gutteridge, J. M. C. (1990). The antioxidant of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*. **280**: 1-8.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989): Lipide peroxidation: a radical chain reaction Free radicals in biology and medicine, Clarendon press, Oxford. 188-276.
- Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cellculture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. **142**:31-2.

- Halliwell, B. and Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cellculture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. **142**:31-2.
- Hannebelle, T.; Sahpaz, S. et Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. **1**: 3-6.
- Harikrishna, D. ; Appa Rao, A. V. N. and Prabhakar, M. C. (2004). Pharmacological investigation of prunin -6-O-p-coumarate: A flavonoid glycoside. *Indian Journal Pharmacology*. **36 (4)**: 244-250.
- Harman, D. Arging. (1956): A theory based on free radicals and radiation chemistry. *J. Gerontol*. **11**: 298-300. In (Servais, 2004).
- Harput, U. S.; Genç, Y.; Khan, N and Saracoglu. C (2011). Radical Scavenging Effects of Different *Veronica* Species. *Rec. Nat. Prod*. **5(2)** : 100-107.
- Harrison, D.; Griendling, K. K.; Landmesser, U.; Hornig, B. and Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. **91**: 7-11.
- Hartmann, A. and Niess, A. M. (2000). Oxidative DNA damage in exercise. P: 195–217.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemistry Pharmacology*. **32** : 1141-1148.
- 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.
- Heller, W. and Forkmann, G. (1993). The Flavonoids, Advances in research. P: 499-535.
- Holvoet, P. (2004). Oxidized LDL and coronary heart disease., *Acta Cardiol*. **59**: 479-484.
- Hong, J.; Bose, M.; Ju, J.; Ryu, J.H.; Chen, X.; Sang, S.; Lee, M. J and Yang, C. S. (2004): Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis* **25(9)**: 1671–1679
- Huang, D.; Ou, B. and Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. **53**:1841-1856.
- Huang, Y.; Hwang, J.; Lee, P.; Ke, F.; Huang, J.; Huang, C.; KandaSwamic, J. R. B. M. and Lee, M. (1999). Effects of Luteolin and Quercetin inhibitors of tyrosine kinasa on cell growth and metastasis-associated properties in A43Al cells over expressing epidermal growth factor receptors. *Bretich Journal of Pharmacology*. **128**: 999-1010.
- 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 Technologie*. **10**: 228-234.

- Jayaprakasha, G.K. and Patil, B.S. (2007). *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry*. **101**: 410-418.
- Jork, F. and Wimmer, F. (2004). Thin layer chromatography: Reagent detection methods ; Edition VCH.1 :352-446.
- Judd, W. S.; Campbll, C. S.; Kellogg, E.A. et Stevens, P. (2002). Botanique systématique. Une perspective phylogénétique. Edition : De Bocck. P: 467.
- Kaviarasan, S.; Naik, G.H.; Gangabthagirathi, R.; Anuradha, C.V. and Priyadarsini, K.I. (2007). In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry*.**103**: 31-37.
- Kavutru, M. and Melzig, M.F. (1999). In vitro effects of selected flavonoïds on the 5'- nucleotidase activity. *Pharmazine*. **54**: 457-9.
- Khanbabaee, K. and Van, Tee, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural Product Report*, **18**: (6) 641–649.
- Kim, H. P.; Son, K. H.; Chang, H. W. and Kang, S. S. (1996). Flavonoids: Potential anti-inflammatory agents. *Nat.Prod. ScL (Korea)*. **2**: 1-8.
- Kim, H. K.; Cheon, B. S.; Kim, Y.H.; Kim, S. Y. and Kim, H. P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264. 7 and their structure-activity relationships. *Biochemistry Pharmacology*. **58**: 759-765.
- Kimura, Y. Okuda, H. ; NomuraKimura, Y. ; Okuda, H. ; Nomura, T. ; Fukai, T. and ArichiS. (1986). Effects of flavonoids and related compounds frommulberry tree on arachidonate metabolism in rat platelet homogenates. *Chem. Pharm. BulL*. **34**:1223-1227
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique and métabolique*. **20**:165-177.
- Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. **30**: 620-650.
- Kostova, I.; and Iossifova, T. (2007). Chemical components of Fraxinus species. *Fitoterapia*, **78**: 85-106.
- Kowti1, R.; Hareesh, A. R.; Harsha, R.; Mohammed, G. A.; Dinesha, R. and Irfan, A. M. (2010). *In vitro* free radical scavenging activity of leaves of *Spathodea campanulata* p. beauv. *International Journal of Drug Development & Research*. **2(3)**: 622-628.
- Lehucher-Michel, M.P.; Lesgards, J.F.; Delubac, O.; Stocker, P.; Durand, P. and Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. **30**: 1076-1081.
- Li, H. B.; Wong, C. C.; Cheng, K.W.; and Chen, F. (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*. **41**: 385-390.

- Lim, Y. Y.; and Murtijaya. J. (2006). Antioxydant properties of *Phyllanthus amarus* extracts affected by different drying methods. *LWT*, **40**: 1664-1669.
- Lin, C. M.; Chen, C.S.; Chen, C.T.; Liang, Y.C. and Lin, J.K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.**294**: 167–172.
- Liu, F.; Qoi, V. E. C. and Chang, S. T. (1997). Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts. *Life science*. **60**: 763-771.
- Lotito, S. B and Frei, B. (2006): Dietary Flavonoids Attenuate Tumor Necrosis Factor-induced Adhesion Molecule Expression in Human Aortic Endothelial Cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **281** (48): 37102-37110.
- Lugasi, A.; Hovari, J.; Sagi, K. V. and Biro, L. (2003). The role of antioxydant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*.**47** (1-4), 119-125.
- Luttge, U.; Kluge, M. and Bauer, G. (2000). 15 substances naturelles. 214 p.
- Macheix, J. J.; Fleuriet, A. et Sarni-Manchado, P. (2006). Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaire. Edition *Technologie et document*. Paris. 380-398.
- Maeda, S.; Saikawa, Y.; Kubota, T.; Aoki, M.; Otani, Y.; Furukawa, T.; Watanabe, M.; Kumai, K. and Kitajima, M. (2003). No cross-resistance of taxotere and taxol to conventional chemotherapeutic agents against gastric cancers as detected by MTT assay. *Anticancer Review*, **23** (4): 3147-3150.
- Maksimović, Z.; Malencic, N. and Kovacevic, N. (2005). Polyphenols contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource technology*. **96**(8): 873-877.
- Manna, S. K.; Mukhopadhyay, A. and Aggarwal, B. B. (2000). Resveratrol Suppresses TNF-Induced Activation of Nuclear Transcription NF- κ B, Activator Protein-1, and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid peroxidation., *Journal of Immunology*.**164**: 6509-6519.
- Mancini, L.; Packer, L.; Droy-Lefaix, M.T.; Sekaki, A. and Garde's-Albert, M. (1994). Antioxidant action of Ginkgo biloba extract Egb 761. *Methods of Enzymology*. **234**: 462-475.
- Marfak, A. (2003). Radiolyse Gamma des flavonoïdes, étude de leur Réactivité avec les radicaux issus des Alcools : formation de Depsides, thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges spécialité biophysique. P : 187.
- Marnett, L. J. (2000): Oxy radicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. **21**: 361-370.
- Martínez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. **77**: 147-161.

- **Mathew, S. and Emilia, A. T. (2006).** In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and chemical toxicology*. **44**: 198-206.
- **Mazoyer, M. (2002).** Larousse agricol. *Larousse*, P :281-310.
- **Melzig, M. F. (1996).** Inhibition of adenosine deaminase activity of aortic endothelial cells by selected flavonoids. *Planta Med.* **62**:1-20.
- **Mi Yoo, K.; Hwan Lee, C.; Lee, H.; MoonYong, B. and Lee, C. (2008).** Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*. **106**: 929–936.
- **Middleton, E. and Kandaswami, C. (1992).** Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemistry Pharmacology*. **43**: 1167-1179.
- **Middleton, E.J.R.; Kandaswami, C. and Theoharis, C.T. (2000).** The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacology Review*. **52**: 673–751.
- **Milane, H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres : étude et application thérapeutiques. *Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur*, Domaine : Pharmacochimie.
- **Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A. ; Davies, M. J. ; Gopinathan, V. and Milner, A. (1993).** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. **84**, 407-412.
- **Miller, N. J.; Sampson, J.; Candeias, L. P.; Bramley, P. M. and Rice-Evans, C. A. (1996).** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*. **384**, 240-242.
- **Mochizuki, M.; Yamazaki, S.; Kano, K. and Ikeda, T. (2002).** Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1569**: 35-44.
- **Muetzel, S. and Becker, K. (2006).** Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. *Animal Feed, Science and Technology*. **125**: 139-149.
- **Nacz, M.; and Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. **1054**: 95-111.
- **Nacz, M.; and Shahidi, F. (2006).** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**: 1523-1542.
- **Nagao, A.; Michiko, S. and Hidetaka, K. (1999).** Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. **63**: 1787-1790.
- **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

- Neuzil, J. and Stocker, R. (1993) Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters*. **331**: 281-284.
- Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*. **66**: 2012-203.
- 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.
- Pal Yu, B. (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiopathological Reviews*. **74**: 139-155.
- Pantelidis, G. E.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G. A. and Diamantidis, Gr. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. *Food Chemistry*. **102**: 777-783.
- Pastre, J. et Piymenko, N. (2007). Intret des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Médecine Vétérinaire*. **4** : 180-189.
- Philips, A.; Sachu Philip.; Arul1,V.; Padmakeerthiga, V.; V Renju, Santha, S. and Sethupathy1. S. (2010). Free Radical Scavenging Activity of Leaf Extracts of *Indigofera Aspalathoides* – An in vitro Analysis *Journal. Pharmaceutical. Sciences. & Reseaerch*.**6**: 322-328.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxydants. *Journal of Natural Products*. **63**: 1035-1042.
- Pilarski, R. ; Zieliński, H. ; Ciesiolka, D. ; Gulewicz, k. (2006). Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* .**104**: 18–23.
- Pincemail, J. ; Bonjean, K. ; Cayeux, K. and Defraigne, J.O. (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **16**: 233-239.
- Thomassin, G et Lacroix, P. (2005). Cartographie de végétaux natifs pour la mise en place d'une pépinière expérimentale. Saumur Loire développement antenne régionale des pays de la Loire, **6** :1-23.
- Radjeshwar, Y.; Senthil Kumar, G.P.; Gupta, M. and Mazumder, U. K. (2005). Studies on in vitro antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna Pruriens* (FABACEAE) seeds. *European Bulletin of Drug Research*. **13**(1): 31-39.
- Rakesh, S. U.; Patil, P. R . and Salunkhe, V. R. (2010). Free radical scavenging activity of hydroalcoholic extracts of dried flowers of *Nymphaea stellata* Willd. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. **1**(2) :1-9.
- Razali, N. ;Razab, R. ;Junit,S.M AND Abdul Azize, A. (2008). Radicalsavenging reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry*, **111**: 38-44.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**: 1231-1237.

- Ré, D.B.; Nafia, I.; Nieoullon, A.; Le Goff, L.K. 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, G. R.; Ueda, N.; Hada, T.; Sackeyflo, A. C.; Yamamoto, S.; Hano, Y.; Aida, M. and Reed, J. D. (1995). Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *Journal Animal Science*. **73**:1516-1528.
- Rice-Evans, C.A. N.J.; Miller, P.G.; Bolwell, P. M.. Bramley, J. B. Pridham. (1995). *Journal Free Radicals. Research*. **22(4)** : 375-383.
- Richter, G. (1993). Les composés phénoliques métabolisme des végétaux, (physiologie et biochimie), *Edition Dunod*, 331-339.
- 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.
- Sachdev, S.; Davies, K. J. A. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*. **44**: 215–223.
- Sadik, C. D.; Sies, H. and Schewe. (2003). Inhibition of 15-lipoxygenase by flavonoids structure-activity relations and mode of action. *Biochemistry pharmacology*. **65**:773-81
- Saha, K.; Lajis, N. H.; Israf, D. A.; Hamzah, A. S.; Khozirah, S.; Khamis, S. (2004). Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **92**: 263-267.
- Sannigrahi, S .; Mazuder, U.K .; Pal, D. K .; Parida, S. and Jain, S . (2010). Antioxidant Potential of Crude Extract and Different Fractions of *Enhydra fluctuans* Lour. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **9 (1)**: 75-82
- Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Tec et Doc., Londres – Paris – New York. **P**: 398.
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V. et Bitsch, R. (2002). Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research*, **36**, 177-187.
- Sekiya, K and Okuda, H. (1982). Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochemistry Biophysic Research. Comm*. **105**: 1090-1095.
- Servais, S. (2004). Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'Ozone : effet de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. *Thèse de doctorat Université Claude Bernard-Lyon1*.
- Sevanian, A.; Nordenbrand, K.; Kim, E.; Ernester, L. and Hochstein, P. (1990). Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free radical biology and medicine*. **8**: 145-152.

- Sohal, R.S.; Mockett, R.J.; Orr, W.C. (2002). Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free radical biology and medicine*. **33**: 575-586.
- 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.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. **327**: 649-662.
- Tang, S. Z.; Kerry, J. P.; Sheehan, D. and Buckley, D. J. (2002). Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. *Food Chemistry*. **76**: 45-51.
- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. **160**: 1-40.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T. D.; Mazur, M. and Telser, J. (2007) . Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biology cellular*. **39**: 44-84.
- Velloso, J. C. R.; Barbosa, V. F.; Khalil, N. M.; Formenton, V. A. ; Ximenes, V. F. ; Fonseca, L.M. ; Furlan, M. ; Brunetti, I.L. ; Oliveira, O. M .M. F. (2006). Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. *Fitoterapia*. **77**: 243-244.
- Velloso, J. C. R.; Barbosa, V.F.; Khalil, N. M.; Aparecida, V.; Santos. F.M ; Furlan, M.; Brunetti. I. L.; Mascarenhas, M.O. and Oliveira,F. (2007). Profil of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. *Journal of Pharmaceutical Sciences* . **43**(3): 447-453.
- Vijayabaskrane, M.; Venkateswaramurthy, N.; Babu, G.; Perumal, P. and Jayakar, B. (2010). In vitro antioxidant evaluation of *Pseudarthria viscida* linn. *International Journal of current Pharmaceutical Research*. **2**(3): 21-23.
- Villano, D.; Fernandez-pachon, M, S.; Moya, M, L.; Traoncoso, A, M.; Garcia-parrilla, M, C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, **71**: 230-235.
- Visavadiya, N. P.; Soni, B. ; Dalwadi, N. (2009). Free radical scavenging and antiatherogenic activities of *Sesamum indicum* seed extracts in chemical and biological model systems; *Food and Chemical Toxicology*. **47**: 2507-2515.
- Wang, L.; Piao, X. L.; Kim, S. W.; Piao, X. S.; Shen, Y. B.; and Lee, H. S. (2009). Effects of *Forythia suspense* extract on growth performance, nutrient digestibility, and antioxidant activities in broiler chickens under high ambient temperature. *Poult science*. **87**: 1287-1294.
- Wong, C. C.; Li.; H. B.; Cheng, K. W. and Chen, F. (2004). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*. **97**: 705-711.

- Wong, S.P., Leong, L.P., William Koh, J.H. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. **99**: 775-783.
- Wu, C-R.; Hung, M-Y.; Lin, Y-T.; Ju, H-Y. and Ching, H. (2007). Antioxidant properties of cortex Fraxini and simple coumarins. *Food Chemistry*. **104**: 1464-1471.
- Yokozawa, T.; Zhong, Dong, E. and Shimizu, M. (1997). Antioxidative Activity of Flavones and Flavonols In Vintro. *Phytotherapy Research*. **11**: 446-449.
- Zelko, I. N.; Marian, T. J. and Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine*. **33**: 337-349.

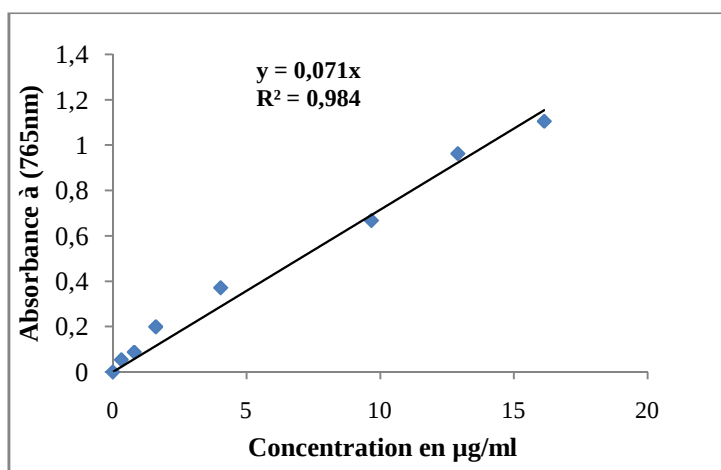


Figure 1: Coube d'etalonnage des phénols totaux réalisée avec la catéchine.

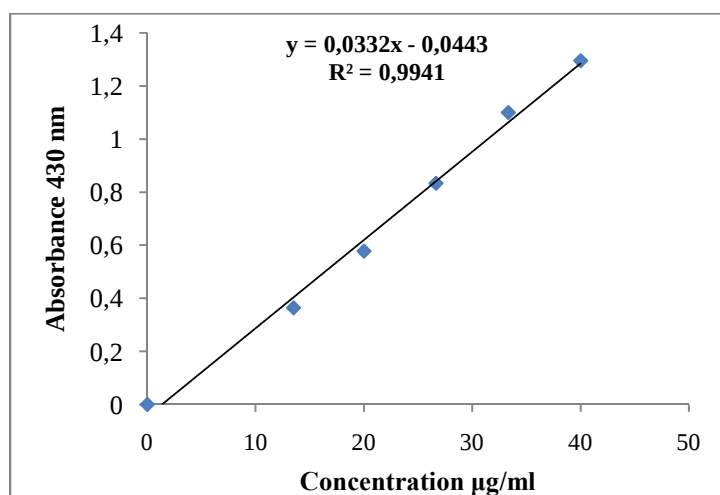


Figure 2: Courge d'étalonnage des flavonoïdes réalisée avec la rutine.

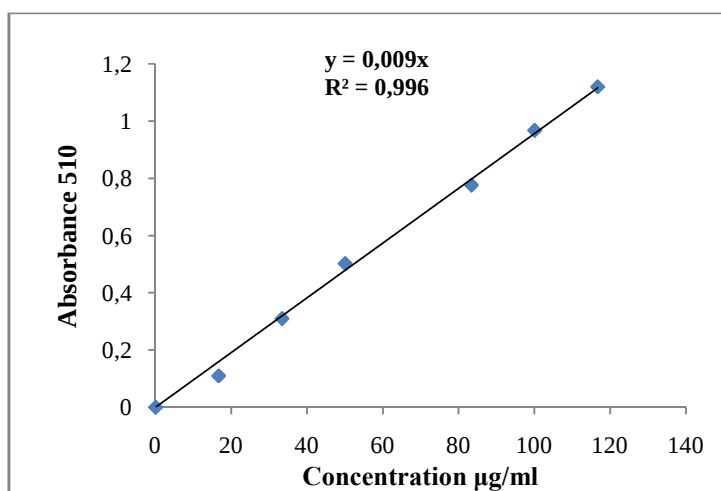


Figure 3: Courbe d'étalonnage des tanins réalisée avec l'acide tannique.

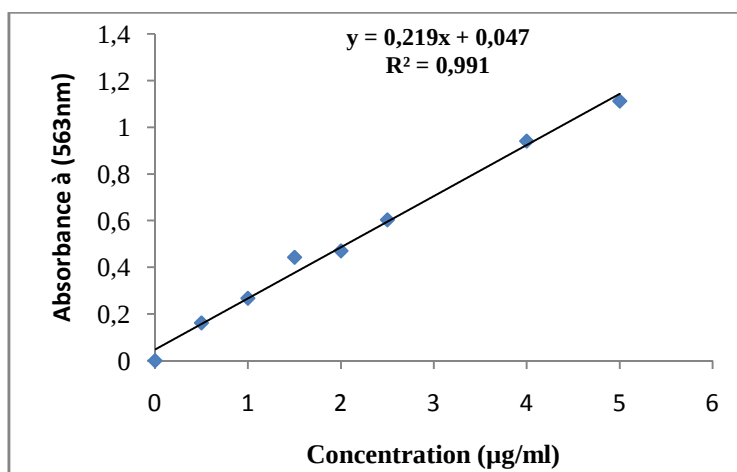


Figure 1 : Courbe d'étalonnage FRAP réalisée avec l'acide ascorbique.

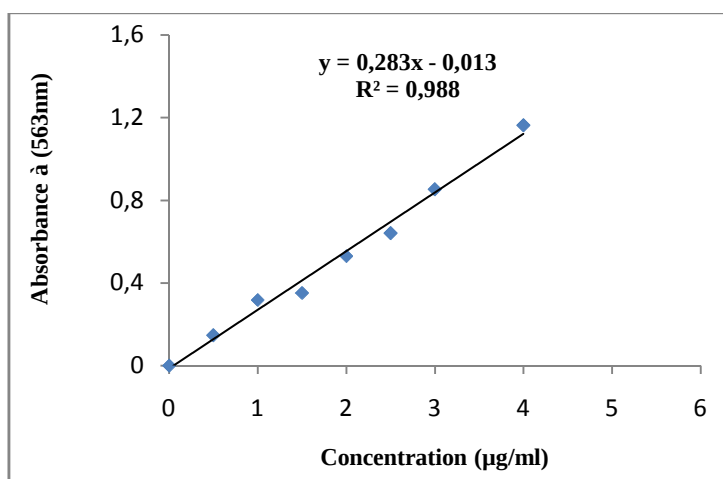


Figure 2 : Courbe d'étalonnage FRAP réalisée avec l'acide caféique.

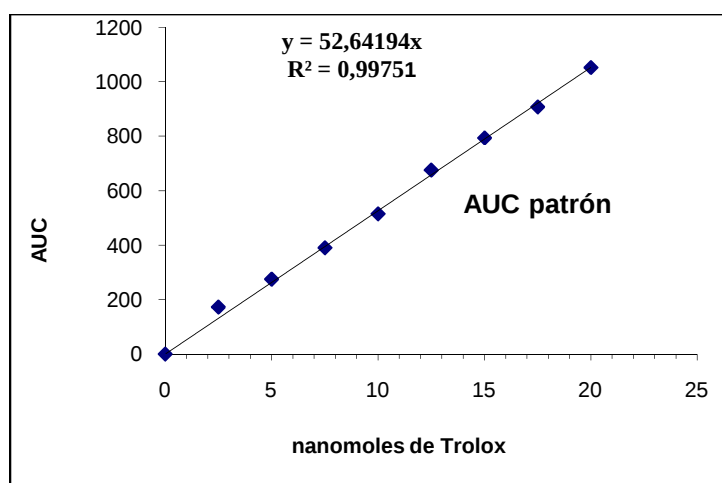


Figure 3 : Courbe d'étalonnage ABTS réalisée avec le Trolox.

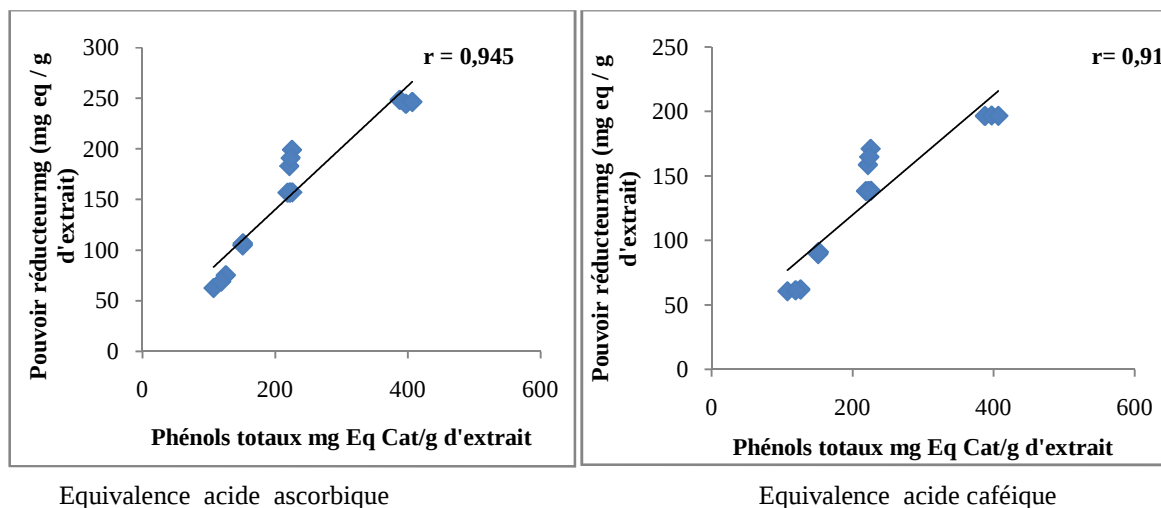


Figure 1 : Corrélations entre FRAP et phénols totaux d'écorce.

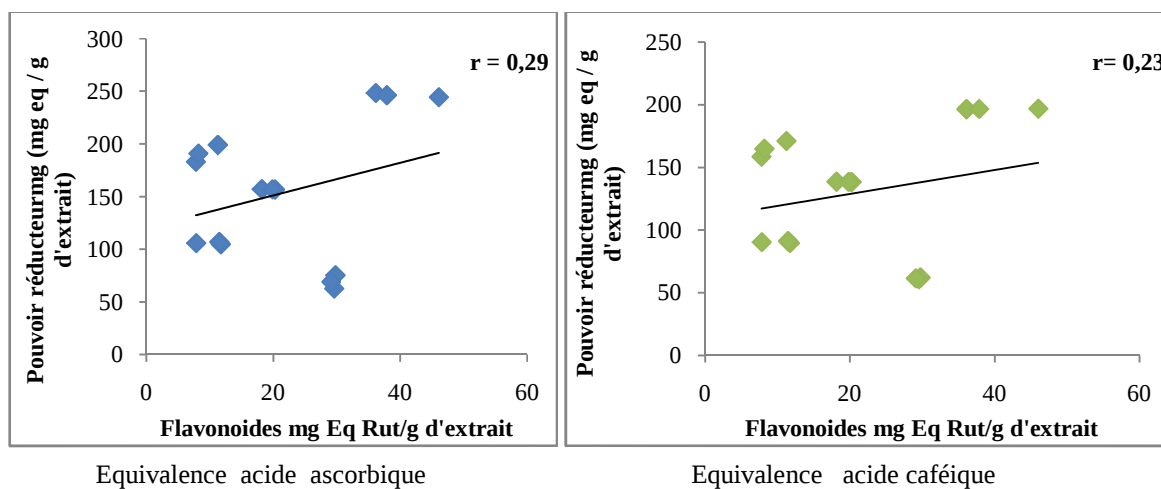


Figure 2 : Corrélations entre FRAP et flavonoides d'écorce.

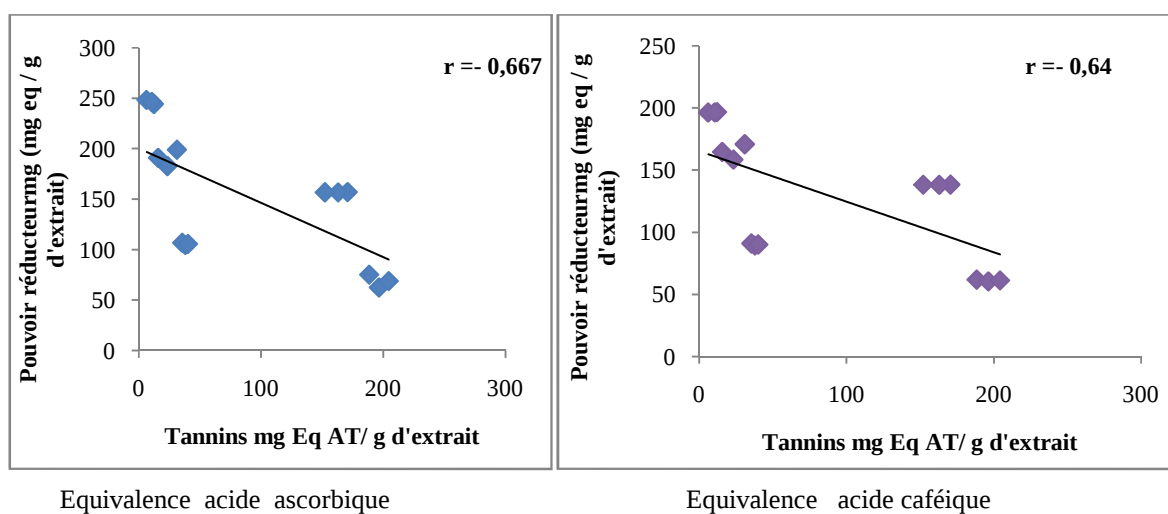


Figure 3 : Corrélations entre FRAP et tannins d'écorce.

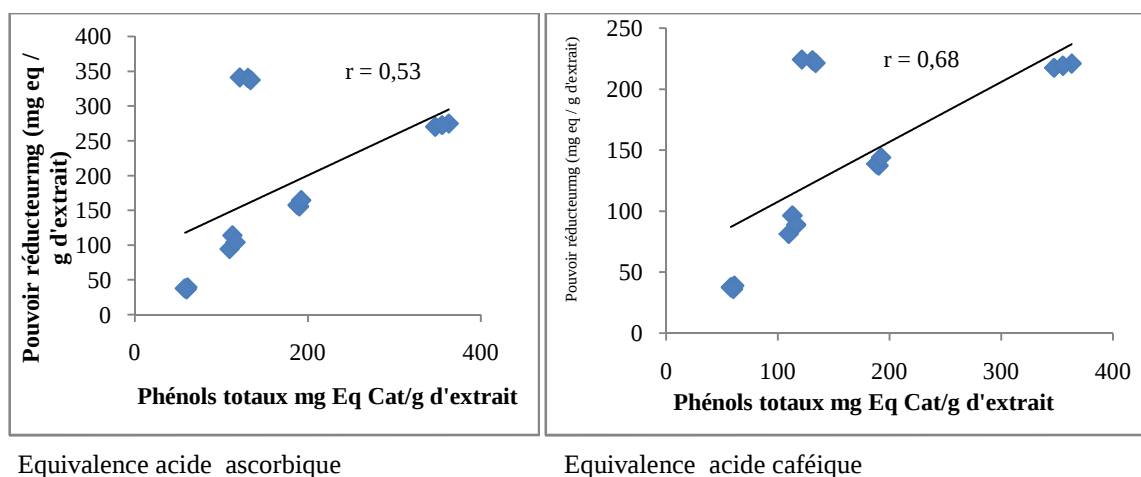


Figure 1 : Corrélations entre FRAP et phénols totaux des feuilles.

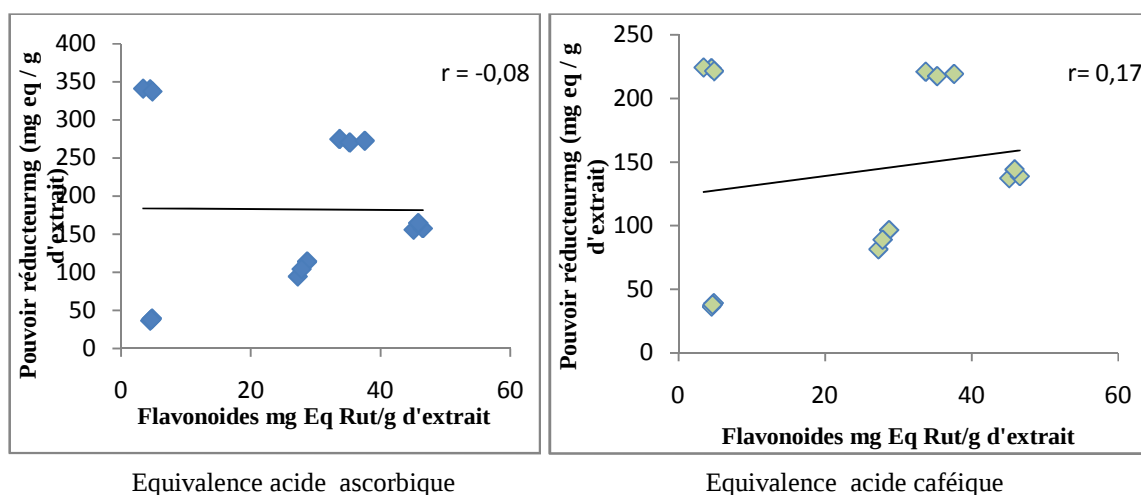


Figure 2 : Corrélations entre FRAP et flavonoïdes des feuilles.

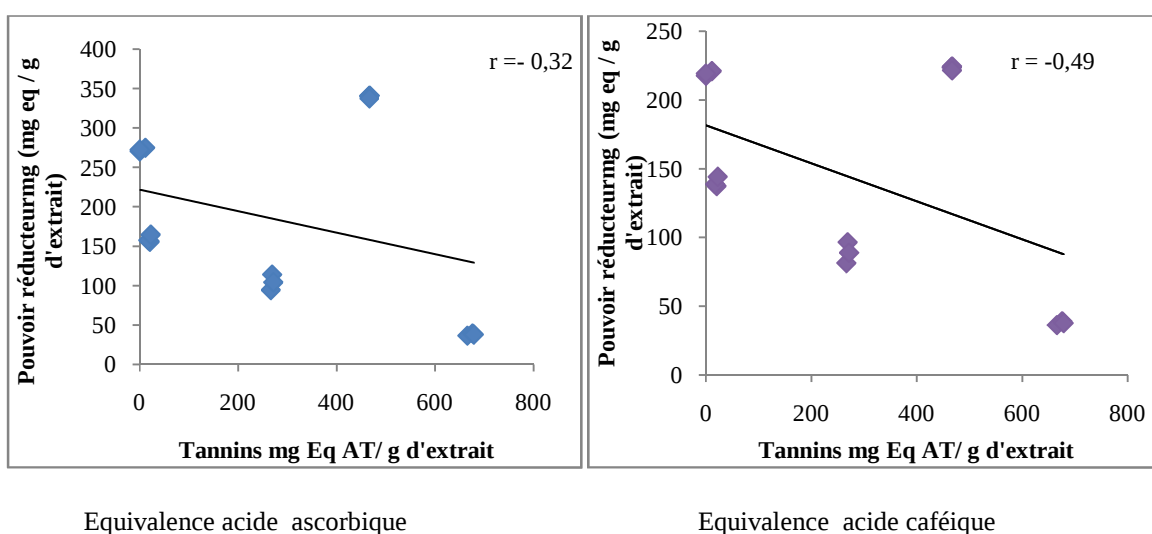


Figure 3 : Corrélations entre FRAP et tannins des feuilles.

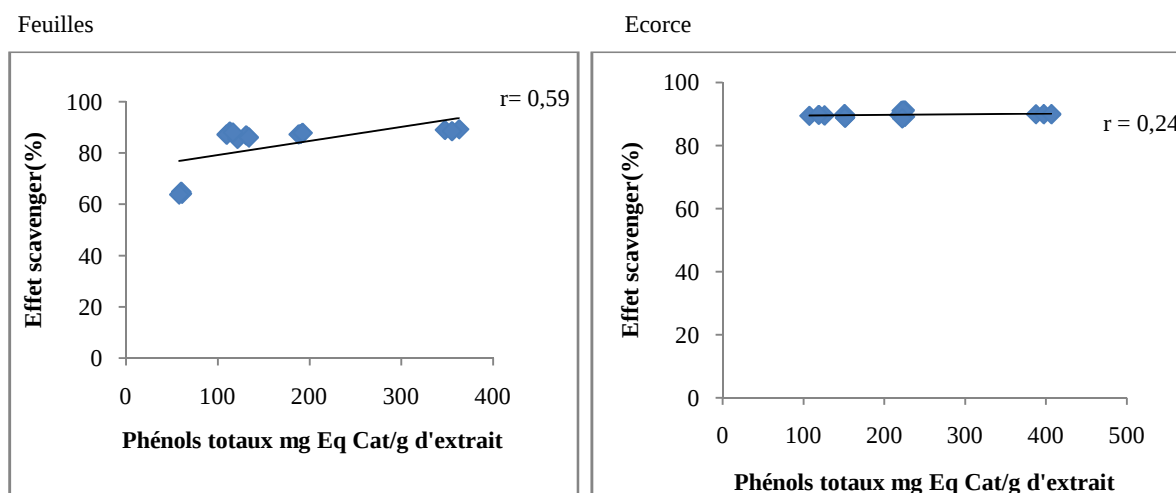


Figure 1 : Corrélations entre l'effet scavenging du radical ABTS et phénols totaux.

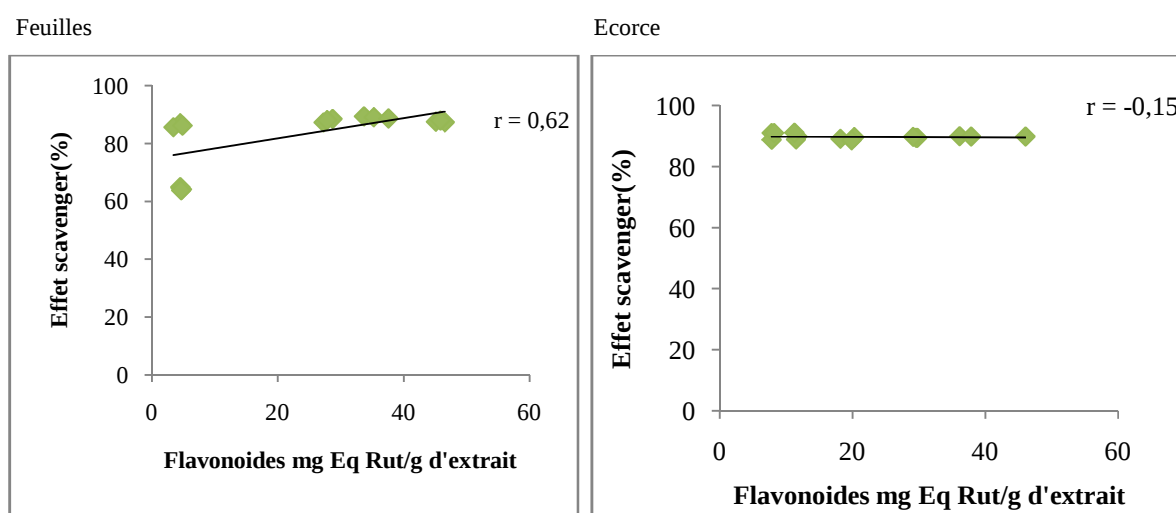


Figure 2 : Corrélations entre l'effet scavenging du radical ABTS et flavonoïdes.

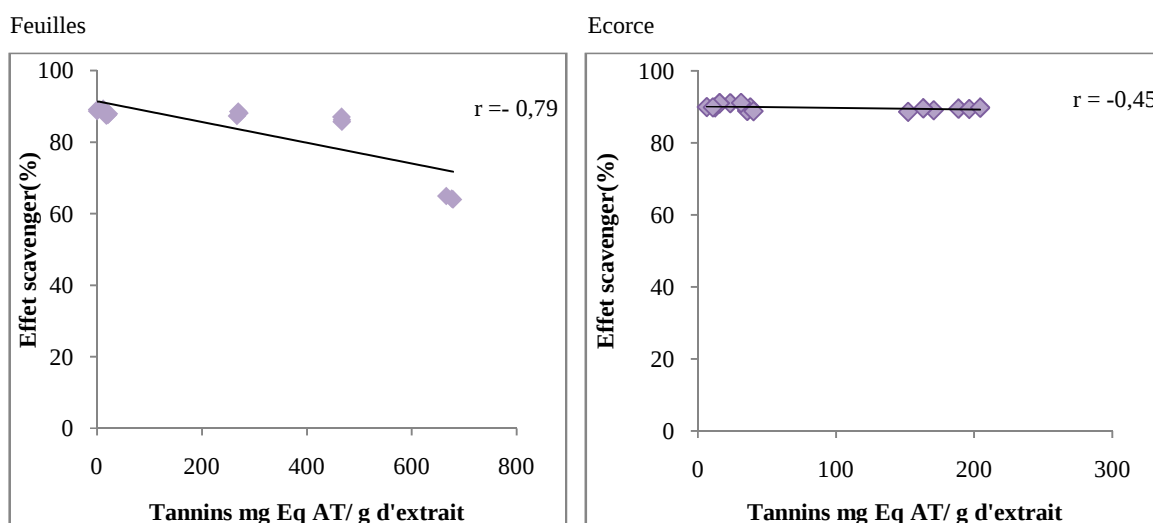


Figure 3 : Corrélations entre l'effet scavenging du radical ABTS et tannins.

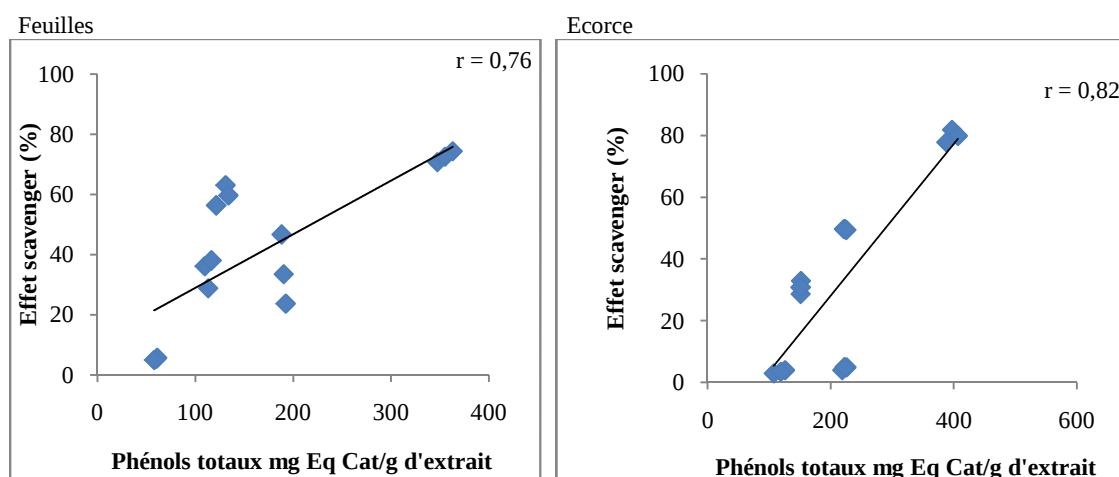


Figure 1 : Corrélations entre l'effet scavenging du radical $O_2^{\bullet-}$ et phénols totaux.

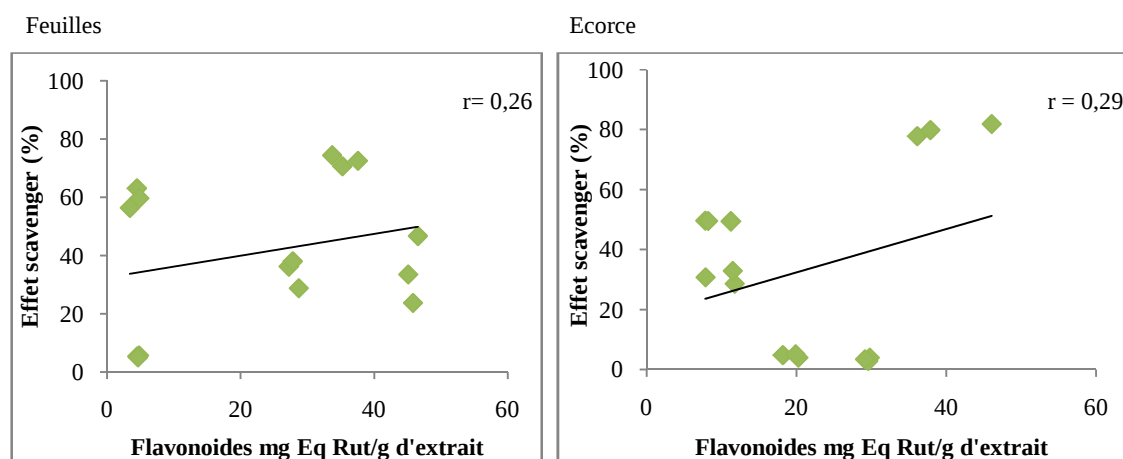


Figure 2 : Corrélations entre l'effet scavenging du radical $O_2^{\bullet-}$ et flavonoïdes.

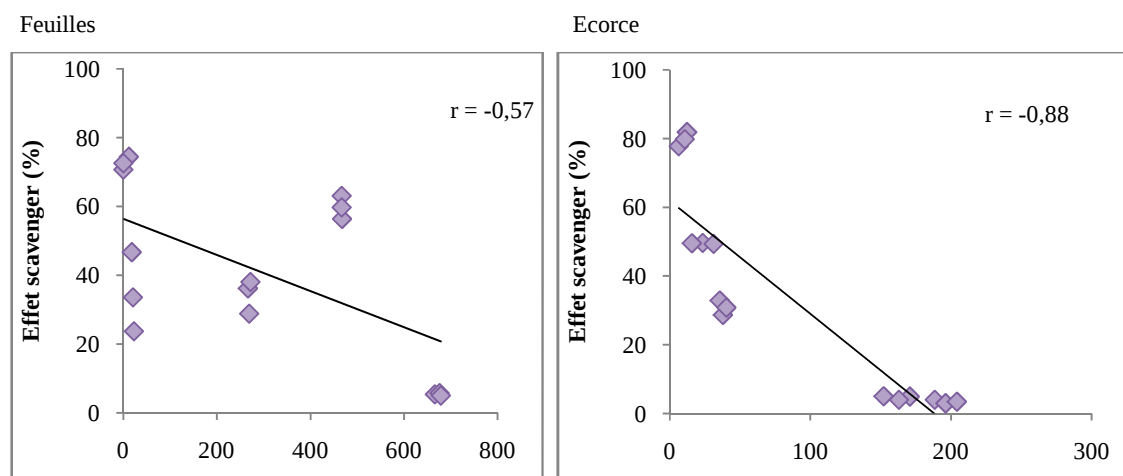


Figure 3 : Corrélations entre l'effet scavenging du radical $O_2^{\bullet-}$ et tannins.

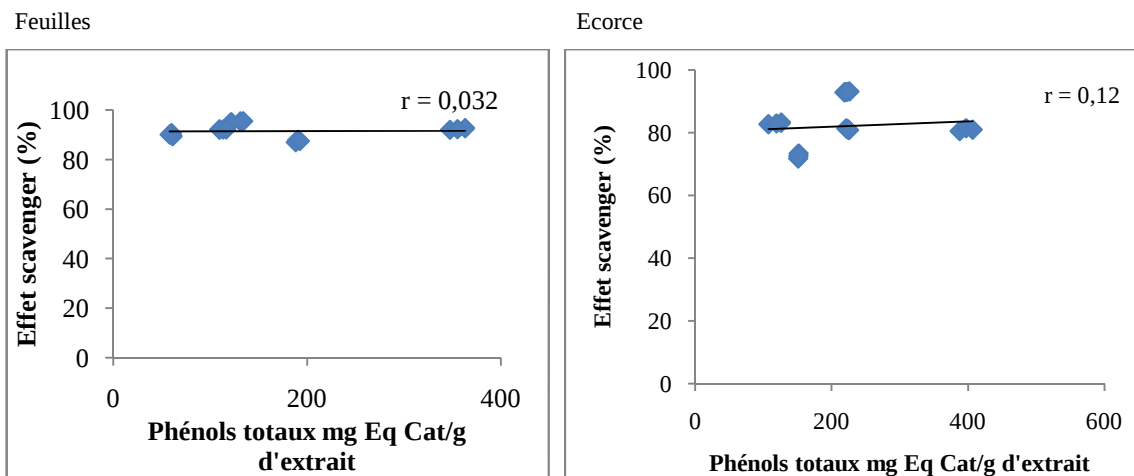


Figure 1 : Corrélations entre l'effet scavenging du radical NO $\cdot$ et phénols totaux.

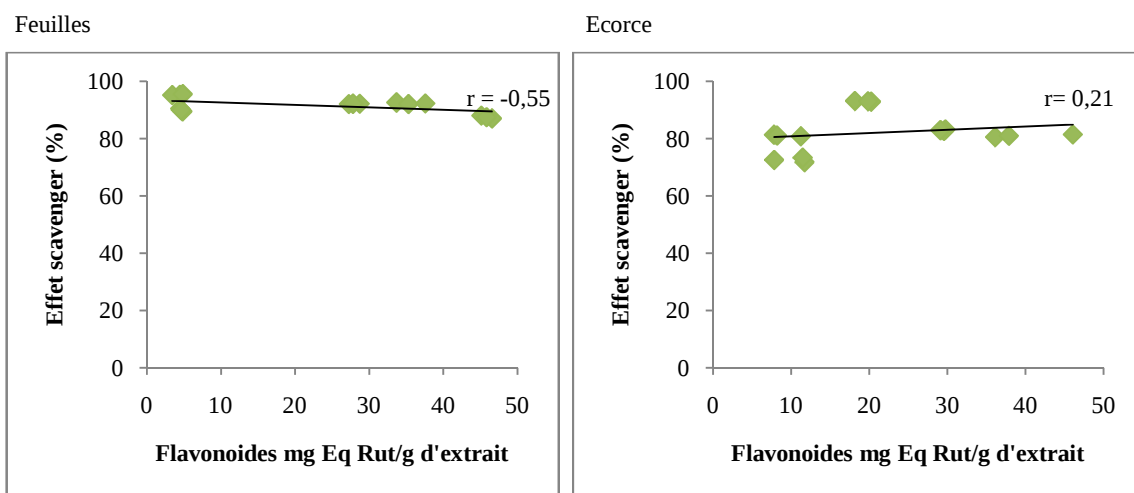


Figure 2 : Corrélations entre l'effet scavenging du radical NO $\cdot$ et flavonoïdes.

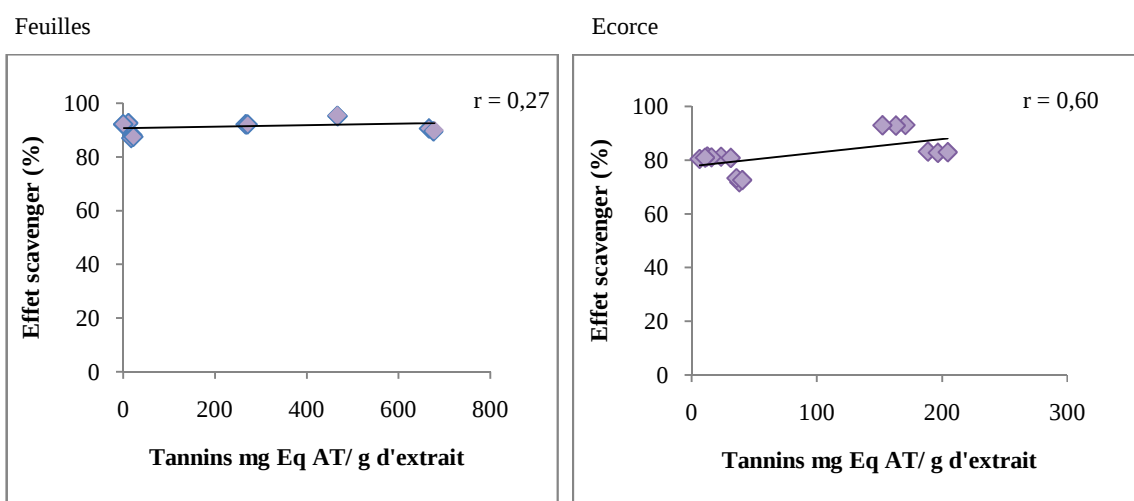


Figure 3 : Corrélations entre l'effet scavenging du radical NO $\cdot$ et tannins.

Résumé : La présente étude porte sur la composition quantitative en phénols totaux, flavonoïdes et tannins, l'évaluation de l'activité biologique *in vitro* des extraits et des fractions chromatographiques d'écorce et de feuilles de *Fraxinus angustifolia* contre les radicaux $ABTS^+$, O_2^- et $NO^•$ et le pouvoir réducteur (FRAP) ainsi que la caractérisation des fractions actives par CCM. L'extrait acétate d'éthyle des feuilles se montre très performant avec les meilleures activités réductrices (337,31 mg équivalent acide ascorbique/g d'extrait) et anti radicalaires contre le O_2^- (78,64% à 300 μ g/ml) et exprime une IC_{50} de 99,4 μ g/ml.

La meilleure capacité antioxydant équivalent trolox est obtenue par l'extrait aqueux de chloroforme avec des valeurs de 228,30 et 129,25 m mol trolox/ d'extrait pour l'écorce et les feuilles respectivement, l'effet scavenger des radicaux $ABTS^+$. Concernant le radical $NO^•$, tous les extraits montrent des pourcentages d'inhibitions supérieurs à 80% enregistrant ainsi de très faible IC_{50} s qui oscillent de 3,01 à 16,92 et de 4,07 à 12,59 μ g/ml respectivement. Les résultats de l'étude de l'activité anti oxydant des fractions récupérées à montré que l'effet réducteur et scavenging de l'anion super oxyde se concentre essentiellement au niveau de la fraction 2, la plupart des fractions montrent des pourcentages d'inhibitions >50% contre le radical $ABTS^+$ et $NO^•$. L'analyse par CCM à montré la présence probable de la rutine dans les extraits aqueux acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme d'écorce et de feuilles et leur fraction 2, également de la lutéoline dans les extraits éthanol et chloroforme de feuilles et d'écorce.

Mots clés : *Fraxinus angustifolia*, polyphénols, activité biologique, FRAP, $ABTS^+$, O_2^- , $NO^•$, CCM.

Abstract: The present study examines the quantitative composition (total phenols, flavonoids and tannins) and the evaluation of biological activity *in vitro* of extracts and chromatographic fractions of the bark and leaves of *Fraxinus angustifolia* against the $ABTS^+$, O_2^- and $NO^•$ radicals. The reducing power (FRAP) will also be assessed and the characterization by TLC of the active fractions will be carried out. The ethyl acetate extract of the leaves has shown a powerful reducing capacity with 337,31mg ascorbic acid equivalent /g of extract) and the best anti-radical activity against O_2^- with an IC_{50} of 99,4 μ g/ml.

The best trolox equivalent antioxidant capacity is obtained by the aqueous of chloroform extract of the bark and the leaves with respective values of 228,30 and 125,25m moles Trolox /g of extract expressing therefore a powerful scavenging effect against the $ABTS^+$ radical. Concerning the radical $NO^•$ all the extracts have shown percentage inhibitions higher than 80% with low IC_{50} s varying from 4,07 to 12,59 μ g/ml .On the other hand, the results of the anti-oxidant activities of fractions has shown the best reducing power and scavenging activity against superoxide anion for the second fractions while most of fractions have shown percentage inhibitions higher than 50% against the $ABTS$ and NO radicals. The TLC analysis has shown the probable presence of rutine in both the aqueous extracts obtained from chloroform and ethyl acetate extractions as well as fraction 2 of the bark and the leaves. Luteoline is also thought to be present in ethanol and chloroform extracts of both the bark and leaves.

Key words: *Fraxinus angustifolia*, polyphénols, biological activity, FRAP, $ABTS^+$, O_2^- , $NO^•$, CCM.

Résumé : La présente étude porte sur la composition quantitative en phénols totaux, flavonoïdes et tannins, l'évaluation de l'activité biologique in vitro des extraits et des fractions chromatographiques d'écorce et de feuilles de *Fraxinus angustifolia* contre les radicaux $ABTS^+$, O_2^- et $NO^\cdot$ et le pouvoir réducteur (FRAP) ainsi que la caractérisation des fractions actives par CCM. L'extrait acétate d'éthyle des feuilles se montre très performant avec les meilleures activités réductrices (337,31 mg équivalent acide ascorbique/g d'extrait) et anti radicalaires contre le O_2^- (78,64% à 300 µg/ml) et exprime une IC_{50} de 99,4µg/ml.

La meilleure capacité antioxydant équivalent trolox est obtenue par l'extrait aqueux de chloroforme avec des valeurs de 228,30 et 129,25 m mol trolox/ d'extrait pour l'écorce et les feuilles respectivement, l'effet scavenger des radicaux $ABTS^+$. Concernant le radical $NO^\cdot$, tous les extraits montrent des pourcentages d'inhibitions supérieurs à 80% enregistrant ainsi de très faible IC_{50} s qui oscillent de 3,01 à 16,92 et de 4,07 à 12,59 µg/ml respectivement. Les résultats de l'étude de l'activité anti oxydant des fractions récupérées à montré que l'effet réducteur et scavenging de l'anion super oxyde se concentre essentiellement au niveau de la fraction 2, la plupart des fractions montrent des pourcentages d'inhibitions >50% contre le radical $ABTS^+$ et $NO^\cdot$. L'analyse par CCM a montré la présence probable de la rutine dans les extraits aqueux acétate d'éthyle et aqueux de chloroforme d'écorce et de feuilles et leur fraction 2, également de la lutéoline dans les extraits éthanol et chloroforme de feuilles et d'écorce.

Mots clés : *Fraxinus angustifolia*, polyphénols, activité biologique, FRAP, $ABTS^+$, O_2^- , $NO^\cdot$, CCM.

Abstract: The present study examines the quantitative composition (total phenols, flavonoids and tannins) and the evaluation of biological activity *in vitro* of extracts and chromatographic fractions of the bark and leaves of *Fraxinus angustifolia* against the $ABTS^+$, O_2^- and $NO^\cdot$ radicals. The reducing power (FRAP) will also be assessed and the characterization by TLC of the active fractions will be carried out. The ethyl acetate extract of the leaves has shown a powerful reducing capacity with 337,31mg ascorbic acid equivalent /g of extract) and the best anti-radical activity against O_2^- with an IC_{50} of 99,4 µg/ml.

The best trolox equivalent antioxidant capacity is obtained by the aqueous of chloroform extract of the bark and the leaves with respective values of 228,30 and 125,25m moles Trolox /g of extract expressing therefore a powerful scavenging effect against the $ABTS^+$ radical. Concerning the radical $NO^\cdot$ all the extracts have shown percentage inhibitions higher than 80% with low IC_{50} s varying from 4,07 to 12,59µg/ml. On the other hand, the results of the anti-oxidant activities of fractions has shown the best reducing power and scavenging activity against superoxide anion for the second fractions while most of fractions have shown percentage inhibitions higher than 50% against the $ABTS$ and NO radicals. The TLC analysis has shown the probable presence of rutine in both the aqueous extracts obtained from chloroform and ethyl acetate extractions as well as fraction 2 of the bark and the leaves. Luteoline is also thought to be present in ethanol and chloroform extracts of both the bark and leaves.

Key words: *Fraxinus angustifolia*, polyphénols, biological activity, FRAP, $ABTS^+$, O_2^- , $NO^\cdot$, CCM.

ملخص:

ركزت هذه الدراسة على التكوين الكمي للفينول، التانان مع تقييم النشاط البيولوجي لمستخلصات لحاء و أوراق الدردار ضد الجذور الحرة ($ABTS^+$, O_2^- , $NO^\cdot$) والقدرة الإرجاعية (Frap) مع إستعمال الكروماتوغرافيا لفصل هذه المستخلصات.

المستخلص الايثيلي للأوراق يبين اكبر قدرة ارجاعية ما يعادل (337.31مغ من حمض الاسكوربيك لكل غرام من المستخلص) واطهر نشاطا فعالا ضد O_2^- بمعدل 78.64 عند 300مغ/مل) بحيث قدرة IC_{50} ب 99.4ميكروغرام للميليلتر.

أحسن قدرة ضد الأكسدة اضهرها مستخلص الكلورفورم المائي للحاء بقيمة 228.30 و الاوراق بقيمة 129.25 ميلي مول ترولوكس مقارنة مع غرام من المستخلص.

نتائج دراسة فصل المستخلصات الفعالة بالكروماتوغرافيا يضرنا ان احسن قدرة ارجاعية و احسن قدرة مؤكسدة ضد الجذر ($O_2^\cdot$) تتركز عموما في الجزيء ج₂ (F_2). أغلبية الجزيئات اضهرت قدرة على التثبيط اكبر من 50 بالمئة ضد الجذور $ABTS^+$ و $NO^\cdot$.

استعمال CCM سمح انا بالاستنتاج احتمال احتواء مستخلص الايثيل المائي الكلورفورم المائي و الجزيء ج₂ (F_2) للحاء و الاوراق على الروتين.

مستخلص الايثانول و الكلورفورم لنفس الاجزاء يحتويان كذلك على اللوتولين.