

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

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



Réf :

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

MASTER

Thème

**Effet préventif de pathologies hémolytiques
liées au stress oxydatif des extraits de
samars de *Fraxinus angustifolia***

Présenté par : **BENACHOUR Souhila & BOUGHIDA Ryma**

Soutenu en : **Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M ^{me} BEDJOU F.	Professeur	Président
M ^{elle} AYOUNI K.	MAA	Encadreur
M ^r LESLOUS M.	D ^r , CTWS	Co- Encadreur
M ^{me} BOUGOFFA-SAADAOUI K.	MCB	Examinatrice

Année universitaire 2016-2017

REMERCIEMENTS

On tient en premier lieu à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir procuré la santé et la volonté d'entamer et de mener ce mémoire jusqu'à sa fin.

Nous adressons nos profondes reconnaissances et nos chaleureux remerciements à notre promotrice M^{elle} AYOUNI Karima pour son encouragement, ses conseils et toute la confiance qu'elle nous a témoignée et pour nous avoir accompagnés tout au long de notre projet.

Nos vifs remerciements vont aussi aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs propositions. Celui ci est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

On remercie aussi tous le personnel des laboratoires de Biochimie Appliquée, Biologie Physico-Chimique, Biologie des Sols, Techniques d'Analyses Biologiques et Biologie Moléculaire de l'université de Bejaia, pour nous avoir ouvert les portes et fait en sorte de mettre à notre disposition l'ensemble des moyens et produits souhaités. Votre gentillesse mérite toute admiration. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer tout notre respect.

Nos sincères remerciements vont également à tous l'effectif du centre de transfusion sanguine de Bejaia CWIS qui ont contribué au succès de notre stage à leur tête le D^r Leslous Mourad. Nous avons eu le privilège de travailler parmi vous et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Vos conseils, votre sérieux, vos compétences et votre sens du devoir nous ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération.

Au final, nous tenons à remercier tout nos enseignants pour leur soutien fort remarqué durant ce cursus ainsi que toute personne ayant contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

A mon exemple éternel et mon soutien moral, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, mon Père

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur, ma Mère

Vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon cher frère Sofiane, le seul et l'unique, mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie. Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'amour que je porte pour toi. Je te souhaite un avenir plein de réussite et de sérénité.

Aux personnes dont j'ai bien aimé leur présence continue, mes aimables cousins et cousines. En témoignage de l'attachement que je vous porte.

A tous les membres de ma famille, petits et grands. Veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

A mes amis particulièrement Farah, Celia et Hakim pour leur présence continue à mes côtés, leur bons conseils, leur sens de l'humour et leur manière de me remonter le moral.

A mon binôme Ryma, celle qui m'a accompagné dans la réalisation de ce travail dans sa globalité avec ses hauts et ses bas. Tu es formidable.

Aux filles qui m'ont accompagné durant ce parcours, mes aimables collègues. En témoignage des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble. Je vous souhaite une bonne continuation : Malika, Nouna, Meriem et Houda.

A ceux pour qui le cœur bat qu'il soit proche ou loin, ceux qui restent Présents même dans leur absence.

Souhila

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A tous ceux durant cette période se sont trouvés à mes cotés pour
m'encourager*

*A mes très chers parents pour leurs sacrifices, qui m'ont soutenus tous
au long de mon parcours, aucune dédicace ne saurait exprimer
l'affection et l'amour que j'éprouve envers vous.*

A ma très chère sœur Meriem; à qui je souhaite une heureuse vie.

A mon très cher frère Aïmed; que Dieu t'ouvre les portes de la réussite.

*A mon cher oncle Ahmed; que votre repos soit une paix éternelle et que
Dieu t'accueille dans son vaste paradis.*

A mes grands parents;

A toute ma famille ;

A mes chers amis Abdeslem et Dina ;

A mon binôme Souhila ;

*Sans oublier mes camarades de la promotion : Malika, Nouna, Meriem
et Houda, ainsi que tous ceux qui me connaissent, chacun avec son
propre nom*

Que Dieu vous garde.

Ryma

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Glossaire

Introduction 01

I. Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur les érythrocytes 02

I.2. Espèces réactives de l'oxygène (EROs)..... 03

I.2.1. Origine des EROs 03

I.2.1.1. Sources exogènes 03

I.2.1.2. Sources endogènes 04

I.2.2. Rôles des EROs 04

I.3. Stress oxydatif 04

I.4. Hémolysse oxydative 05

I.4.1. Effets des EROs sur la membrane des hématies 05

I.4.1.1. Oxydation des lipides (lipoperoxydation) 05

I.4.1.2. Oxydation des protéines 07

I.4.2. Conséquences de l'atteinte érythrocytaire 07

I.5. Systèmes de défense contre le stress oxydatif..... 08

I.5.1. Antioxydants endogènes 08

I.5.2. Antioxydant exogènes 09

I.6. Rôle des composés phénoliques dans la prévention de l'hémolysse oxydative 10

I.6.1. *Fraxinus angustifolia* 12

I.6.2. Composés phénoliques retrouvés dans *F.angustifolia* 13

I.6.3. Propriétés thérapeutiques de *F.angustifolia* 14

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel 15

II.1.1. Equipement et verreries 15

II.1.2. Produits chimiques 15

II.1.3. Echantillons biologiques 15

II.1.3.1. Matériel végétal 15

II.1.3.2. Echantillons sanguins humains 16

II.2. Méthodes	16
II.2.1. Préparation des extraits à partir des samares de <i>F.angustifolia</i>	16
II.2.2. Dosages des contenus phénoliques des extraits éthanoliques et aqueux de samares de <i>F.angustifolia</i>	17
II.2.2.1. Dosage des phénols totaux	17
II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes	18
II.2.2.3. Dosage des tanins	18
II.2.3. Etude du pouvoir hémolytique du peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations et estimation de la peroxydation lipidique par le dosage de MDA	19
II.2.4. Etude de la cytotoxicité probable de différentes concentrations des extraits éthanolique et aqueux de samares de <i>F.angustifolia</i> sur les érythrocytes humains	20
II.2.5. Evaluation des effets anti-hémolytiques des extraits éthanolique et aqueux de samares de <i>F.angustifolia</i> à différentes concentrations	20
II.2.6. Analyse statistique	21

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats et interprétations	22
III.1.1. Taux d'extraction	22
III.1.2. Dosages des contenus phénoliques des extraits éthanoliques et aqueux de samares de <i>F.angustifolia</i> :	22
III.1.3. Etude du pouvoir hémolytique du peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations et estimation de la peroxydation lipidique par le dosage de MDA	23
III.1.4. Etude de la cytotoxicité probable de différentes concentrations des extraits éthanolique et aqueux de samares de <i>F.angustifolia</i> sur les érythrocytes humains	25
III.1.5 Evaluation des effets anti-hémolytiques des extraits éthanolique et aqueux de samares de <i>F.angustifolia</i>	27
III.2. Discussion	30
Conclusion et perspectives	36

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

Liste des abréviations

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AGPI** : Acides gras polyinsaturés
- ANOVA**: Analyse de la variance
- BPCO** : Broncho pneumopathie chronique obstructive
- BSA** : Albumine de sérum bovin
- CWTS** : Centre de transfusion sanguine de wilaya
- E.D.** : Eau distillée
- Eq.A.G.** : Equivalent acide gallique
- Eq.A.T.** : Equivalent acide tannique
- Eq.Rut.** : Equivalent rutine
- EROs** : Espèces réactives de l'oxygène
- Ext.** : Extrait
- F.C.** : Folin Ciocalteu
- GPx** : Glutathion peroxydase
- GR** : Globule rouge
- GR-H** : Globule rouge humain
- H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène
- IC₅₀** : Concentration inhibitrice à 50%
- IDM** : Infarctus de myocarde
- MDA** : Malonyldialdéhyde
- NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- OH** : Groupement hydroxyle.
- SDS/ TEA** : Sulfate dodecyl sodium/Triéthanolamine
- S.E.** : Suspension érythrocytaire
- S.E.M.** : Standard Error Mean
- SH** : Groupement thiol
- SOD** : Superoxyde dismutase
- T** : Témoin
- TBA** : Acide thiobarbiturique
- TBARS** : Substances réactives avec l'acide thiobarbiturique
- Vit.** : Vitamine

Liste des figures

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Peroxydation des acides gras insaturés.	06
02	Photographie originale de l'arbre de <i>F.angustifolia</i> .	12
03	Piégeage des EROs (R') par les flavonoïdes.	14
04	Photographie originale de samares de <i>F.angustifolia</i> .	15
05	Photographie originale de la poudre de samares de <i>F.angustifolia</i> .	16
06	Protocole de dosage des tanins.	18
07	Protocole d'analyse du pouvoir hémolytique de l'H ₂ O ₂ et formation de MDA.	19
08	Procédure expérimentale d'évaluation de l'effet anti-hémolytique des extraits de samares de <i>F.angustifolia</i> .	21
09	Taux de l'hémolyse induite par différentes concentrations de H ₂ O ₂ comparés au T: ED.	23
10	Evaluation des taux de MDA formés à différentes concentrations de H ₂ O ₂ comparés au T: ED.	24
11	Taux de l'hémolyse induite par différentes concentrations des deux extraits de samares de <i>F.angustifolia</i> .	25
12	Evaluation des taux de MDA issus des traitements à différentes concentrations des extraits de samares de <i>F.angustifolia</i> .	26
13	Taux de l'hémolyse induite par H ₂ O ₂ en présence des extraits de samares de <i>F.angustifolia</i> à différentes concentrations	27
14	Evaluation des taux de MDA formés par H ₂ O ₂ en présence de différentes concentrations des extraits de samares de <i>F.angustifolia</i> .	28

liste des tableaux

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Types d'espèces réactives oxygénées.	03
II	Pathologies induites par le stress oxydatif.	05
III	Médicaments antioxydants.	09
IV	Quelques exemples d'antioxydants exogènes.	10
V	Plantes et polyphénols purs utilisés dans des études en vue de l'exploration de leur effet protecteur contre la lyse érythrocytaire oxydative.	11
VI	Composés phénoliques retrouvés chez l'espèce <i>F.angustifolia</i> .	13
VII	Teneurs phénoliques des deux extraits de samares de <i>F.angustifolia</i> .	22
VIII	Pourcentages d'inhibition de l'hémolyse des extraits aqueux et éthanolique de samares de <i>F.angustifolia</i> à différentes concentrations.	27
IX	Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique par différentes concentrations des extraits aqueux et éthanolique de samares de <i>F.angustifolia</i> .	29

Glossaire

Glossaire

Actine : Protéine présente dans le globule rouge sous forme de protofilaments constitués d'un nombre limité de molécules d'actine monomère. Elle a un rôle important dans la cohésion du cytosquelette ou elle est associée à la spectrine et la protéine 4.1.

Acide urique : C'est une forme de déchet normalement éliminé par l'organisme. Il provient de la dégradation de cellules mortes mais également de la digestion de certains aliments. Il est généralement peu présent dans le sang. A un pH physiologique, il est majoritairement ionisé sous forme d'urate, c'est un piègeur puissant de radicaux (OH•, ROO•, NOO•...).

Acide gras polyinsaturé : C'est un acide gras qui comporte une ou plusieurs doubles liaisons entre les carbones.

Albumine : C'est la principale protéine circulant dans le sang. Elle est fabriquée par le foie et assure le transport de nombreuses substances.

Ankyrine : Protéine qui assure la jonction entre le squelette membranaire et le reste de la membrane érythrocytaire à travers la protéine 3.

Athérosclérose : C'est une forme de dégénérescence des artères. Elle se manifeste par la formation de plaques d'athérome dans la couche interne des artères par accumulation de divers éléments comme la graisse essentiellement représentée par le cholestérol, le calcium et les déchets des cellules.

Bilirubine : C'est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Elle est éliminée par le foie, elle donne sa couleur jaunâtre à la bile.

Cataracte : Opacité du cristallin, se traduisant par une diminution de l'acuité visuelle.

Ceruloplasmine : Protéine plasmatique type glycoprotéine, combinée au cuivre et qui assure le transport de ce dernier.

Chélateur : C'est un corps qui possède la capacité de fixer des cations métalliques en constituant un complexe stable non ionisé, non toxique et facilement éliminé par le rein.

Cyclo-oxygenase : Enzyme appelée aussi prostaglandine-endoperoxyde synthase (PTGS), c'est une oxydoréductase qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines H2.

Cytochrome P450 : Enzyme du réticulum endoplasmique lisse, elle intervient dans des réactions d'oxydoréduction d'un grand nombre de grandes ou de petites molécules, qu'il s'agisse de métabolites ou de xénobiotiques. Sa fonction est de réduire le dioxygène dans les molécules organiques.

Echinocyte : C'est un globule rouge déformé se présentant sous une forme épineuse et s'observant essentiellement au cours de certaines pathologies hématologiques.

Ferritine : Protéine contenant du fer, dont elle constitue la forme de réserve de l'organisme (dans la rate, le foie, la moelle osseuse).

Haptoglobines : Protéine présente dans le sang et capable de se combiner avec l'hémoglobine. Son taux augmente lors des agressions subies par l'organisme.

Homéostasie cellulaire : Processus physiologique, permettant de maintenir certaines constantes du milieu intérieur de l'organisme (ensemble des liquides de l'organisme), nécessaires à son bon fonctionnement entre les limites des valeurs normales quelles que soient les contraintes externes.

Malonyldialdéhyde : Appelé aussi aldéhyde malonique, il est présent naturellement dans les tissus, où il y'a une manifestation du stress oxydant. Il est issu notamment de l'action des dérivés réactifs de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés.

Méthémoglobinémie : C'est un produit d'oxydation de l'hémoglobine dans lequel le fer, qui est passé de l'état ferreux à l'état ferrique, a perdu son pouvoir de fixer l'oxygène.

NADPH oxydase : C'est une enzyme présente au niveau de la membrane plasmique. Elle intervient dans plusieurs processus cellulaires du corps humain. Elle fait partie de la classe des oxydoréductases, elle catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par l'oxygène (O_2), ce qui produit du $NADP^+$, du H^+ et de O_2^- . Ce complexe enzymatique permet donc la synthèse des ERO.

Protéine 3 : C'est une des protéines les plus représentées de la membrane érythrocytaire, cette protéine de grande taille serpente à travers la membrane en la franchissant plus de dix fois. Elle représente un point d'ancrage au cytosquelette membranaire et participe à l'architecture membranaire, elle assure le transport d'anions chlorures et bicarbonates.

Spectrine : Protéine principale constitutive du squelette membranaire érythrocytaire. Il s'agit d'une grosse molécule formée de deux chaînes polypeptidiques α et β enroulées l'une sur l'autre.

Transduction de signal : Mécanisme par lequel une cellule répond à l'information qu'elle reçoit, par des agents chimiques ou autres signaux.

Transferrine : Protéine type Béta-globuline, présente dans le plasma sanguin et capable de fixer réversiblement le fer et de le transporter au niveau de l'organisme. Elle exerce un rôle modulateur et réajuste la quantité de fer circulant, en fonction des besoins.

Xanthine oxydase : C'est une oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ainsi que l'oxydation de la xanthine en acide urique.

Xénobiotiques : Substances chimiques étrangères à l'organisme vivant, polluantes et parfois toxiques.

Introduction

L'oxygène par ses propriétés fondamentales constitue un élément primordial pour l'organisme (Tessier et Marconnet, 1994). Etant transporté par les hématies vers l'ensemble des cellules et tissus (Choquet, 2007), celui-ci peut présenter des effets néfastes et menaces permanentes sur ces cellules par la surproduction d'espèces chimiques réactives (Tessier et Marconnet, 1994).

Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) produites physiologiquement par l'organisme humain ont un rôle dans l'homéostasie vasculaire et la signalisation cellulaire. Toutefois, cette production devient dévastatrice si elle est prolongée et insurmontable, dépassant ainsi la capacité de neutralisation de l'organisme ou de la cellule aboutissant à un « stress oxydatif » (Berger, 2006).

Le stress oxydatif par les dommages qu'il génère, entraîne plusieurs anomalies locales ou générales (Favier, 2006). Au sein des hématies, il est à l'origine de la lipoperoxydation membranaire menant à l'hémolyse (Portier *et al.*, 2007). Pour faire face à ces agressions, l'érythrocyte ainsi que l'organisme disposent de systèmes de défense antioxydante enzymatiques et non enzymatiques, mais parfois ceux-ci ne sont pas suffisants pour empêcher les lésions au niveau cellulaire, voire tissulaire (Mohanty *et al.*, 2014).

La maîtrise de ce stress par un traitement antioxydant fait partie de la stratégie thérapeutique. L'apport exogène d'antioxydants de synthèse a un bénéfice pour les sujets en agression (Zazzo, 2002). Cependant, ces molécules peuvent entraîner la suppression de la production basale de radicaux libres d'où l'apparition d'effets indésirables, ce qui incite à explorer l'effet des antioxydants naturels dans les maladies consécutives au stress oxydatif (Favier, 2006).

Les plantes représentent un immense réservoir de composés d'une diversité chimique notamment les polyphénols, possédant plusieurs propriétés y compris antioxydante et anti-hémolytique (Haddouchi *et al.*, 2016). Leur usage prend de plus en plus d'ampleur en thérapeutique et en recherche biologique vue leur effets préventifs des dommages oxydatifs cellulaires (Amiot, 2009).

Cette étude propose donc d'évaluer le potentiel antioxydant en évaluant l'effet anti-hémolytique, *in vitro*, sur des cellules érythrocytaires humaines induites par l'agent oxydant, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), des extraits de samares de *Fraxinus angustifolia*, une plante médicinale locale, afin de déterminer son effet dans la prévention des pathologies hémolytiques liées au stress oxydatif.

I. Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur les érythrocytes

L'érythrocyte, appelé aussi hématie ou globule rouge (GR), est une cellule sanguine mature anucléée, très abondante dans le plasma. C'est la seule cellule du corps à avoir la forme de disque biconcave, elle ne contient ni mitochondrie, ni organite intracellulaire. Sa taille et sa forme sont très homogènes avec une capacité à se déformer et s'étirer (Manuelle, 2008). Il est composé d'un cytoplasme et d'une membrane très complexe, assurant les échanges d'eau, d'ions minéraux (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) et de glucose, qui proviennent du plasma mais aussi composé essentiellement d'hémoglobine et d'enzymes érythrocytaires (Fauchet et Ifrah, 1995).

L'hémoglobine est une protéine formée de globines avec 4 groupements hèmes, contenant chacun un atome de fer ferreux qui peut fixer des molécules d'oxygène (O_2), procurant ainsi au GR le rôle de transporteur d' O_2 et de CO_2 entre les alvéoles pulmonaires et les tissus (Choquet, 2007).

La membrane érythrocytaire est indispensable pour l'intégrité cellulaire et le transport de l' O_2 . Elle a une action mécanique de protection et assure la régulation du milieu intérieure par transport membranaire contrôlé (Portier et al., 2007). Elle est composée d'une membrane cytoplasmique et d'un cytosquelette membranaire (Wajcman et al., 1992).

La membrane cytoplasmique est constituée d'une bicouche lipidique responsable de la fluidité (Portier et al., 2007) et dans laquelle s'entremettent des glycoprotéines portant les antigènes du groupe sanguin ainsi que des récepteurs membranaires et les protéines transporteuses d'ions. Cette membrane assure les échanges entre le plasma et le cytoplasme du GR, y compris des cations, des anions, des sucres et des acides aminés, soit par diffusion simple ou par transport actif (Fauchet et Ifrah, 1995).

Le cytosquelette érythrocytaire est composé de deux chaînes polypeptidiques de spectrine reliées entre elles par l'actine créant ainsi un réseau avec d'autres protéines telles que l'ankyrine accrochée à la protéine 3 transmembranaire (Wajcman et al., 1992). Ce réseau souple et solide, plaqué contre la face interne de la membrane cytoplasmique assure au GR ses propriétés mécaniques (Fauchet et Ifrah, 1995), tel que le maintien de la forme biconcave, indispensable à la survie de la cellule ainsi que sa déformabilité, afin de pouvoir circuler dans les petits capillaires (Wajcman et al., 1992).

Les globules rouges vieillissent sont détruits par érythrolyse dite « hémolyse physiologique » (Manuelle, 2008). Ils peuvent aussi subir une hémolyse suite à des anomalies

de la membrane érythrocytaire, de l'hémoglobine ou suite à une agression directe de l'hématie par une toxine ou radicaux libres (Giro et Bornes, 2014).

I.2. Espèces réactives de l'oxygène (EROs)

Les EROs sont des espèces chimiques dérivant du dioxygène (O_2) par réduction (Gardes, 2006). Elles représentent la classe la plus importante d'espèces réactives générées par l'organisme vivant, dans n'importe quel type cellulaire en conditions normales ou pathologiques (Valko *et al.*, 2007). Elles comprennent les radicaux libres de l'oxygène et les dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dotés d'une toxicité remarquable (Fontaine *et al.*, 2002), illustrés dans le tableau suivant :

Tableau I : Types d'espèces réactives oxygénées.
(Fontaine *et al.*, 2002 ; Berger, 2006 ; Durand *et al.*, 2013).

Espèces radicalaires libres	Espèces non radicalaires
Radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$);	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2);
Hydroxyle (OH^{\cdot});	Peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$);
Perhydroxyle (HO_2^{\cdot});	Oxygène singulier (1O_2).
Peroxyde (ROO^{\cdot});	
Alkoxyde (RO^{\cdot});	
Monoxyde d'azote (NO^{\cdot}).	

Un radical libre est une espèce chimique moléculaire ou atomique présentant un ou plusieurs électrons célibataires sur son orbital externe, d'où son instabilité et sa forte réactivité (Goudable et Favier, 1997). Cette instabilité est temporaire vue qu'elle est comblée par addition d'un autre électron ou par transfert de l'électron libre vers une autre molécule, la rendant aussi réactive vis-à-vis de l'oxygène aboutissant à des phénomènes d'oxydation en chaîne (Fontaine *et al.*, 2002), ainsi qu'à des dommages oxydatifs des différentes composantes cellulaires (lipides, protéines et acides nucléiques) (Belaich et Boujraf, 2016).

I.2.1. Origine des EROs

I.2.1.1. Sources exogènes

Les EROs principalement celles radicalaires, peuvent être produites directement suite à l'exposition aux radiations ionisantes (Fontaine *et al.*, 2002), ou en cas d'effort physique, d'exposition aux toxiques environnementaux (fumé, tabac, polluants et xenobiotiques) et ce par activation de systèmes enzymatiques endogènes (Durand *et al.*, 2013).

I.2.1.2. Sources endogènes

Les EROs peuvent provenir d'une réduction incomplète de l'O₂ dans la mitochondrie (Durand *et al.*, 2013). Plusieurs cellules et tissus produisent les EROs y compris les cellules endothéliales vasculaires, les cellules musculaires lisses et ce par l'intermédiaire de leur enzymes cellulaires (Beaudeau *et al.*, 2006). Parmi ces enzymes : la NADPH oxydase membranaire, la xanthine oxydase, la cyclo-oxygénase et l'enzyme du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) (Durand *et al.*, 2013). Les EROs générées (principalement O₂⁻ et H₂O₂) se transforment généralement en une autre forme très réactive ([•]OH) surtout en présence de métaux de transition (fer et cuivre) (Beaudeau *et al.*, 2006).

I.2.2. Rôles des EROs

Dans des conditions normales les EROs sont présentes en faibles quantités (Favier, 2006), indispensables pour l'homéostasie cellulaire (Huet et Duranteau, 2008). Elles ont un rôle de second messager dans de nombreuses voies de transduction de signal intracellulaire, que ce soit la prolifération cellulaire, la différenciation ou bien l'apoptose (Favier, 2003). Elles interviennent dans l'activation des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et le contrôle de la tonicité des muscles et tissus du corps humain (Huet et Duranteau, 2008), ainsi que dans la fécondation ou elles assurent la lyse de la paroi membranaire de l'ovule (Haleng, 2007).

Dans les systèmes vivants, bien que la production des EROs soit physiologique, elle peut être aussi accidentelle et anormale, ce qui la rend dommageable si elle n'est pas neutralisée (Berger, 2006). Les EROs ont la capacité d'oxyder les macro-biomolécules par arrachement d'un électron, d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique RH (lipoperoxydation) ou par addition sur une double liaison (Durand *et al.*, 2013).

I.3. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est un état anormal que subissent parfois les cellules ou tissus de l'organisme (Favier, 2006). Cette situation est due à un déséquilibre de l'homéostasie redox suite à une surproduction des EROs ou une élimination insuffisante par déficit en antioxydants (Belaich et Boujraf, 2016). Son retentissement sur l'organisme dépend de la concentration en EROs, du type cellulaire atteint (Favier, 2006). Les conséquences du stress oxydatif sont variables, allant de simples perturbations biologiques à la lyse cellulaire, responsables des pathologies induites (Favier, 2006). Le tableau II illustre quelques unes de ces dernières :

Tableau II : Pathologies induites par le stress oxydatif.

Pathologies dues au stress oxydatif	Référence
Athérosclérose, Accident ischémique cérébrale, Infarctus du myocarde (IDM)	Beaudeau <i>et al.</i> , 2006
Maladies rhumatismales	Afonso <i>et al.</i> , 2006
Insulino-résistance et Diabète 2	Hokayem <i>et al.</i> , 2012
Anomalies de placentation	Jauniaux et Burton, 2015
Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)	Romanataxo, 2006
Cancer, Alzheimer, cataracte	Tessier et Marconnet, 1995
Hémolyses toxiques oxydatives	Giro et Bornes, 2014

I.4. Hémolysse oxydative

Les hématies peuvent être exposées à un stress oxydatif inhabituel et accumuler des modifications physiques ou moléculaires (Cazzola *et al.*, 2003). Ces dommages oxydatifs, principalement la peroxydation lipidique, produisent une hémolyse (Liu et Shan, 2006). Cette dernière est définie comme étant la dissolution des globules rouges avec libération de leur hémoglobine (Carson *et al.*, 1962).

I.4.1. Effets des EROs sur la membrane des hématies

Les hématies du fait de leurs composantes membranaires peuvent subir une attaque par les EROs, entraînant ainsi l'oxydation de leurs chaînes lipidiques et protéiques (Watanabe *et al.*, 1990). Elles sont particulièrement sensibles à ces attaques puisqu'elles n'ont aucune capacité de réparation ou de régénération (Portier *et al.*, 2007).

I.4.1.1. Oxydation des lipides (Lipoperoxydation)

Les structures lipidiques sont la première cible membranaire des EROs (Flourie *et al.*, 2006). Au sein des lipides, les espèces les plus sensibles sont les acides gras polyinsaturés (AGPI) (Acar *et al.*, 2007). Ces derniers sont très abondants dans les membranes érythrocytaires (Liu et Shan, 2006), la position d'un ou plusieurs groupements méthylène entre leurs doubles liaisons les rend particulièrement sensibles à l'oxydation par les métaux et les radicaux libres oxygénés. Cette oxydation est appelée « la peroxydation lipidique » (Therond, 2006) illustrée dans la figure 01. C'est un phénomène permanent (Tessier et Marconnet, 1995), de réaction en chaîne qui se décompose en trois étapes: l'initiation, la propagation et la terminaison (Gardès, 2006).

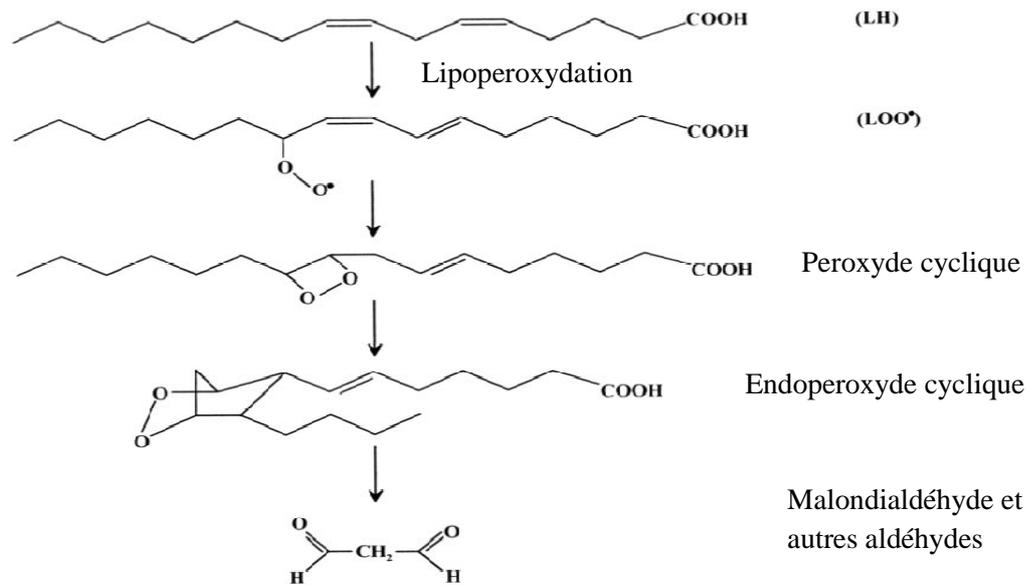
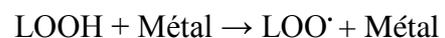
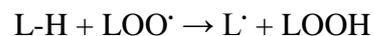


Figure 01 : Peroxydation des acides gras insaturés (Włodek et Kusior, 2006)

La phase d'initiation débute par l'arrachement d'un atome d'hydrogène (Gardès, 2006) au niveau du groupement méthylène par un agent oxydant (Therond, 2006), selon la réaction suivante (Gardès, 2006) : $L-H + \text{Oxydant}^{\cdot} \rightarrow L^{\cdot} + \text{Oxydant}-H$.

Lors de la propagation, le radical pyroxyde lipidique (LOO^{\cdot}) peut facilement arracher un atome d'hydrogène d'une chaîne carbonée voisine ($L-H$) (Gardès, 2006). Le Peroxyde d'acides gras ($LOOH$) peut réagir avec des métaux de transition et former des espèces radicalaires (Durand et al., 2013), ces réactions peuvent se répéter en provoquant la propagation de la chaîne des lésions oxydatives au sein des systèmes membranaires (Gardès, 2006), selon les réactions suivantes (Durand et al., 2013) : $L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot}$



Au final, la formation de composés issus de l'association de deux espèces radicalaires permet la neutralisation des radicaux libres et aboutit ainsi à la terminaison de la chaîne de lipoperoxydation (Durand et al., 2013). Comme dans ces réactions (Halliwell et Gutteridge, 2015) : $L^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow \text{Produit non radicalaire}$



Les produits de la peroxydation sont normalement détoxifiés, les lipo-péroxydes échappant à cette détoxification conduisent à la formation des aldéhydes toxiques, tel que le malonyldialdéhyde (MDA), ayant une forte réactivité vis-à-vis des protéines (Flourie et al., 2006).

I.4.1.2. Oxydation des protéines

L'altération des protéines est plus complexe que les lipides vue la diversité des acides aminés dont les plus sensibles sont les acides aminés soufrés, aromatiques et basiques (Halliwell et Gutteridge, 2015). L'oxydation des acides aminés soufrés au niveau du groupement thiol (SH) conduit à la formation des ponts disulfures qui participent à l'agrégation des protéines (Durand *et al.*, 2013), alors que l'oxydation des acides aminés aromatiques donne lieu à des modifications irréversibles et peuvent ainsi inactiver de nombreuses protéines (Therond, 2006).

Par ailleurs, les modifications oxydatives des protéines par les EROs peuvent avoir lieu sur la chaîne polypeptidique et les chaînes latérales nucléophiles (Therond, 2006), générant des protéines carbonylées, des fragmentations de chaînes polypeptidiques qui sont irréparables et donnent des modifications fonctionnelles importantes (Haleng *et al.*, 2007) par dysfonctionnement des enzymes, des anticorps, des antigènes, des récepteurs cellulaires ou des canaux de transports (Albano *et al.*, 1991).

I.4.2. Conséquences de l'atteinte érythrocytaire

Les érythrocytes possèdent la capacité de détruire et détoxifier les EROs par ses enzymes membranaires mais dans le cas d'un stress oxydatif, les systèmes de défense sont débordés d'où l'apparition de trois types de lésions (Boivin, 1983) :

- **Formation de dérivés d'oxydation de l'hémoglobine**

Les agents oxydants favorisent la précipitation de l'hémoglobine. L'instabilité de ce dernier entraîne la destruction du GR associé à une méthémoglobinémie (Laustau *et al.*, 2011).

- **Peroxydation des lipides membranaires**

La peroxydation lipidique membranaire entraîne la fragilisation de la chaîne carbonée des AGPI aboutissant à une baisse de la fluidité membranaire, celle-ci rend la cellule érythrocytaire rigide et entraîne un impact notable sur le métabolisme cellulaire de l'hématie (Portier, 2007), conduisant inévitablement à la mort cellulaire (Haleng *et al.*, 2007). Le MDA consécutif de la peroxydation lipidique peut provoquer secondairement des liaisons entre protéines formant des complexes de haut poids moléculaires incluant la spectrine, d'où la diminution de la déformabilité (Boivin, 1983).

- **Couplage des protéines de la membrane**

Les protéines structurales membranaires érythrocytaires sont indispensables au maintien de la forme et flexibilité de cette cellule (Portier *et al.*, 2007). L'oxydation de ces protéines aboutit au blocage de sa déformabilité (Boivin, 1983). L'oxydation de certains acides aminés peut modifier les sites actifs de certaines enzymes, d'antigènes et des récepteurs membranaires aboutissant à l'inactivation de leurs fonctions, de la forme biconcave et du système de protection antioxydant (Laustau *et al.*, 2011).

Finalement toute affection entraînant une diminution de la déformabilité de l'érythrocyte ou une instabilité de sa membrane peut altérer ainsi sa survie et aboutir à des anomalies dites « anémies hémolytiques » (Garçon, 2009).

I.5. Systèmes de défense contre le stress oxydatif

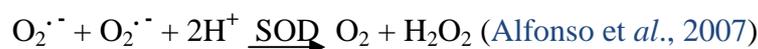
Les systèmes de défense contre le stress oxydatif visent à limiter les réactions radicalaires qui sont généralement irréversibles (Ré *et al.*, 2004), protéger l'organisme des effets délétères des EROs (Haleng *et al.*, 2007), prévenir et corriger les dommages et pathologies dues au stress oxydatif (Roussel, 2009).

Un antioxydant est défini comme étant une substance, qui présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe l'oxydation de ce substrat (Durand *et al.*, 2013). Au niveau de l'organisme, les antioxydants sont présents dans les compartiments intracellulaires, membranaires et extracellulaires. Ils agissent de manière directe ou indirecte en prévenant la formation des EROs ou en les captant (Fontaine *et al.*, 2002). Ils sont reparties en deux catégories, endogènes et exogènes (Durand *et al.*, 2013).

I.5.1. Antioxydants endogènes

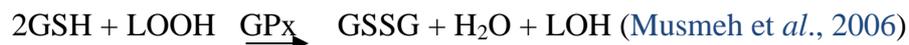
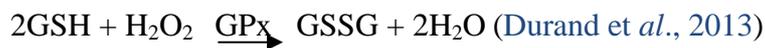
Ce sont des antioxydants primaires qui limitent la production des EROs (Ré *et al.*, 2004). Cette ligne de défense est assurée par des enzymes ou par des composés non enzymatiques (Durand *et al.*, 2013). Les principaux représentants de l'équipement enzymatique sont :

Les superoxydes dismutases (SOD) qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydatif (Halengi *et al.*, 2007). Elles éliminent les radicaux superoxydes par dismutation en H₂O₂ (Gaudable et Favier, 1997), selon la formule suivante :



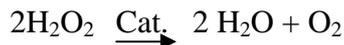
Le H₂O₂ formé est éliminé à son tour par les glutathion peroxydases (GPx) et catalases (Gaudable et Favier, 1997).

Les glutathions peroxydases (GPx) sont retrouvées dans le plasma, le cytosol et la membrane cellulaire (Favier, 2006). Elles sont aussi présentes dans les érythrocytes et c'est le premier agent éliminant le H₂O₂ dans celles-ci (Tessier et Marconnet, 1994). Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène et l'hydroperoxyde lipidique en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur, sur lequel elles transfèrent l'O₂ donnant du glutathion oxydé (Gaudable et Favier, 1997), selon les formules suivantes :



Les SOD et GPx ont un effet complémentaire et nécessite la présence concomitante pour avoir un effet protecteur (Gaudable et Favier, 1997).

Les catalases sont localisées dans les peroxysomes seulement. Concentrées dans le foie et les érythrocytes, ces enzymes neutralisent de grandes quantités de H₂O₂ issues de la mitochondrie (Tessier et Marconnet, 1994). Elles le réduisent en libérant l'eau et l'O₂, éliminant ainsi son excès et ce en présence d'ions ferreux, selon la formule suivante (Gaudable et Favier, 1997) :



Le système non enzymatique renferme à son tour de nombreuses substances, tels que la ferritine, la transferrine, la ceruloplasmine, l'haptoglobine, l'albumine, la bilirubine et l'acide urique (Fontaine et al., 2002 ; Haleng et al., 2007 ; Rochete, 2008), mais essentiellement le glutathion qui est un thiol non protéique très abondant dans les cellules du vivant. Il agit directement sur les EROs ou bien comme co-substrat de la GPx, en régénérant d'autres antioxydants (vit.E et vit.C) (Ré et al., 2004) ou encore comme un chélateur de métaux de transition (Haleng et al., 2007).

I.5.2. Antioxydants exogènes

Ce sont des antioxydants secondaires, un ensemble de substances liposolubles et hydrosolubles dont le rôle est de piéger les EROs (Scavengers) (Ré et al., 2004). Les antioxydants synthétiques vus leur efficacité et leur disponibilité sont utilisés dans le contrôle et le traitement du stress oxydant (Zazzo, 2002), ce tableau illustre quelques uns :

Tableau III : Médicaments antioxydants.

Médicaments	Références
Methotrexate , Sulfasalazine	Akyol et al., 2001
Bytylatedhydroxyanisole (BHA)	Ajila et Rao, 2008
Bytylatedhydroxytuluene (BHT)	Mendes et al., 2011 ; Banejree et al., 2008

Malgré la puissance de ces substances, la thérapeutique antioxydante ne doit pas ignorer l'utilité des radicaux libres. Ainsi l'excès de ces molécules synthétiques peut être toxique présentant ainsi des effets néfastes sur la santé (Favier, 2006). L'ampleur de ce problème a fait que les antioxydants naturels deviennent de plus en plus recommandés pour substituer à ces substances (Haddouchi *et al.*, 2016). L'alimentation est une des sources les plus importantes de ces derniers (Hoyakem, 2012). Ils peuvent être des nutriments essentiels, tels que les vitamines et les oligo-éléments ou des métabolites secondaires, tels que les polyphénols et les caroténoïdes (tableau IV) (Neve, 2002).

Tableau IV: Quelques exemples d'antioxydants exogènes.

	Sources alimentaires	Mode d'action	Références
Lipophiles	Vitamine E	Huiles végétales, germe de blé, noix et légumes à feuilles vertes.	Diminution de la peroxydation lipidique dans la membrane cellulaire et des LDLs. Neve, 2002 Gaudable et Favier, 1997
	Caroténoïdes (β-carotène)	Carottes, tomates, melons, agrumes, épinard et maïs.	Précurseur de la vitamine A ; Captation de ¹ O ₂ ; Terminaison des réactions en chaîne de lipoperoxydation ; Protection des structures cellulaires contre l'agression oxydante. Neve, 2002 Gaudable et Favier, 1997
Hydrophiles	Vitamine C	Kiwi, cerises, tomates, brocoli, choux et légumes verts.	Piégeur des EROs à spectre large (ROO·, OH·, O ₂ ⁻ et ONOO ⁻) ; Régénérateur de la vitamine E ; Prévenir la peroxydation lipidique. Neve, 2002 Ré <i>et al.</i> , 2004
	Oligoéléments	Le zinc : Viandes, poissons, céréales et légumes secs. Le sélénium : Viandes, poisson, œufs, lait, céréales et légumes secs.	Protection des fonctions thiol des protéines membranaires et métallothionine contre l'oxydation ; Cofacteurs essentiels de la SOD ; Cofacteur de la GPx. Neve, 2002 Haleng <i>et al.</i> , 2007.
	Polyphénols	Fruits, légumes, céréales, viandes, poisson et plantes.	Piégeurs des EROs ; Chélateur des métaux de transition ; Inhibiteur de la peroxydation lipidique. Haleng <i>et al.</i> , 2007 Scalbert <i>et al.</i> , 2005

I.6. Rôle des composés phénoliques dans la prévention de l'hémolyse oxydative

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes à partir des glucides. Cette biosynthèse est engendrée d'une part, par la voie de shikimate, la plus courante, qui conduit à la formation des acides phénoliques, des flavonoïdes et des lignanes et d'autre part par la voie poly-acétate qui est à l'origine de composés polycycliques,

tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (Auger, 2014). Un polyphénol est une molécule qui possède un noyau aromatique (groupement phénols) sur lequel sont présents un ou plusieurs groupements hydroxyles (-OH) (Bennetau-Pelissero, 2014). La structure et la taille des composés phénoliques varient, ils sont généralement conjugués à des sucres ou des acides organiques, ce qui explique cette diversité (Auger et al., 2014).

Les plantes par leurs différents constituants et vue leurs bienfaits ont été utilisées en médecine traditionnelle depuis longtemps (Haddouchi et al., 2016). Elles constituent une source inépuisable de polyphénols (Djeridane et al., 2006). Le tableau V illustre les plantes médicinales et polyphénols ayant fait l'objet des recherches pour déterminer leurs implications dans la prévention de l'hémolyse oxydative.

Tableau V : Plantes et polyphénols purs utilisés dans des études en vue de l'exploration de leur effet protecteur contre la lyse érythrocytaire oxydative.

	Plantes et parties/ composés	Nature d'extrait et doses	Modèles et résultats	Références
Les extraits de plantes	<i>Mangifera indica L</i> (peau)	Extrait d'acétone (80%) 5-25µg EAG	GR de rats wistar males (180-220g) IC ₅₀ 11,5-20,9µg EAG	Ajila et RAO, 2008
	<i>Cydonia oblonga</i> (feuilles)	Extrait methanolique 12,5-50µg/ml	GR-H IC ₅₀ 30,7±6,7µg/ml	Costa et al., 2009
	<i>Cydonia oblonga miller</i> (peau et pulpe de fruit, graine)	Extraits methanoliques 250-2000µg/ml Graine : 12,5- 2000µg/ml	GR-H IC ₅₀ pulpe 652µg/ml IC ₅₀ peau 695µg/ml Effet hémolytique	Magalhães et al., 2009
	<i>Arbutus unedo L</i> (feuilles et fruit)	Extraits aqueux Feuilles : 50, 75, 100µg/ml Fruit : 400, 800, 1600µg/ml	GR-H IC ₅₀ feuilles 0,062±0,002mg/ml IC ₅₀ fruit 0,430±0,091mg/ml	Mendes et al., 2011
	<i>Papaya de carica</i> (feuilles)	Extrait methanolique 0,25; 0,5; 1; 2mg/ml	GR-H IC ₅₀ 7,33mg/ml	Okoko et Ere, 2012
Les polyphénols purs	Rutine (flavonol)	1mM	GR de lapins males IC ₅₀ 13,7µM	Revuelta et al., 2006
	Curcumine (curcuminoïde)	5-50µM	GR-H IC ₅₀ 43±5 µM	Banerjee et al., 2008
	Epicatechine (flavonols)	12,5-150µM	GR-H	Ugartondo et al., 2009
	Quercitine (flavonol) retroverole (stilbéne)	50 µM	GR-H	Hatia et al., 2014

Le patrimoine végétal algérien ne cesse de délivrer des plantes ayant un pouvoir antioxydant pour les recherches scientifiques. Au niveau du laboratoire de Biochimie Appliquée de l'université de Bejaia, parmi les plantes étudiées ayant montré un potentiel antioxydant on cite : *Pistacia lentiscus*, *Clematis flammula* et *Fraxinus angustifolia* (Atmani et al., 2009). Dans cette présente étude, l'expérimentation sera menée sur les extraits éthanolique et aqueux de samares de *F.angustifolia*, afin de déduire leur effets sur le modèle membranaire érythrocytaire.

I.6.1. *Fraxinus angustifolia*

F.angustifolia connue aussi sous le nom de frêne étroit ou cendre désertique est un arbre méditerranéen de taille moyenne (40m) qui couvre l'Europe Centrale et l'Afrique du Nord Ouest (Caudullo et Durrant, 2016), ayant des feuilles à bordure dentée disposées en groupes impaires, une écorce grisâtre et un fruit qui est une samare à aile allongée contenant une seule graine ovale (Kostova et Iossifova, 2006). Cette samare fait 3 à 4 cm de long, aplatis et elle munit en été. Le frêne a une croissance rapide, exigeant un climat tempéré, sur sols humides ou terres bien drainées (Caudullo et Durrant, 2016). Il a été classifié par Wallander (2008) suite à une étude phylogénétique moléculaire :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Astéridées

Ordre : Lamiales

Famille : Oleacées

Genre : *Fraxinus*

Espèce : *Fraxinus angustifolia*



Figure 02 : Photographie originale de l'arbre de *F.angustifolia*

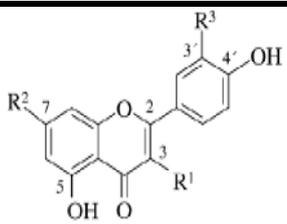
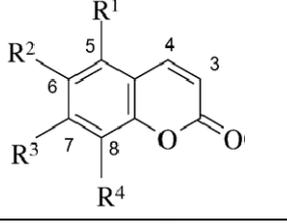
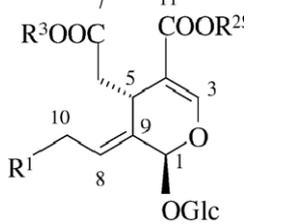
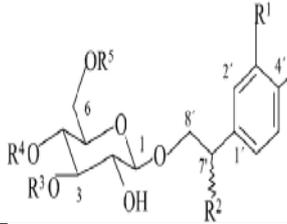
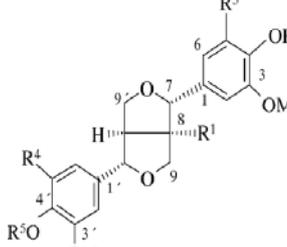
F.angustifolia a une importance économique, commerciale, et médicinale (Kostova et Iossifova, 2006). C'est l'espèce la plus abondante au nord de l'Algérie et dont le nom local est *Aslene* ou *Dardar* (Ayouni et al., 2016). Elle est utilisée en médecine populaire comme : antioxydant, anti-inflammatoire et diurétique (Atmani et al., 2009).

Les samares de cette plante sont utilisées en décoction et en infusion comme antirhumatismal, anti-hémorroïdes et antipyrétique (Baba-Aissa, 1999). Elles sont également laxatives, sudorifiques et toniques (Baba-Aissa, 2011).

I.6.2. Composés phénoliques retrouvés dans *F.angustifolia*

La présence de coumarines distingue le genre Fraxinus des autres Oléacées, mais aussi les sécoiridoïdes, les phenylthanoïdes, les lignanes, les flavonoïdes et les composés phénoliques simples caractérisent cette espèce (Kostova et Iossifova, 2006), ce tableau les illustre :

Tableau VI: Composés phénoliques retrouvés chez l'espèce *F.angustifolia*.

Composés phénoliques	Squelette carboné	Structure	Exemples	Références
Flavonoïdes	C ₆ -C ₃ -C ₆		Rutine Astragalin Nicotiflorin	Kostova et Iossifova, 2006 Macheix et al., 2005
Coumarines	C ₇ -OH		Fraxin Fraxinol Esculetin Scopoletin Fraxetin	Kostova et Iossifova, 2006 Bruneton, 2011
Sécoiridoïdes	Sécoiridoïde + glucose		-Ligstroside Fraxamoside	Kostova et Iossifova, 2006
Phénylthanoïdes Glycosides	Squelette phenylethyl + glucose + Rhamose		Verbascoside Calcéolarioside	Kostova et Iossifova, 2006
Lignanes	(C ₆ -C ₃) ₂		-Pinoresinol - Fraxiresinol-8-O-β-D-glucopyranoside	Kostova et Iossifova, 2006 Sarni-Machado et Cheyner, 2006

I.6.3. Propriétés thérapeutiques de *F.angustifolia*

Les polyphénols essentiellement les flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres ayant aussi la capacité de complexer certains cations métalliques pro-oxydants (Derbré, 2010). Ils détruisent essentiellement les espèces réactives $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , NO_2^{\cdot} (Halliwell et Gutteridge, 2015). Ces molécules du fait de leurs constituants sont de puissants antioxydants (Bennetau-pelissero, 2014), les groupements hydroxyles des polyphénols peuvent accepter un électron formant des radicaux phénoxyles relativement stables (Hatia et al., 2014), cette électron est délocalisé sur l'ensemble du squelette de la molécule à cause de l'alternance des simples et doubles liaisons présentes sur les polyphénols, répartissant ainsi son énergie sur la totalité de la molécule la rendant stable et peu réactive (Bennetau-pelissero, 2014), comme le montre cette figure :

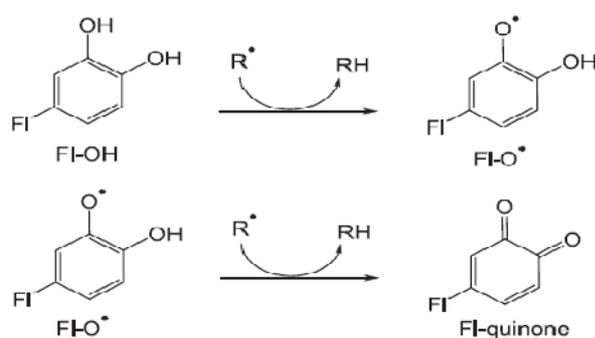


Figure 03 : Piégeage des EROs (R^{\cdot}) par les flavonoïdes. Le radical libre FI-O• peut interagir avec un deuxième radical acquérant ainsi une structure stable de quinone (Prochazkova et al., 2011).

De ce fait, les composés phénoliques permettent de rompre les réactions d'oxydation en chaîne dans les cellules bloquant la propagation, essentiellement dans la peroxydation lipidique (Tsao, 2010), comme dans le cas de l'hémolyse oxydative ou les polyphénols exercent un effet anti-hémolytique par interaction avec la membrane érythrocytaire, ou bien par le piégeage des radicaux libres, ce qui empêche les dommages membranaires (Hatia et al., 2014).

C'est dans ce contexte que cette étude, *in vitro*, a été menée dans le but d'évaluer le potentiel des extraits éthanoliques et aqueux de samares de *F.angustifolia* à inhiber l'hémolyse oxydative et la peroxydation lipidique induite par le H_2O_2 sur des cellules érythrocytaires humaines.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel**II.1.1. Equipement et verreries**

Agitateur (VELP), balance analytique (RADWAG), broyeur (KIKA®-WERKE M 20), Centrifugeuses (SIGMA), rota-vapeur (HEIDOLPH), spectrophotomètre (BIOTECH ENGINEERING), sonicateur (RAYPA), sur-congélateur à -80°C (TELSTAR), bain marie (MEMMERT), vortex (VELP), lyophilisateur (CHRIST), pH mètre (HANNA), micropipettes, éprouvettes, béchers, ballons à lyophilisateur et rota-vapeur, fioles, tubes Falcon, tubes à hémolyse, tubes héparinés, barreaux magnétiques, portoirs.

II.1.2. Produits chimiques

Ethanol (96%), Méthanol absolu, Rutine, Acide tannique, Acide gallique, Carbonate de sodium, Réactif de Folin Ciocalteu, Albumine de Sérum de Bouvin (BSA), Sulfate Dodecyl Sodium (SDS), Triéthanolamine (TEA), Chlorure d'Aluminium (AlCl₃), Acétate de Sodium (C₂H₃NaO₂), Chlorure de fer (FeCl₃), Hydroxyde de sodium (NaOH), Chlorure d'hydrogène (HCl), Chlorure de sodium (NaCl), Acide acétique, dihydrogenophosphate de potassium (KH₂PO₄), Hydrogénophosphate de sodium (Na₂HPO₄), Azide de sodium (N₃Na), Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ 30%), Acide thiobarbiturique (TBA), Acide trichloroacétique (TCA), Dimethylsulfoxyde (DMSO).

Les réactifs utilisés dans cette étude sont majoritairement de marque Sigma, les solvants et les acides de marque Biochem et Prolabo. L'eau distillée utilisée a été obtenue au niveau du laboratoire de Biochimie Appliquée par un distillateur de marque GFL2104.

II.1.3. Echantillons biologiques**II.1.3.1. Matériel végétal**

Cette étude a porté sur les extraits éthanolique et aqueux de samares de *F.angustifolia*. Ces dernières ont été récoltées en juillet 2016, à Chemini, Bejaia, une région à climat subhumide. Cette plante a été préalablement identifiée au sein du Laboratoire de Biochimie Appliquée de l'université de Bejaia.



Figure 04 : Photographie originale de Samares *F.angustifolia*

II.1.3.2. Echantillons sanguins humains

Cinq poches de sang humain ont été obtenues au niveau du Centre de Transfusion Sanguine (CWTS Bejaia, Algérie) où les expérimentations nécessitant la manipulation des échantillons sanguins ont été réalisées.

II.2. Méthodes**II.2.1. Préparation des extraits à partir des samares de *F.angustifolia***

Les samares de *F.angustifolia* ont été séchées à l'air libre et à température ambiante dans un endroit ombragé jusqu'à séchage complet. Ensuite, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine. Cette dernière n'a pas subi de tamisage vu son aspect légèrement pâteux et utilisée donc directement pour l'extraction.



Figure 05 : Photographie originale de la poudre de samares de *F.angustifolia*

Deux types d'extraction, éthanolique et décoction à l'eau ont été adoptées :

- **Extraction éthanolique**

L'extraction des composés phénoliques des samares de *F.angustifolia* a été effectuée par épuisement de 50g de poudre de samares, macérées dans de l'éthanol (96%), avec un rapport de 1g de poudre pour 4ml d'éthanol pendant 24h sous agitation, à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'air. Après décantation durant 12h, le surnageant a été récupéré et centrifugé (1500g/15min), alors que le précipité a subi une seconde macération. En dernier lieu, les deux surnageants ont été homogénéisés et séchés à l'aide d'un rotavapeur pour obtenir un extrait verdâtre sec. La pesée de l'extrait brut a été prise après la stabilisation du poids sec et dont le rendement d'extraction a été calculé comme suit :

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

P_1 : Poids du ballon avec extrait (g) après évaporation totale du solvant, P_0 : Poids du ballon vide (g), PS : Poids de la poudre sèche (g).

- **Extraction aqueuse**

Une décoction à base de poudre de samares de *F.angustifolia* a été préparée dans le but d'obtenir un extrait aqueux. Pour ce, 25 g de poudre ont été ajoutés dans 250 ml d'eau distillée bouillante maintenue sous agitation à 100°C durant 30 minutes, à l'abri de la lumière et de l'air, suivie de 2h de décantation. Le surnageant a été récupéré et centrifugé (1500g/15min), alors que le précipité a subi une deuxième macération dans les mêmes conditions. Par la suite, les surnageants ont été filtrés à travers la laine de verre et homogénéisés en un seul décocté, puis surgelé à -80°C, pour être ensuite lyophilisé afin d'obtenir l'extrait aqueux sec. Le rendement d'extraction a été calculé de la même façon que l'extraction éthanolique.

II.2.2. Dosages des contenus phénoliques des extraits éthanoliques et aqueux de samares de *F.angustifolia*

Des méthodes colorimétriques ont été utilisées pour la détermination du taux de phénols totaux, flavonoïdes et tanins dans les deux extraits obtenus précédemment.

II.2.2.1. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux a été estimée selon le protocole de [Kahkonen et al. \(1999\)](#), basé sur le réactif Folin Ciocalteu (F.C). Ce dernier est composé d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) pouvant être réduit par les polyphénols en un complexe de couleur bleu ([Boizot et Charpentier, 2006](#)).

L'expérimentation a été menée en additionnant 200µl de la solution d'extrait avec 1ml du réactif de F.C, puis 800µl de carbonate de sodium (7,5%) dans des tubes à hémolyse, puis ceux-ci ont été agités et incubés durant 30 minutes à l'abri de la lumière. Enfin les absorbance ont été mesurées à 765nm ([Kahkonen et al., 1999](#)).

La concentration en phénols totaux est exprimée en µg équivalent acide gallique par milligramme d'extrait sec, calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions par l'acide gallique comme référence (Annexe 01).

II.2.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué selon le protocole de Maksimovic *et al.* (2005), avec de légères modifications. Il est basé sur l'utilisation du réactif de chlorure d'aluminium (AlCl_3). Ce dernier forme un complexe de couleur jaune en présence des flavonoïdes. Le mode opératoire consiste à additionner 2ml de la solution d'extrait avec 1ml d' AlCl_3 dans des tubes à hémolyse, puis agités et incubés durant 10 minutes. Les absorbances ont été mesurées à 430nm.

La concentration en flavonoïdes est exprimée en μg équivalent rutine par milligramme d'extrait sec, déduite à partir de la courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions par différentes concentrations de la rutine comme flavonoïde de référence (Annexe 02).

II.2.2.3. Dosage des tanins

Le dosage des tanins a été réalisé selon le protocole de Hagerman et Bulter (1978), basé sur la précipitation d'albumine de sérum de bovin (BSA) par les tanins contenus dans la solution d'extrait.

Les tanins ont été ensuite détectés par une réaction colorimétrique Fe^{2+} - phénols, mesurée spectrophotométriquement à 510 nm. Le mode opératoire est résumé dans la figure suivante :

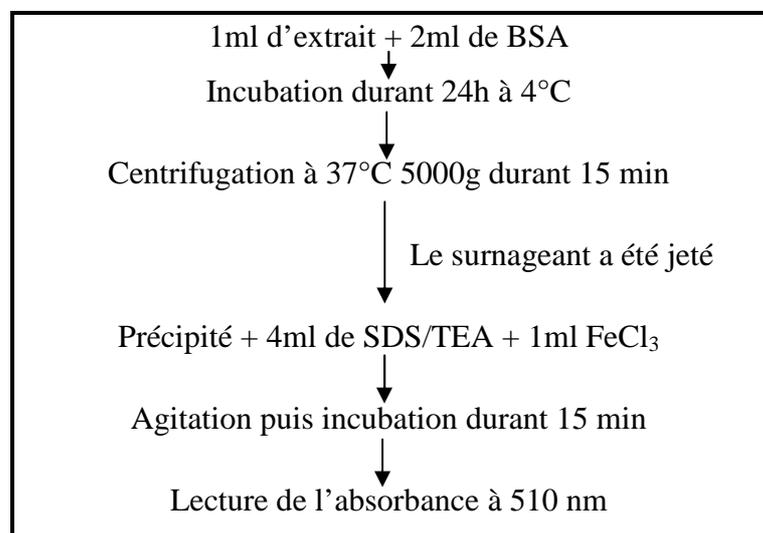


Figure 06 : Protocole de dosage des tanins (Hagerman et Bulter, 1978)

La concentration en tanins est exprimée en μg équivalent acide tannique par milligramme d'extrait sec, estimée par rapport à la courbe d'étalonnage établie avec l'acide tannique comme référence (Annexe 03).

II.2.3. Etude du pouvoir hémolytique du peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations et estimation de la peroxydation lipidique par le dosage de MDA

Le sang a été prélevé séparément dans des tubes héparinés à partir des 5 poches de sangs, afin de préparer les suspensions érythrocytaires. Par la suite, il a été centrifugé à 4°C (1500rpm/10min), pour éliminer le surnageant et laver le culot globulaire 3 fois (3500rpm/2min) par du tampon phosphate salin à pH 7,4 (150 mM de NaCl, 0,58mM de KH_2PO_4 , 3,4mM de Na_2HPO_4 , 1mM de N_3Na), selon Snyder *et al.*, 1985 ; Banerjee *et al.*, 2008), puis suspendu à 10% d'hématocrite dans le même tampon..

Le pouvoir hémolytique de H_2O_2 à différentes dilutions (1-80mM) obtenues à partir d'une solution mère à 100mM a été testé, *in vitro*, sur ces suspensions d'érythrocytes selon le protocole de Rafat *et al.* (2009) rapporté par Sundaram *et al.* (2011). Ce test repose sur la mesure par méthode spectrophotométrique de l'hémoglobine libérée (couleur rouge) suite à la lyse des érythrocytes provoquée par le H_2O_2 (James et Alewo, 2014).

En parallèle, le dosage colorimétrique des substances réactives avec le TBA (TBARS) par la réaction des MDA-Acide thiobarbiturique à chaud dans un milieu acide a été réalisé sur les tests hémolytiques des différentes concentrations de H_2O_2 , selon le protocole de Okoko et Ere (2012), pour confirmer une éventuelle lipoperoxydation.

Le mode opératoire est résumé par les étapes suivantes :

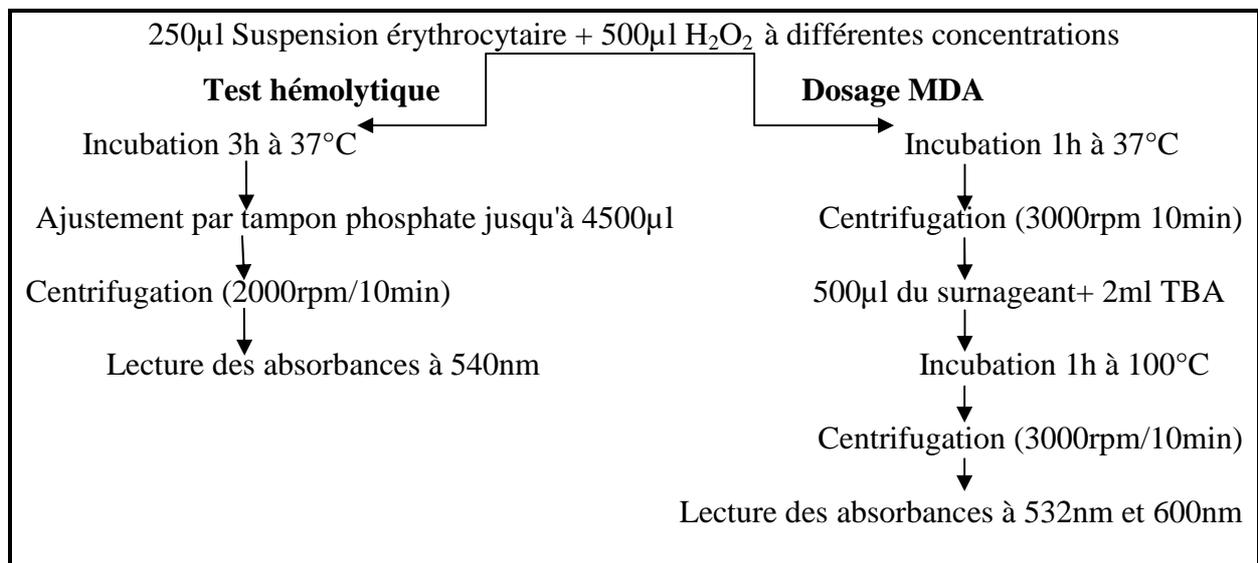


Figure 07 : Protocole d'analyse du pouvoir hémolytique de H_2O_2 et formation de MDA

Les résultats ont été comparés à un témoin négatif (T^- : 250µl S.E. + 500µl tampon phosphate) et un témoin positif (T^+ : 250µl S.E. + 500µl d'eau distillée), ce dernier

représente l'hémolyse maximale induite par osmose ou choc hypotonique dans les conditions expérimentales fixées pour cette étude. Le pourcentage d'hémolyse a été calculé selon la formule :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [(\text{Abs Test H}_2\text{O}_2 - \text{Abs T}^-) / \text{Abs T E.D.}] * 100$$

La quantité des MDA produite a été estimée par la conversion des absorbances en concentrations de MDA exprimées en μmol , par le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 1,56 * 10^{-5} \text{ cm.nmol}^{-1}$ (Sawas et Pentyala, 2004)

Une concentration de H_2O_2 a été choisie pour représenter le taux d'hémolyse optimal dans les études ultérieures.

II.2.4. Etude de la cytotoxicité probable de différentes concentrations des extraits éthanolique et aqueux de samares de *F.angustifolia* sur les érythrocytes humains :

Les suspensions érythrocytaires ont été préparées à partir des échantillons de sang de la même manière que précédemment (II.2.3).

Des solutions mère à $2000\mu\text{g/ml}$ des deux extraits (aqueux et éthanoliques) de samares de *F.angustifolia* ont été préparées dans du tampon phosphate (additionné de DMSO à 5%), puis des dilutions décroissantes ont été réalisées de $2000\mu\text{g}$ à $10\mu\text{g/ml}$. Toutes ces concentrations ont été testées, *in vitro*, selon la même procédure appliquée au pouvoir hémolytique de H_2O_2 (Rafat *et al.*, 2009 rapporté par Sundaram *et al.*, 2011), accompagnées aussi d'une analyse des MDA, afin de déterminer toute cytotoxicité exprimée par ces deux extraits vis-à-vis des GR, aboutissant à une hémolyse et une probable peroxydation lipidique.

Les résultats ont été comparés à chaque fois à un T⁻ (tampon phosphate) et un T E.D. et ont été interprétés en pourcentage d'hémolyse pour le test hémolytique et en μmol pour les MDA.

II.2.5. Evaluation des effets anti-hémolytiques des extraits éthanolique et aqueux de samares de *F.angustifolia* à différentes concentrations

L'effet inhibiteur de l'hémolyse par les deux extraits de samares de *F.angustifolia* a été évalué par le protocole de Rafat *et al.* (2009) rapporté par Sundaram *et al.* (2011) pour les concentrations n'ayant exercé aucun effet hémolytique significatif ($10-1000\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux et $10-500\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait éthanolique).

Afin de déterminer le pouvoir inhibiteur de l'hémolyse des deux extraits, les suspensions érythrocytaires ont été pré-incubées dans des tubes à hémolyse avec les concentrations choisies de chaque extrait avant de les mettre en contact avec du H_2O_2 (8mM).

La concentration du H₂O₂ a été sélectionnée suite à l'analyse des résultats obtenus dans l'étude de l'hémolyse et de peroxydation lipidique induites par différentes concentrations de H₂O₂. Une évaluation des MDA formés a été réalisée en parallèle comme dans l'étude antérieure (II.2.3). Le protocole expérimental est récapitulé dans la figure 10.

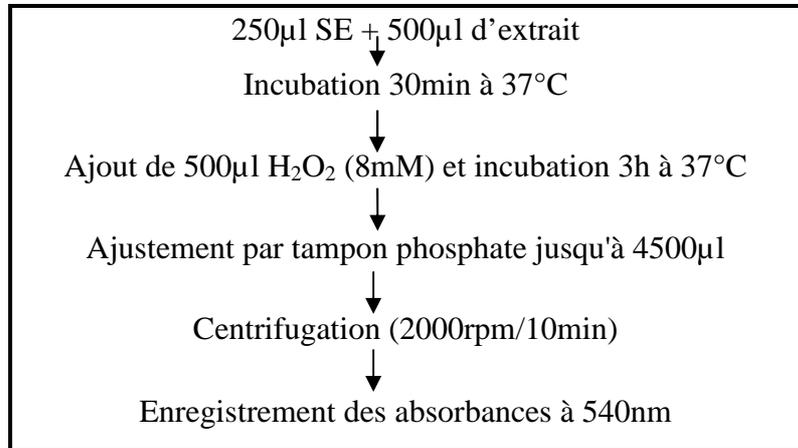


Figure 08 : Procédure expérimentale d'évaluation de l'effet anti-hémolytique des extraits de samares de *F.angustifolia*

Un T (tampon phosphate) et T E.D. ont été préparés simultanément. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et calculés relativement à l'hémolyse optimale obtenue par la concentration de 8mM de H₂O₂.

$$\% \text{ d'inhibition d'hémolyse} = [(\text{Hémolyse H}_2\text{O}_2 - \text{Hémolyse Test anti-hémolytique}) / \text{Hémolyse H}_2\text{O}_2] * 100$$

II.2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel statistique Graph Pad Prism 5.3. Une méthode d'analyse de variance dite test ANOVA *one way*, avec les post test de comparaison Tukey et Dunnett, à été appliquée sur les données obtenues, en trois répétitions et sur cinq sangs différents. Les résultats ont été donc exprimés en moyenne \pm S.E.M.

Les résultats sont considérés significatifs à * $p < 0,001$ comparativement au contrôle positif et # $p < 0,001$ comparativement au contrôle négatif.

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats et interprétation

III.1.1. Taux d'extraction

La décoction aqueuse et l'extraction éthanolique sont les deux méthodes choisies dans cette étude, ces deux solvants sont de polarités différentes et ont été choisis dans le but d'optimiser les rendements d'extraction ainsi que de comparer leur activités biologiques relatives.

Après calcul, les pourcentages d'extraction de samares de *F.angustifolia* pour les deux extraits aqueux et éthanolique sont de 8,82% et 14,7%, respectivement. Ceci a clairement montré que le rendement en extrait sec varie selon le solvant utilisé et la procédure d'extraction. D'après les résultats, on constate que le pourcentage d'extraction par l'éthanol (14,7%) est supérieur à celui obtenu par l'extrait aqueux (8,82%).

III.1.2. Dosages des contenus phénoliques des extraits éthanoliques et aqueux de samares de *F.angustifolia*

Les résultats de l'analyse colorimétrique en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et tanins sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau VII : Teneurs phénoliques des deux extraits de samares de *F.angustifolia*.

Nature de l'extrait	Teneur en phénols totaux (μg Eq.A.G./mg d'Ext.)	Teneur en flavonoïdes (μg Eq.Rut./mg d'Ext.)	Teneur en tanins (μg Eq.A.T./mg d'Ext.)
Ethanolique	4,87 \pm 0,02	142,59 \pm 0,03	322,76 \pm 0,07
Aqueux	24,02 \pm 0,02	9,8195 \pm 0,02	32,35 \pm 0,01

Ext.= Extrait

Le contenu phénolique total dans les deux extraits examinés (éthanolique et aqueux) des samares de *F.angustifolia* est exprimé en μg équivalent acide gallique/mg d'extrait.

Selon les résultats décrits dans le tableau ci-dessus, on remarque que la teneur en polyphénols dans l'extrait aqueux est clairement plus élevée avec un taux de 24,02 \pm 0,02 μg Eq.A.G./mg d'Ext. par rapport à celle de l'extrait éthanolique 4,87 \pm 0,02 μg Eq.A.G./mg d'Ext. , ceci suggère une composition phénolique différente entre les deux extraits.

En comparant les résultats obtenus dans le tableau ci-dessus, on constate que la teneur en flavonoïdes est considérablement plus élevée dans l'extrait éthanolique avec un taux de 142,59 \pm 0,03 μg Eq.Rut./mg d'Ext. que dans l'extrait aqueux donnant 9,8 \pm 0,02 μg Eq.Rut./mg d'Ext.

De même, concernant le contenu des tanins dans les deux extraits de samares de *F.angustifolia*, exprimé en μg équivalent acide tannique/mg d'extrait, c'est l'extrait éthanolique dont la teneur en tanins est de $322,76 \pm 0,07\mu\text{g Eq.A.T./mg}$ d'Ext. qui est nettement plus riche que l'extrait aqueux dont la teneur est de $32,35 \pm 0,01\mu\text{g Eq.A.T./mg}$ d'extrait.

III.1.3. Etude du pouvoir hémolytique du peroxyde d'hydrogène à différentes concentrations et estimation de la peroxydation lipidique par le dosage de MDA

Les résultats de l'effet du H_2O_2 à différentes concentrations sur les érythrocytes en suspension sont représentés dans la figure suivante :

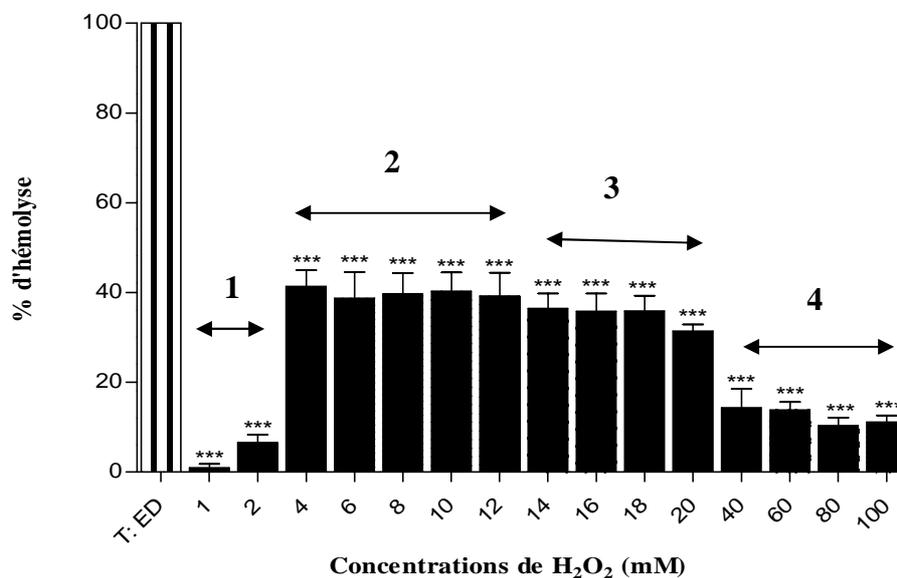


Figure 09 : Taux de l'hémolyse induite par différentes concentrations de H_2O_2 comparés au T: E.D. Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M. (n=5). ***P<0,001 par rapport au control (test Dunnett).

D'après l'histogramme obtenu et comparativement au T: E.D. (eau distillée) qui est considéré à 100% d'hémolyse, on constate que le taux d'hémolyse dépend de la concentration du H_2O_2 présent dans le milieu. À de faibles concentrations (1) ($\leq 2\text{mM}$), le taux d'hémolyse est très faible ne dépassant pas 7%, alors que celui-ci augmente considérablement entre 4mmol et 12mmol formant ainsi un plateau (2) avec un pourcentage d'hémolyse qui varie de 38,72% à 41,31%, puis ce dernier commence à diminuer progressivement avec l'augmentation de la concentration (3). À des concentrations $> 20\text{mM}$ (4), le taux d'hémoglobine dans le milieu est significativement réduit (***P<0,001).

Cependant, les taux d'hémolyse enregistrés par toutes les concentrations étudiées restent significativement inférieures ($***P < 0,001$) à l'hémolyse provoqué par l'eau distillée (100%).

Les résultats du dosage de MDA produits suite aux traitements des érythrocytes par différentes concentrations de H_2O_2 sont représentés dans la figure suivante :

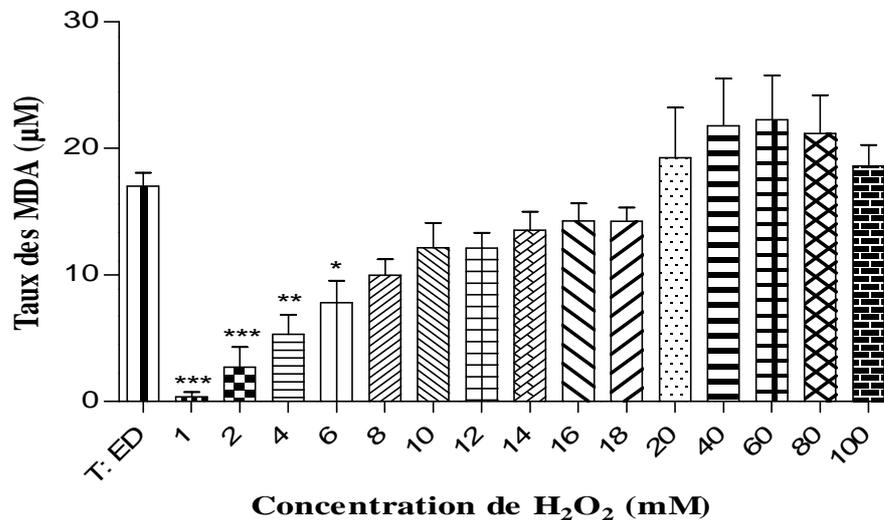


Figure 10 : Evaluation des taux de MDA formés à différentes concentrations de H_2O_2 comparés au T: E.D. Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M. (n=5). $***P < 0,001$ par rapport au control (test Dunnett).

D'après cette courbe on observe une augmentation des taux des MDA en fonction de la concentration de H_2O_2 pour atteindre un seuil de $22,25\mu M$ à une concentration de 60mM de H_2O_2 , alors que comparés au contrôle traité par l'eau distillée, on constate que la différence entre les taux des MDA libérés augmentent de façon dose dépendante. En effet, ces taux augmentent de façon linéaire pour la gamme de concentration de 1mM-10mM, qui deviendra stable pour les concentrations (10-18mM), puis une augmentation importante à de fortes concentrations de H_2O_2 .

Le choix de la concentration 8mM de H_2O_2 comme concentration représentant un taux d'hémolyse optimal, pour la suite du travail, revient au fait que celle-ci soit la médiane d'un plateau de concentrations hémolytiques (4 à 12mM) avec un taux considérable de MDA formés.

II.2.4. Etude de la cytotoxicité probable de différentes concentrations des extraits éthanolique et aqueux de samares de *F.angustifolia* sur les érythrocytes humains

Pour évaluer l'effet des deux extraits de samares de *F.angustifolia* sur les érythrocytes, plusieurs concentrations de ces derniers ont été testées et l'hémoglobine libérée est spectrophotométriquement mesurée (540 nm) pour déterminer une éventuelle hémolyse induite par ces deux extraits. Ces derniers ont été testés à une gamme de concentrations de 10 à 2000 μ g/ml et les résultats obtenus ont été comparés aux témoins eau distillée et H₂O₂ (8mM). Les pourcentages respectifs sont représentés dans les figures 11A et 11B :

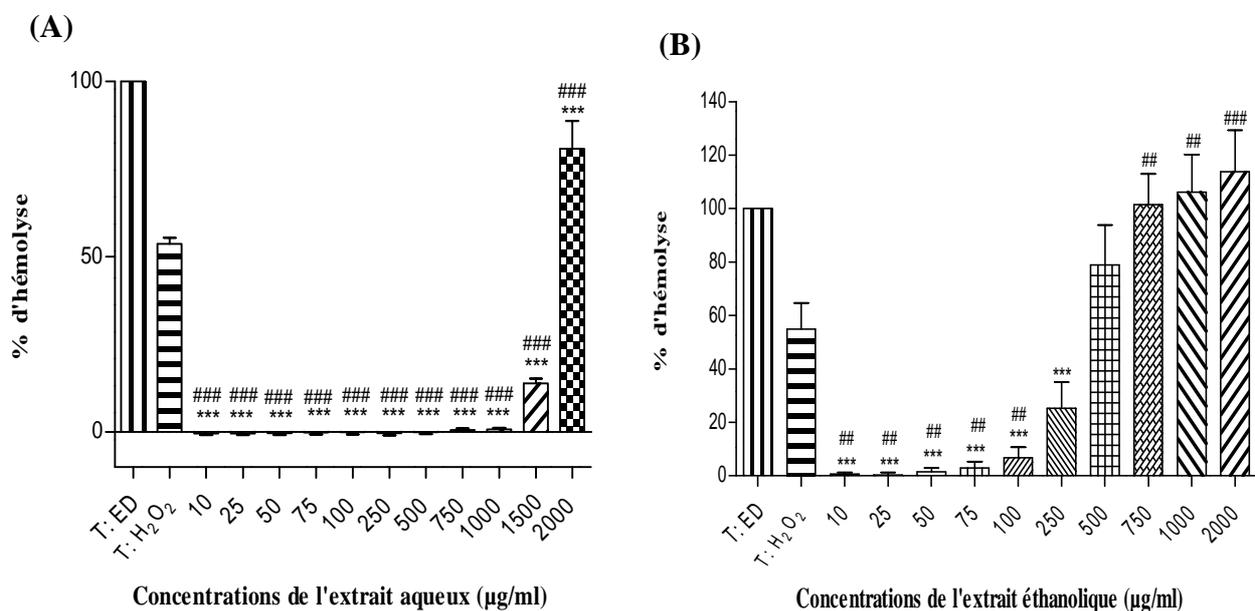


Figure 11 : Taux de l'hémolyse induite par différentes concentrations des deux extraits de samares de *F.angustifolia*. Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M. (n=4) et considérée significative à ***P<0,001 par rapport au T: E.D. et ####P<0,001 par rapport au T: H₂O₂ par le test ANOVA *one way* avec Tukey's post test.

Selon cette figure, on constate que pour l'extrait aqueux à des concentrations de 10-1000 μ g/ml aucune hémolyse significative n'a été observée, en effet les hémolyses obtenues sont significativement faibles (***,####P<0,001) comparées aux hémolyses induites par l'eau distillée et le H₂O₂. Cette hémolyse est faible également à 1500 μ g/ml (13,90%), puis dépasse significativement l'hémolyse induite par le H₂O₂ (8mM) à 2000 μ g/ml (80,79%). Par contre, pour l'extrait éthanolique, on remarque un pourcentage d'hémolyse significativement faible ne dépassant pas 6,83% à des concentrations \leq 100 μ g/ml, alors que celui-ci commence à augmenter à partir de 250 μ g/ml et atteint un seuil à 2000 μ g/ml qui est plus élevé par rapport à

l'hémolyse induite par T: H₂O₂ (8mM) et comparable à celui du T E.D. Ceci a permis de déduire la gamme de concentrations à hémolyse négligeable pour chaque extrait, qui est de 10-1000µg/ml pour l'extrait aqueux et de 10-100µg/ml pour l'extrait éthanolique.

Les résultats de l'estimation de la peroxydation lipidique par dosage de MDA relatif aux traitements par les mêmes concentrations des extraits aqueux et éthanolique de samares de *F.angustifolia* sont représentés dans les figures 12A et 12B suivantes :

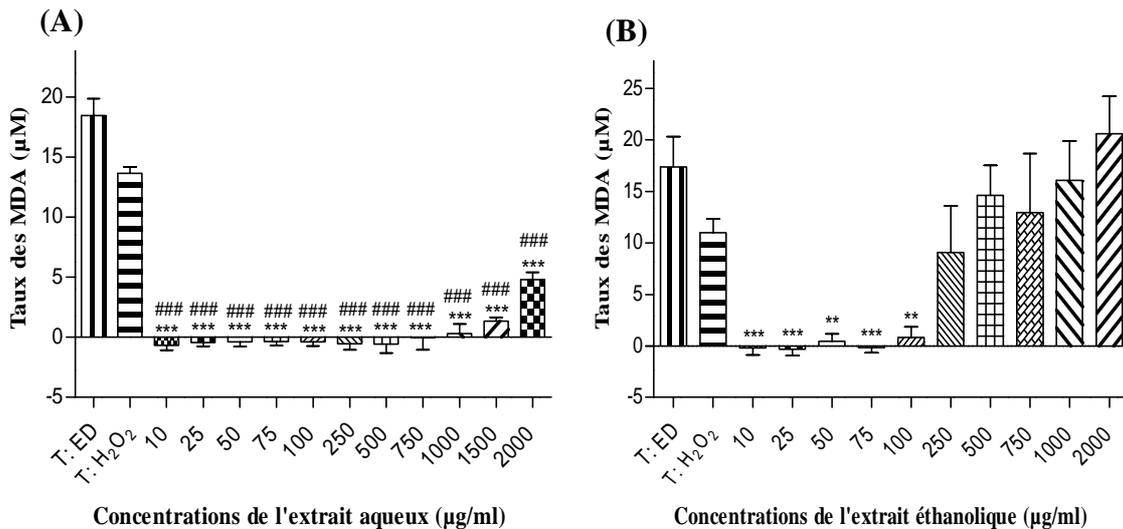


Figure 12 : Evaluation des taux de MDA issus des traitements à différentes concentrations des extraits de samares de *F.angustifolia*. Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M. (n=4). ***P<0,001 par rapport au T: E.D. et ###P<0,001 par rapport au T: H₂O₂ par le test ANOVA *one way* avec Tukey's post test.

D'après ces histogrammes, on constate que le taux des MDA formés coïncide avec les hémolyses induites en fonction des concentrations des extraits testés. En effet, l'absence d'hémolyse pour les concentrations 10-1000µg/ml pour l'extrait aqueux s'est appuyé par l'absence de teneurs considérables de MDA, ce comparativement aux témoins H₂O₂ et eau distillée. À 1500µg/ml le taux de MDA est faible (1,35µM) puis augmente considérablement à 2000µg/ml sans pour autant atteindre le taux montré par le T: H₂O₂ réalisé dans les memes conditions. De même, concernant l'extrait éthanolique, les concentrations de 10-100µg/ml indiquent l'absence de teneurs considérables en MDA, alors qu'à des concentrations de 250 à 2000µg/ml la teneur en MDA augmente de manière significative jusqu'à atteindre un seuil à 2000µg/ml (20µM), dépassant celui des deux témoins.

II.2.5. Evaluation des effets anti-hémolytiques des extraits éthanolique et aqueux de samares de *F.angustifolia* à différentes concentrations

Pour évaluer le pouvoir inhibiteur des deux extraits contre l'hémolyse induite par le H₂O₂ (8mM), les concentrations non hémolytiques, 10µg-1000µg/ml pour l'extrait aqueux et 10µg-100µg/ml pour l'extrait éthanolique, ont été testées et les résultats obtenus sont représentés dans des figures (13A et 13B) accompagnés des pourcentages d'hémolyse optimale (H₂O₂) et maximale (E.D.) :

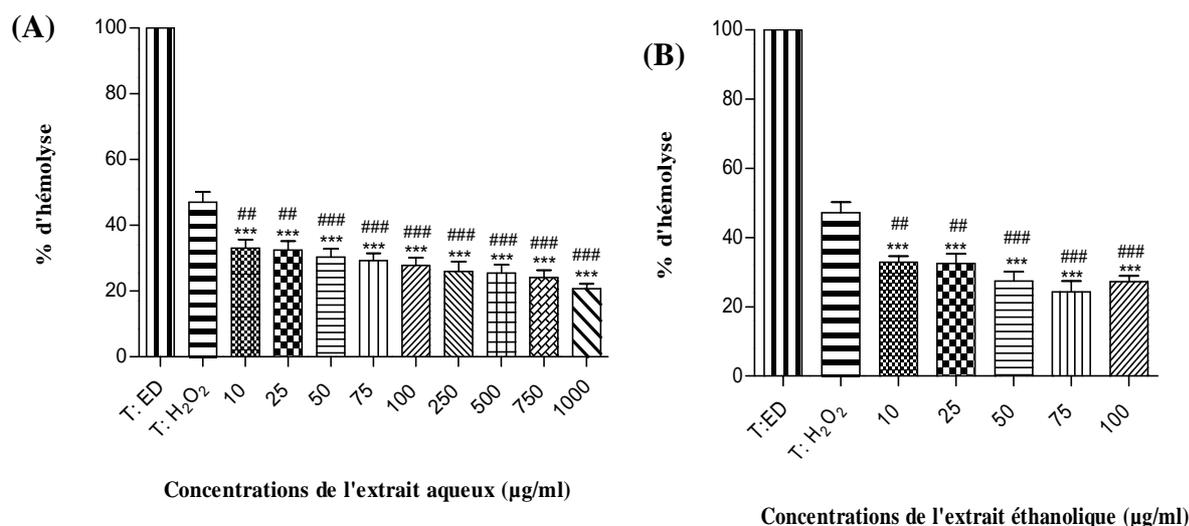


Figure 13 : Taux de l'hémolyse induite par H₂O₂ en présence des extraits de samares de *F.angustifolia* à différentes concentrations. Chaque valeur représente la moyenne ± S.E.M. (n=4). ***P<0,001 par rapport au T: E.D. et ###P<0,001 par rapport au T: H₂O₂ par le test ANOVA *one way* avec Tukey's post test.

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés relativement à l'hémolyse optimale obtenue par la concentration de 8mM de H₂O₂ et ils sont représentés dans ce tableau :

Tableau VIII : Pourcentages d'inhibition de l'hémolyse des extraits aqueux et éthanolique de samares de *F.angustifolia* à différentes concentrations.

Concentrations (µg/ml)	10	25	50	75	100	250	500	750	1000
% d'inhibition par l'extrait aqueux	29,62± 1,64	30,91± 1,67	35,65± 2,17	37,77± 2,35	40,99± 2,17	44,92± 3,78	45,94± 3,04	48,76± 2,43	55,67± 1,99
% d'inhibition par l'extrait éthanolique	29,96± 2,50	31,13± 3,18	42,09± 3,24	48,69± 4,08	41,87± 2,51	NT	NT	NT	NT

NT: Non Testé (Cytotoxique)

Selon les résultats de la figure 15 et du tableau VIII et comparativement au T: H₂O₂ (8mM), on observe une diminution significative du pourcentage d'hémolyse jusqu'à atteindre 20,78% à 1000µg/ml pour l'extrait aqueux correspondant ainsi à 55,67% d'inhibition, alors que l'extrait éthanolique abouti à 24,41% d'hémolyse à 75µg/ml, ce qui est équivalent à 48,69% d'inhibition. On déduit que le degré d'hémolyse induit par le H₂O₂ (8mM) en présence de chaque extrait dépend de la concentration de ce dernier. En effet, cette hémolyse est inversement proportionnelle à la concentration de l'extrait dans ces gammes de concentrations étudiées s'accompagnant d'une augmentation proportionnelle du pourcentage d'inhibition, reflétant ainsi un effet anti-hémolytique considérable exercé par les deux extraits de samares de *F.angustifolia*, indiquant une protection des érythrocytes par la présence des composés de ces extraits.

Les résultats de l'évaluation des taux de MDA relatifs à ces traitements sont représentés dans les figures 14A et 14B.

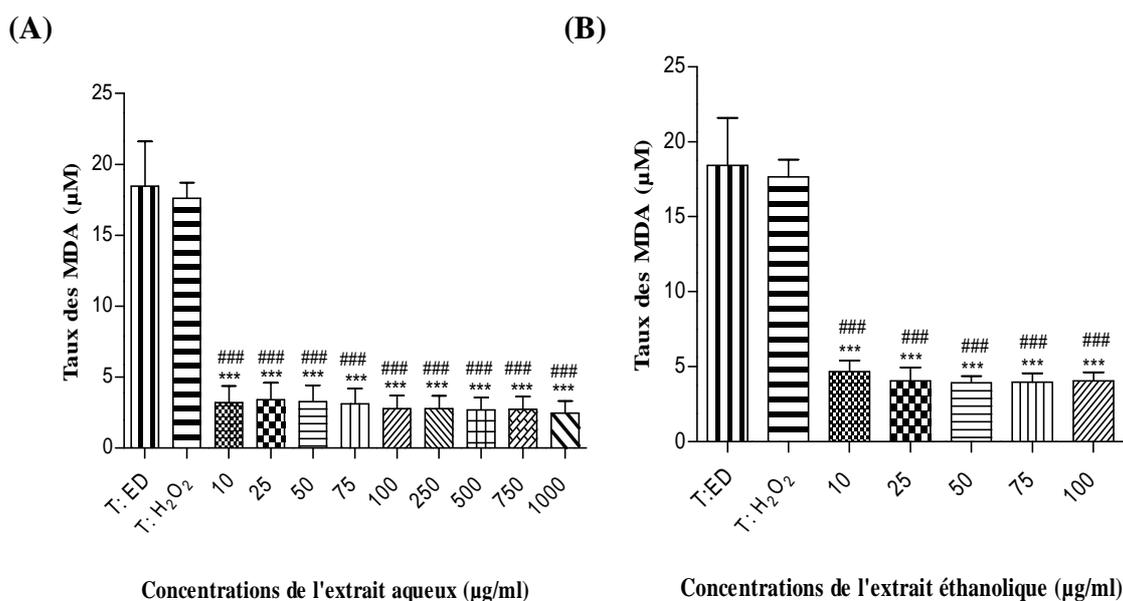


Figure 14 : Evaluation des taux des MDA formés par H₂O₂ en présence de différentes concentrations des extraits de samares de *F.angustifolia*. Chaque valeur représente la moyenne \pm S.E.M. (n=4). ***P<0,001 par rapport au T: E.D. et ###P<0,001 par rapport au T: H₂O₂ par le test ANOVA *one way* avec Tukey's post test.

Les taux des MDA ont été traduits en pourcentages d'inhibition, calculés relativement au taux de MDA obtenus par la concentration de 8mM de H₂O₂ et représentés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique par différentes concentrations des extraits aqueux et éthanolique des samares de *F.angustifolia*.

Concentrations (µg/ml)	10	25	50	75	100	250	500	750	1000
% d'inhibition par l'extrait aqueux	73,58± 3,39	72,83± 3,27	74,63± 2,6	75,07± 2,05	77,29± 1,98	76,63± 2,27	78,45± 1,17	78,95± 1,24	82,99± 3,06
% d'inhibition par l'extrait éthanolique	72,89± 4,7	76,76± 4,94	77,49± 3,97	77,03± 3,79	76,38± 4,05	NT	NT	NT	NT

NT: Non Testé (Cytotoxique)

D'après la figure 14 et le tableau ci-dessus, on observe que la teneur en MDA produits lors des traitements des érythrocytes par les deux extraits aqueux et éthanolique en présence du H₂O₂ (8mM) a diminué significativement (**p<0,001) comparé au traitement H₂O₂, ceci en fonction de la concentration de l'extrait. Cette diminution s'est traduite par un taux d'inhibition de la peroxydation lipidique important atteignant un seuil de 82,99% à 1000µg/ml pour l'extrait aqueux, alors que pour l'extrait éthanolique le pourcentage d'inhibition maximal atteint est de 77,03% à 75µg/ml, indiquant ainsi un effet anti-péroxydant important pour les deux extraits de samares de *F.angustifolia*.

III.2. Discussion

Les plantes sont des sources potentielles de composés bioactifs naturels largement étudiés pour leurs caractéristiques et leurs effets sur la santé humaine. Tel est le cas de *F.angustifolia* qui est douée de propriétés biologiques importantes y compris anti-inflammatoire et anti-oxydantes (Atmani et al., 2009). Ce travail consistait à évaluer, *in vitro*, l'activité anti-hémolytique et anti-peroxydante des extraits éthanolique et aqueux de samares de *F.angustifolia*, en utilisant un test basé sur l'inhibition de l'hémolyse induite par le H₂O₂ et de la peroxydation lipidique consécutive dans un modèle membranaire des érythrocytes humains.

Avant de procéder à l'extraction, les samares de *F.angustifolia* ont été séchées à l'air libre dans un milieu ombragé afin de minimiser la perte de composés d'intérêt et éviter la dégradation de polyphénols, car l'humidité et la teneur élevée en eau aide les activités enzymatiques ainsi que la lumière, la chaleur et l'oxygène (Tsao, 2010). De plus, le broyage des samares a été réalisé de façon à obtenir une poudre fine afin d'augmenter la surface de contact de la matrice végétale avec les solvants utilisés et l'extraction a été réalisée par épuisement pour optimiser le rendement (Bonnaillie et al., 2012). En effet, l'extraction des composés phénoliques est une étape importante dans la valorisation des principes actifs, elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent essentiellement leur bioactivités (Mahmoudi et al., 2013).

Le rendement d'extraction pour les deux extraits utilisés est différent (aqueux : 8,82% et éthanolique : 14,7%), ce qui peut être expliqué par la nature des deux solvants, en effet l'éthanol est considéré comme étant le meilleur solvant pour extraire le maximum de composés phénoliques, qu'ils soient polaires ou apolaires (Bruneton, 1999). A cela s'ajoute la nature et la proportion des composés actifs existants dans cette partie de plante étudiée. Cependant, la période et les conditions de récolte (stade de maturité du fruit), les facteurs climatiques et les techniques du prétraitement de la matière première ainsi que la méthode d'extraction peuvent aussi influencer sur le rendement. (Ghedadba et al., 2015)

Les extraits de samares de *F.angustifolia* ont fait l'objet d'une analyse quantitative des contenus phénoliques. Les résultats du dosage des polyphénols, flavonoïdes et tanins montrent qu'il y'a une différence dans les teneurs des deux extraits en fonction des solvants utilisés. En effet, le degré de polarité du solvant utilisé dans l'extraction influence sur la teneur en phénols totaux (Ghedadba et al., 2015), car la nature hydrophile des phénols (riches en groupements hydroxyles -OH) favorise leur extraction à l'aide des solvants polaires tel que

l'éthanol et l'eau. D'autre part, tous les polyphénols n'existent pas sous forme libre tel que les acides phénoliques et les lignanes dans les graines qui sont extrêmement complexes, et nécessitent l'application d'une température élevée pour les extraire (Tsao, 2010), comme dans le cas de la décoction aqueuse, par contre les flavonoïdes sont mieux extraits dans l'éthanol (Mahmoudi et al., 2013), vu que celui-ci solubilise des composés polaires mais également des substances lipophiles résiduelles (Bonnaillie et al., 2012). En ce qui concerne les tanins, en particulier les tanins condensés, leur insolubilité dans l'eau fait qu'ils soient mieux extraits dans les solvants organiques tel que l'éthanol (Reed et al., 1995 ; Cheynier, 2005), donc leur extraction dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé et des conditions opératoires (Ghedadba et al., 2015).

Avant d'entamer les tests d'activité anti-hémolytique de ces extraits obtenus, une optimisation des conditions expérimentales a été réalisée, notamment vis-à-vis des doses de H₂O₂ et la reproductibilité des résultats obtenus. Une étude du pouvoir hémolytique du peroxyde d'hydrogène a été alors réalisée à différentes concentrations, une étape indispensable pour fixer une concentration de H₂O₂ qui provoquerait une hémolyse optimale, accompagnée d'une concentration de MDA subséquente considérable pour mieux évaluer le pouvoir protecteur des extraits vis-à-vis de l'hémolyse et la peroxydation lipidique.

Le culot globulaire a été traité dans cette étude par du tampon phosphate à un pH 7,4, afin de maintenir l'isotonie dans le mélange réactionnel et assurer que toute hémolyse observée soit sous l'effet du H₂O₂. L'ajout de l'azide de sodium au tampon a pour but d'inhiber la catalase des érythrocytes et d'augmenter l'efficacité oxydante du H₂O₂ et améliorer la reproductibilité de l'étude (Sawas et Pentyala, 2004).

Les globules rouges sont exposés aux dommages oxydatifs en raison de leur fonction de porteurs d'oxygène, leur richesse en AGPI et leur teneur en fer (Tedesco et al., 2000). Le peroxyde d'hydrogène, utilisé dans cette étude pour induire les dommages oxydatifs sur les érythrocytes, est l'une des espèces réactives de l'oxygène les plus importantes, connu pour sa grande capacité à traverser les membranes biologiques (Okoko et Ere, 2012). L'hémolyse observée à des concentrations d'H₂O₂ entre 4 et 20 mM, résulte de la destruction de la membrane suite à la peroxydation lipidique des AGPI présents dans celle-ci (Sawas et Pentyala, 2004). Le H₂O₂ entraîne des changements morphologiques de la cellule érythrocytaire d'une forme discoïde à une forme échinocyte (Singh et rajini, 2008). Lorsque le H₂O₂ traverse cette membrane, il agit avec le contenu intracellulaire en oxydant

l'hémoglobine (H-Hb-Fe(II)⁺=O) en hémoglobine de ferryl (H-Hb-Fe(IV)=O), ce dernier réagit à son tour avec l'hémoglobine restant pour former la méthémoglobine (H-Hb-Fe(III)⁺), qui interagit simultanément avec le peroxyde d'hydrogène aboutissant à la formation des radicaux ferryl de l'hémoglobine (H-Hb-Fe(IV)=O) qui sont très réactifs (Masuoka *et al.*, 2006).

Par ailleurs, le H₂O₂ peut causer la dégradation de l'hème de l'hémoglobine libérant ainsi les ions Fe²⁺, ce qui génère le radical hydroxyle (très réactif) par la réaction de Fenton (Okoko *et Ere*, 2012). Ces deux radicaux induisent une chaîne de peroxydation lipidique aboutissant à la lyse des érythrocytes (Singh *et rajini*, 2008). Par contre, à de fortes concentrations (au-delà de 40 mM) le pourcentage d'hémolyse diminue, ce qui peut être lié à l'insolubilité de l'hémoglobine suite à sa polymérisation et à l'agrégation des érythrocytes (Masuoka *et al.*, 2006).

L'un des marqueurs majeurs résultant de la peroxydation des membranes biologiques, un aldéhyde réactif, le malondialdéhyde. Il est largement utilisé pour l'estimation des dommages causés par les EROs (Siddique *et al.*, 2012). La méthode utilisée pour évaluer la production de MDA dans cette étude est le dosage à l'acide thiobarbiturique (TBARS), qui repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules de TBA, d'un pigment rose absorbant à 532nm. Cependant, la réaction colorée mesure non seulement le MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques mais aussi le MDA formé par décomposition thermique des peroxydes et ceux générés au cours de la réaction, les produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance, soit à du MDA, soit à des molécules réagissant avec le TBA en milieu acide et à chaud (Lefèvre *et al.*, 1998). D'après les résultats, il a été démontré que la libération de MDA des GR traités au H₂O₂ dépend de la concentration de ce dernier, ceci est en accord avec l'étude de Sawas *et Pentyala* (2004).

Avant de procéder à l'étude anti-hémolytique, une évaluation de l'effet des extraits éthanolique et aqueux des samares de *F.angustifolia* sur les GR était nécessaire. Plusieurs études ont prouvé que certains des composés phénoliques, notamment les flavonoïdes possèderaient des propriétés anti-radicalaires mais aussi cytotoxiques dépendant de leur concentration (Bouchet *et al.*, 1998 ; Fiot *et al.*, 2006), de leurs glycosylation et de leurs degré de méthylation (Kouamé *et al.*, 2009).

Suite aux observations, il a été constaté que l'extrait éthanolique (100-1500µg/ml) de samares de *F.angustifolia* présente un effet hémolytique sur les érythrocytes, chose qui n'a pas été observé avec l'extrait aqueux aux mêmes concentrations testées. Sachant que ces deux extraits contiennent des flavonoïdes à des proportions différentes, on suppose que la structure des flavonoïdes présents dans l'extrait éthanolique soit liée a cet effet hémolytique par rapport à ceux présents dans l'extrait aqueux. En effet, [Kostova et Iossifova \(2007\)](#) avaient identifié les flavones dans le genre Fraxinus et [Kouamé et al. \(2009\)](#) ont prouvé que les flavones polyméthoxylés non glycosylés montrent une forte toxicité en fonction de leur concentration, vis-à-vis des cellules humaines. Or, cette cytotoxicité remarquée pourrait être expliquée par le fait que les composés toxiques de l'extrait éthanolique ont été hydrolysés sous l'effet du traitement par la chaleur lors de l'extraction aqueuse. Par ailleurs, à de fortes concentrations les polyphénols peuvent avoir un effet pro-oxydant favorisant ainsi une lipoperoxydation ([Cao et al., 1997](#)) qui sera responsable de cette hémolyse observée.

L'hémolyse oxydative *in vitro* des érythrocytes humains a été utilisée comme modèle pour étudier l'effet protecteur des extraits de samares de *F.angustifolia* contre l'hémolyse et la peroxydation lipidique induites par H₂O₂.

Le pouvoir anti-hémolytique des extraits éthanolique et aqueux des samares de *F.angustifolia* est modérée alors que l'effet anti-péroxydant est important. Une étude antérieure réalisée par [Atmani et al. \(2009\)](#) sur la même espèce a démontré que celle ci a une capacité antioxydante potentielle avec des activités de neutralisation du H₂O₂ et inhibitrice de la peroxydation lipidique. Cet effet a été attribué aux métabolites secondaires présents dans ces extraits, tels que les flavonoïdes et les phénols qui sont les groupes les plus importants de composés bioactifs ayant de larges activités pharmacologiques ([Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011](#)).

Les polyphénols sont des antioxydants ou des co-antioxydants puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres et les piéger dans les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Ils sont considérés comme disjoncteurs de chaîne par don d'électron ou d'un atome d'hydrogène à l'espèce réactive devenant ainsi eux mêmes des radicaux stables et moins réactifs ([Tsao, 2010](#)). Cette stabilité est liée au degré d'hydroxylation de ces composés responsables de la délocalisation d'électron ([Hatia et al., 2014](#)).

De plus, les polyphénols sont connus comme chélateurs de métaux de transitions tels que Fe^{2+} , réduisant directement la vitesse de réaction de Fenton et empêchant l'oxydation causée par le radical hydroxyle (Tsao, 2010).

La première cible d'interaction des polyphénols avec les cellules vivantes serait leurs membranes. L'effet montré par les extraits dans cette étude peut être lié à la capacité des polyphénols à s'incorporer dans la membrane érythrocytaire mais également à diffuser à l'intérieur de celle-ci, fournissant ainsi une protection des dommages oxydatifs (Alvarez-saurez et al., 2012). Des études antérieures, ont prouvé que certains polyphénols peuvent interagir avec la membrane érythrocytaire diminuant ainsi la diffusion des radicaux libres dans celle-ci (Chaudhuri et al., 2007 ; Suwalsky et al., 2007 ; Singh et Rajini, 2008). Le caractère lipophile de certains de ces composés leur assure une bonne incorporation avec la membrane lipidique d'où leur capacité protectrice vis-à-vis de la peroxydation lipidique (Ugartondo et al., 2009). Néanmoins, malgré le caractère hydrophile de certains composés, ceux-ci peuvent s'insérer profondément dans le core hydrophobe de la membrane (Liu et al., 2003 ; Funes et al., 2010)

Furlan et al. (2014) ont étudié l'efficacité antioxydante des tanins du vin rouge sur un modèle membranaire contenant des phospholipides doubles insaturés. Ils ont ainsi trouvée une bonne corrélation entre l'activité antioxydante et la localisation de ces tannins à l'interface de la membrane, inséré au niveau du squelette glycérol, une position clé pour prévenir les chaînes d'oxydation qui puissent se produire dans la bicouche lipidique. Vu la détermination d'une teneur considérable en tannins pour les deux extraits utilisés dans cette étude, on suggère alors que ces composés sont aussi responsables de l'effet préventif constaté et donc l'efficacité antioxydante des polyphénols ne peut pas être liée uniquement à leur activité scavenging de radicaux attribué à leurs fonctions hydroxyles, mais aussi à leur capacité de former une couche protectrice au niveau de la surface membranaire.

Selon Kostova et Iossifova (2007), le genre *Fraxinus* est caractérisé par la présence de flavonols tel que la quercétine et le kaémferol, de la rutine, de phenyletharoides tel que varbascoside et calcéolarioside et de coumarines tel que l'esculetine et de secoiridoides tel que l'oleuropeine. D'après des études antérieures, il a été démontré par Ugartondo et al. (2009) que les flavanols empêchent le passage de H_2O_2 à travers la membrane érythrocytaire et la génération des radicaux. En effet, la quercétine a montré un effet protecteur vis-à-vis des GR humains et animaux contre les dommages hémolytique *in vitro* (Hapner et al., 2010), elle

permet alors la conservation de l'intégrité de la membrane érythrocytaire par interaction avec les lipides membranaires (Hatia *et al.*, 2014). D'après Liu *et al.* (2003) ; Funes *et al.* (2010), la quercétine et le kaempferol interagissent principalement avec les groupements polaires des régions têtes de la bicouche lipidique. Elles ont donc prouvé une bonne activité anti-péroxydante lors d'une étude réalisée par Asgary *et al.* (2005), qui a également prouvé que la rutine a une activité anti-hémolytique, cette caractéristique lui permet d'empêcher l'oxydation de l'hémoglobine et sa conversion en méthémoglobine, un effet lié à sa capacité à chélater les ions de fer (Kostyuk *et Potapovich.*, 1998).

Par ailleurs, les verbascosides et calceolarioside, ainsi que l'esculetine sont des composés rapportés pour leurs activités antioxydantes (Jimenez *et Rigüena*, 1994 ; Cai, 2006), ce qui est le cas du secoiridoïde, oleuropeine, pour lequel Galiano *et Villalain* (2015) ont constaté une localisation superficielle protectrice des membranes cellulaires.

Au final, on suggère donc que l'effet préventif des dommages érythrocytaires induits par le H₂O₂ est attribué à la capacité des composés phénoliques présents dans les extraits de samares de *F.angustifolia* à s'incorporer dans la membrane érythrocytaire, gênant ainsi la diffusion du H₂O₂ ou par leur piégeage des radicaux et chélation des ions de fer. Cependant, l'activité biologique des composés phénoliques pourrait être étroitement liée à leur structure qui serait en faveur de ces interactions avec la membrane érythrocytaire, l'hémoglobine et tout autre constituant de l'érythrocyte.

Conclusion et perspectives

Le monde végétal reste toujours une source importante de principes actifs dotés de diverses propriétés thérapeutiques. Le vif intérêt que suscite l'utilisation de *F.angustifolia* en médecine traditionnelle et en recherche biologique, a alimenté cette idée à explorer l'effet des extraits de samares de cette espèce sur l'hémolyse oxydative et la peroxydation lipidique induite par le H₂O₂.

A l'issue de l'extraction des composés phénoliques, il en ressort que les taux les plus élevés en polyphénols sont obtenus dans l'extrait organique. Les dosages des phénols totaux, flavonoïdes et tanins ont fait preuve de différence entre les deux extraits choisis, dont le plus riche en flavonoïdes et tanins est l'extrait éthanolique, alors que l'extrait aqueux a présenté la plus grande teneur en phénols totaux.

L'analyse de l'effet hémolytique de l'agent H₂O₂ a induit une hémolyse maximale entre 4-12 mM, alors que son effet lipoperoxydant était dose-dépendant.

L'étude toxicologique des deux extraits de samares de *F.angustifolia* sur le modèle érythrocytaire humain indique un pouvoir hémolytique et peroxydant majeur pour l'extrait éthanolique avec une marge thérapeutique étroite (10-100µg/ml) par rapport à l'extrait aqueux ayant une marge plus étendue (10-1000µg/ml).

Afin de compléter le travail, l'évaluation du pouvoir anti-hémolytique et anti-peroxydant des extraits étudiés, dans les marges thérapeutiques déduites, a rapporté que pour l'extrait éthanolique, l'effet inhibiteur majeur de l'hémolyse et la lipoperoxydation induite par le H₂O₂ à 8mM était atteint à 75µg/ml avec des pourcentages de 48,69±4,08% et 77,03±3,79%, respectivement, comparables à l'extrait aqueux qui a donné à la même concentration 37,77±2,35% et 76,38±4,05%, respectivement. Ce dernier a aussi fait preuve d'un effet inhibiteur à une concentration plus élevée 1000µg/ml avec des valeurs de 55,67±1,99% et 82,99±3,06%.

En référence à l'ensemble de ces résultats, il a été constaté que les extraits éthanolique et aqueux de samares de *F.angustifolia* constituent une source considérable de composés actifs dotés d'une importante activité anti-peroxydante et d'une activité anti-hémolytique modérée, *in vitro*.

Conclusion et perspectives

En perspectives, Il serait donc intéressant d'approfondir cette étude qui n'est qu'un premier pas dans la recherche des molécules biologiques actives de ce fruit par l'isolement de la fraction active responsable de cette activité biologique, sa caractérisation et la détermination du mécanisme moléculaire d'action, y compris les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.

En outre, il serait judicieux d'élargir le panel de ces tests par l'optimisation des cinétiques d'action anti-hémolytique en fonction du temps de pré-incubation avec les extraits, ainsi que l'étude de leur toxicité *in vivo*.

Références bibliographiques

A

Acar, N and Lecerf, J.F. (2007). Peroxydation *in vivo* et *in vitro* des acides gras polyinsaturés. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42 : 260-265.

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P and Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôles dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74: 636-643.

Ajila, C.M and Prasada-Rao, U.J.S. (2008). Protection against hydrogen peroxide induced oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 303–309.

Akyol, O., Isci, N., Temel, I., Ozgocmen, S., Uz, E., Murat, M and Buyukberber, S. (2001). Relations entre les enzymes anti-oxydantes plasmatiques et érythrocytaires et la peroxydation des lipides chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. *Revue du rhumatisme*, 68(7): 601-608

Albano, E., Bellomo, G., Parola, M., Carini, R and Dianzani M.U. (1991). Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 310-316.

Alvarez-Suarez, J .M., Giampieri, F., Gonzalez-Paramas, A.M., Damiani, E., Astolfi, P., Martinez-Sanchez, G., Bompadre, S., L. Quiles, J Santos-Buelga, C and Battino, M. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 1508–1516.

Amiot, M.J., Rillet, C and Landrier, J.F. (2009). Polyphénols et syndrome métabolique. *Medecine des maladies metabolique*, 3(5): 476-482. Asgary, S., Naderi, G.H et Askari, N. (2005). Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Experimental clinical cardiology*, 10(2): 88–90.

Atmani, D., Chafer, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N and Atmani D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*. 112: 303–309.

Auger, C., Schini-Kerth, V.B. (2014). Potentiel des polyphénols à améliorer la protection vasculaire en stimulant la fonction endothéliale. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 49(4): 160-172.

Ayouni, K., Berboucha-Rahmani, M., Kim, H.K., Atmani, D., Verpoorte, R and Choi, Y.H. (2016). Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 88: 65-77.

B

- Baba-Aissa, F. (1999). Encyclopédie des Plantes Utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, Substances Végétales d'Afrique d'Orient et d'Occident. EDAS, Librairie Moderne, Rouiba, 368.
- Baba-Aissa, F., 2011. Encyclopédie des Plantes Utiles. El-Maarifa, Alger. P : 157–158.
- Banerjee, A., Kunwar, A., Mishra, B and Priyadarsini, K.I. (2008). Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chemico-Biological Interactions*, 174: 134-139.
- Beaudeau, J.L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A and Peynet, J. (2006). Le stress oxydant composition physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21: 144-150.
- Belaïch, R and Boujraf, S. (2016). Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des maladies Métaboliques*, 10(1) : 38-42.
- Bennetau-Pelissero, C. (2014). Polyphénols et voies de signalisation, données récentes. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 49(4):151-159.
- Berger, M.M. (2006). Manipulation nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20: 48-53.
- Boivin, P. (1983). Interactions moléculaires des protéines de la membrane et déformabilité érythrocytaire. *Acta médica portuguesa*, 4: 13-36.
- 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.
- Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E and Saykova, I. (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pillicules d'arachides (*Arachis Hypogaea L.*). *Revue de génie industriel*, 7: 35-45.
- Bouchet, N., Barrier, L and Fauconneau, B. (1998). Radical Scavenging Activity and Antioxidant Properties of Tannins from *Guiera senegalensis* (Combretaceae). *phytotherapy research*, 12: 159–162.
- Bruneton, J. (1999). Phytochemistry, medicinal plants, pharmacognosy. 2^{ème} édition, Paris, p: 240.
- Bruneton, J. (2011). Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 4^{ème} édition, Paris, p : 307-323.

C

Cai, Y.Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q and Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Science*, 78: 2872-2888

Cao, G., Sofic, E and Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22 (5): 749–760.

Carson, P.E and Tarlov, A.R. (1962). Biochemistry of hemolysis. *Annual Review of Medicine*, 13:105-126.

Caudullo, G and Houston-Durrant, T. (2016). *Fraxinus angustifolia* in Europe: distribution, habitat, usage and threats, *European Atlas of Forest Tree Species*, p: 97.

Cazzola, R., Volpe, S.R., Cervato, G and Cestaro, B. (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *European journal of clinical investigation*, 33: 224-930.

Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B and K. Sengupta, P. (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41: 42–4.

Cheyrier, V. (2005). Polyphénols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 223-229.

Choquet, S and Maloum, K. (2007). Hématopoïèse: cellules circulantes. In : *Hématologie*. Nouvelle édition. Ellipses, p: 11.

Costa, R.M., Magalhães, A.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Carvalho, M and Silva, B.M. (2009). Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: A comparative study with green tea (*Camelia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology*, 47: 860-865.

D

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

Durand, D., Damon, M and Gobert, M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente: Principes généraux. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 48 : 218-224.

F

Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64 : 390-396.

Fauchet, R and Ifran, N. (1995). Hématologie: Biologie Médicale. Editions Médicales Internationales, p: 71-94.

Flourie, F., Arab, K., Rossary, A and Steghens, J.P. (2006). Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation *in vitro* initiée par le radical $\cdot\text{OH}$. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21 : 229-233.

Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C and Leverve, V. (2002). Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11: 411-420.

Funes, L., Laporta, O., Cerdán-Calero, M and Micol, V. (2010). Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163: 190–199.

Furlan, A. L., Jobin, M.L., Buchoux, S., Grelard, A., Dufourc, E. J and Gean, J. (2014). Membrane lipids protected from oxidation by red wine tannins: A proton NMR study. *Biochimie*, 107: 82-90.

J

James, O and Alewo, I.M. (2014). *In vitro* Antihemolytic Activity of *Gymnema sylvestris* Extracts Against Hydrogen Peroxide (H_2O_2) Induced Haemolysis in Human Erythrocytes. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(7): 861-869.

Jimenez, C and Riguera, R. (1994). Phenylethanoid Glycosides in Plants: Structure and Biological Activity. *Natural Product Reports*, 11(6): 591-606

Jauniaux, E and Burton, G.J. (2016). Le rôle du stress oxydant dans les pathologies placentaires de la grossesse. *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*, 45(8): 775-785

H

Haddouchi, F., Chaouch, T.M and Halla, N. (2016). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 1: 9.

Références bibliographiques

Hagerman, A.E and Butler, L.G. (1978). Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4): 809-811.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C and Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10): 628-638.

Halliwell, B and J. M. C. Gutteridge (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. Fifth Edition, Oxford University Press.

Hapner, C.D., Deuster, P and Chen, Y. (2010). Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. *Chemico-Biological Interactions*, 186: 275–279.

Hatia, S., Malaterre, A.S., Le Sage, F., Badiou-Bénéteau, A., Baret, P., Payet, B., Lefebvre d'hellencourt, F and Gonthier, M.P. (2014). Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress. *Free Radical Research*. 48(4): 387–401.

Hokayem, M., Bisbal, C., Lambert, K and Avignon, A. (2012). Quelle place pour les antioxydants dans la prévention du diabète de type 2 ? . *Médecine des maladies métaboliques*, 6(4): 327-331.

Huet, O., Duranteau, J. (2008). Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres. *Reanimation*, 17: 387-392.

G

Galiano, V and Villalaín, J. (2015). Oleuropein aglycone in lipid bilayer membranes. A molecular dynamics study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1848 : 2849–2858.

Garçon, L. (2009). Diagnostic biologique des maladies constitutionnelles de la membrane erythrocytaire. Société d'hématologie-immunologie pédiatrique (SHIP) : Pathologies constitutionnelles du globule rouge. *Elsevier Masson*, 16: 553-555.

Gardes, A.M. (2006). Stress oxydant: Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64: 365-372.

Ghasemzadeh, A and Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31): 6697-6703.

Gaudable, J and Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11: 115-20.

Ghedadba, N., Hambaba, L., Ayachi, A., Aberkane, M. C., Bousselsela, H and Oueld-Mokhtar, S. M. (2015). Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé. *Phytothérapie*, 13(2): 118–129.

Girot, R and Borner, M. (2014). Pathologies hématologiques : exploration d'une anémie. In : Pathologies maternelles et grossesse. *Elsevier Masson*, p: 293-301.

K

Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, k., Kujala, T.S and Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10): 3954-3962.

Kouamé, J., Gnoula, C., Palé, E., Bassolé, H., Guissou, I. P., Simporé, J and Nikiéma, J. B. (2009). Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis* J. F. Gmel (Combretaceae). *Science et technique*, 32(1) : 9-23

Kostova, I and Iossifova, T. (2007). Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia*, 78: 85–106

Kostyuk, V.A. and Potapovich, A.I. (1998). Antiradical and chelating effects in flavonoid protection against silica-induced cell injury. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 355(1): 43–48

L

Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol, J.P., Théron, P and Torrelles, J. (1998). Evaluation of lipid peroxidation by assaying the thiobarbituric acid-reactive substances. *Annale de biologie clinique*, 56 (3): 305-19.

Lui, M-J., Li, J-X., Guo, H-Z., Lee, K-M., Qin, L and Chan, K-M. (2003). The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. *Life Sciences*, 73: 883-892.

Liu, Z.Q and Shan, H.Y. (2006). Cholesterol, Not polyunsaturated fatty acids, is target molecule in oxidation induced by reactive oxygen species in membrane of human erythrocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 45 : 185-193.

Loustau, V., Guillaud, C., Garcon, L., Godeau, B and Michel, M. (2011). Anémie Hémolytique chez l'adulte : Principales causes et démarches diagnostique. In : Hématologie-transfusion. *La presse medicale*, 40(5) : 470-485.

M

Macheix, J-J.,Fleuriot, A and Sarni-Manchado,P. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. In:Composés phénoliques dans la plante-structure, biosynthèse, répartition et rôles. Editions TEC & DOC, Paris, p: 1-27.

Références bibliographiques

Mahmoudi, S., Khali, M and Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*). *Nature & Technologie*, (9):35-40.

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

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

Manuelle, C. (2008). Les cinq fonctions vitales du corps Humain Anatomopathologie. In: *Hématologie. Edition Lamarre*, p: 4-11.

Masuoka, N., Sugiyama, H., Ishibashi, N., Wang, D.H., Masuoka, T., Kodam, H and Nakano, T. (2006). Characterization of Acatalasemic Erythrocytes Treated with Low and High Dose Hydrogen Peroxide (hemolysis and aggregation). *The journal of biological chemistry*, 281(31): 21728–21734.

Mendes, L., De-Freitas, V., Baptista, P and Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo L*) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 2285-2291.

Musameh, M., Moezzi, N., Schauman, L.M., Meyerhoff., M.E. (2006). Glutathione Peroxidase-Based Amperometric Biosensor for the Detection of S Nitrosothiols. *Electroanalysis*, 18(21): 2043 – 2048.

N

Neve, J. (2002). Modulation de l'apport alimentaire en Antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16: 292-300.

O

Okoko, T and Ere, D. (2012). Reduction of hydrogen peroxide-induced erythrocyte damage by *Carica papaya* leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 449-453.

P

Portier, K., Kirschvink, N., Fellmann, N., Coudert, J and Lekeux, P. (2007). Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 151: 101-106.

Références bibliographiques

Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82: 513–523.

R

Rafat, A., Philip, K and Muniandy, S. (2009). Antioxidant potential and content of phenolic compounds in ethanolic extracts of selected parts of *Andrographis paniculata*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 197-202.

Ramonatxo, C.K. (2006). Oxygène, Stress oxydant et supplémentation antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et metabolism*, 20: 165-177.

Reed, J.D. (1995). Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *Journal of Animal Science*, 73 : 1516-1528.

Ré, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., L.Goff, K and Aissouni, L.H. (2005). Stress oxydatif cérébral : Les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires du glutamate ? Implication sur la survie neuronale. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation*, 24 : 502-509.

Revuelta, A.L., Jose, I., Gallego, S., Hernandez, A., Sanchez-yagüe, J and Ilanillo, M. (2006). Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chemico-biological interactions*, 161: 79–91.

Rochette, L. (2008). Stress oxydant et sepsis. *Reanimation*, 3 : 1-4.

Roussel, A.M. (2009). Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ?. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 44: 230-236.

S

Sawas, A.H and Pentylala, S.N. (2004). Evaluation of lipid peroxidation in red blood cells by monitoring the uptake of sucrose and phenol red. *Journal of applied toxicology*, 24: 223-229.

Scalbert, A., Johnson, I.T and Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Society for Clinical Nutrition*, 81: 215-217.

Siddique, Y.H., Ara, G and Afzal, M. (2012). Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *International Dose-Response Society*, 10:1–10.

Singh, N., Rajini, P.S. (2008). Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 173: 97–104.

Références bibliographiques

Snyder, L.M., Fortier, N.L., Trainor, J., Jacobs, J and Leb, L. (1985). Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *The Journal of Clinical Investigation*, 76: 1971-1977.

Sundaram ,S., Anjum, S., Dwivedi, P and Rai, G.K. (2011). Antioxidant Activity and Protective effect of Banana Peel against Oxidative Hemolysis of Human Erythrocyte at Different Stages of Ripening. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164 : 1192–1206.

Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M and Villena, F. (2007). Protective effect of *Ugni molinae Turcz* against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 130–135.

T

Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G.L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L and Palumbo, R. (2000). Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11: 114-119.

Tessier, F and Marconnet, P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science et Sports*, 10: 1-13.

Therond, P. (2006). Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Française*, 64: 383-389.

Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Review Nutrients*, 2: 1231-1246.

U

Ugartondo, V., Mitjans, M; Torres, J.L and Vinardell, M.P. (2009). Biobased epicatechin conjugates protect erythrocytes and nontumoral cell lines from H₂O₂ induced oxidative stress. *Food Chemistry*, 57: 4459–4465.

V

Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M. T.D., Mazura, M and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39: 44–84.

W

Wajcman, H., Lantz, B and Girot, R. (1992). Les maladies du globule rouge. Editions INSERM, Paris, p: 31-39.

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

Watanabe, H., Kobayashi, A., Yamamoto, T., Suzuki, S., Hayashi, H and Yamazaki, N. (1990). Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. *Free radical biology & medicine*, 9: 507-514.

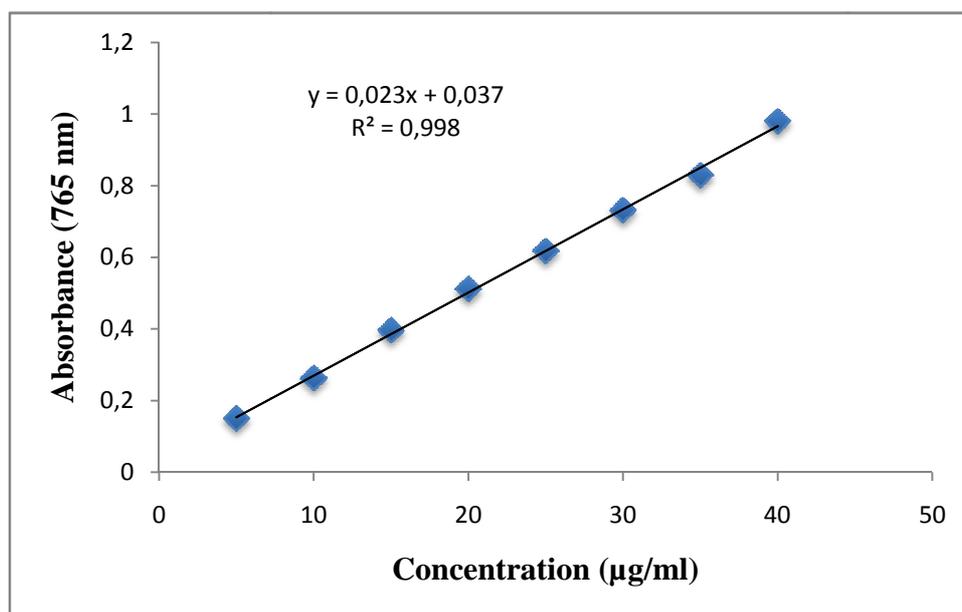
Wlodek, L and Kusior, D. (2006). Oxydative hemolysis of erythrocytes. *Biochemistry and molecular biology education*, 34(6) : 438-443.

Z

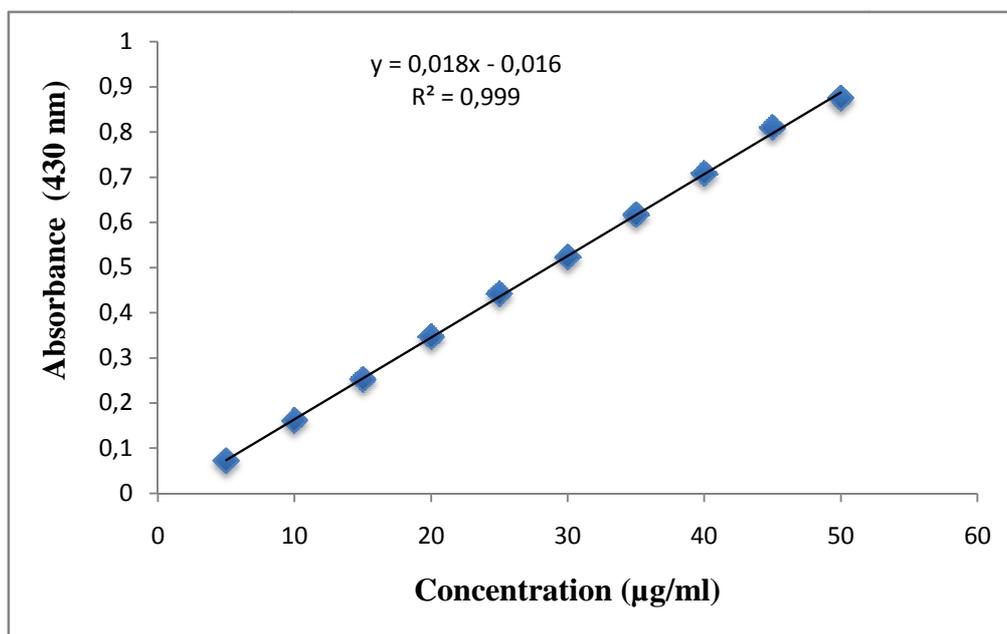
Zazzo, J.F. (2002). Stress oxydant au cours des états inflammatoires aigus et des états d'agression : Implication pour la pratique clinique. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16: 268-274.

Annexes

Annexes 01 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux réalisée par l'acide gallique.



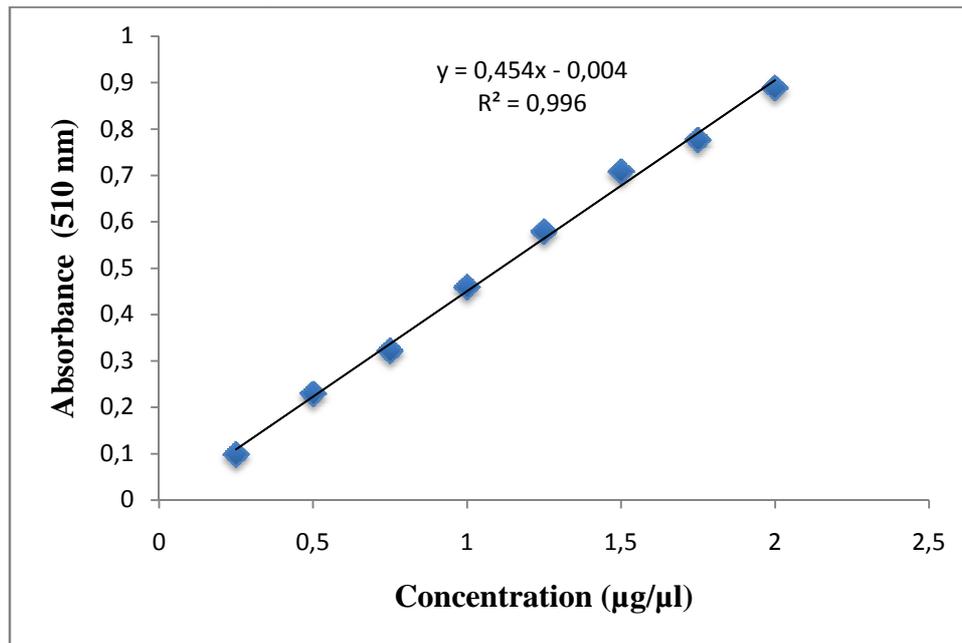
Annexes 02 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes réalisée par la rutine.



Préparation de la solution de chlorure d'aluminium (AlCl₃)

Selon le protocole de [Maksimovic et al. \(2005\)](#), 53,2 mg de chlorure d'aluminium et 160 mg d'acétate de sodium ont été dissous dans 40 ml d'eau distillée.

Annexes 03 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins réalisée par l'acide tannique.



Préparation des solutions selon le protocole de [Hagerman et Bulter \(1978\)](#)

Tampon A : La solution est préparée dans de l'eau distillée par l'ajout de l'acide acétique (0,2M) et du NaCl (0,17M), ensuite le pH est ajusté par l'addition d'hydroxyle de sodium (NaOH) jusqu'à pH=4,9.

Solution de sérum d'albumine de bovin (BSA) : Elle est préparée dans du tampon A à 1 mg/ml.

SDS/TEA : La solution est préparée par l'ajout de 20ml tri-éthanolamine (5%) et 4 g de SDS (1%) dans 400ml d'eau distillée.

FeCl₃ : 200ml de la solution ont été préparés par 1,66 ml de HCl (0,01M) et 0,32g de chlorure ferrique (0,01M), puis filtrés et laissés à 4°C.

Résumé

Fraxinus angustifolia, est une plante médicinale appartenant à la famille des Oléacées, utilisée en thérapeutique comme antioxydante et anti-inflammatoire.

Dans cette présente étude, on s'est intéressé d'une part à l'évaluation quantitative des composés phénoliques de deux extraits éthanolique et aqueux de samares de *Fraxinus angustifolia* et d'autres part à l'évaluation de leurs activités anti-hémolytique et anti-peroxydante, *in vitro*, induites par le peroxyde d'hydrogène (8mM).

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait éthanolique de samares de *Fraxinus angustifolia* est riche en composés phénoliques, notamment les flavonoïdes et les tanins avec une teneur de phénols totaux plus élevée dans l'extrait aqueux. Le pouvoir inhibiteur de l'hémolyse oxydative des deux extraits dans leur marge thérapeutique est modérée avec 48,69±4,08% à 75µg/ml pour l'extrait éthanolique et 55,67±1,99% à 1000µg/ml pour l'extrait aqueux. Pour ce qui est de l'activité anti-peroxydante, on note que les deux extraits éthanolique et aqueux ont exhibé des effets remarquables par toutes les concentrations testées avec un taux d'inhibition aux doses maximales, allant jusqu'à 77,03±3,79% et 82,99±3,06%, respectivement.

Mots clés : *Fraxinus angustifolia*, peroxyde d'hydrogène, anti-hémolytique, anti-peroxydant, composés phénoliques.

Abstract

Fraxinus angustifolia, is a medicinal plant belonging to the family of Oleaceae, used in therapeutic as antioxidant and anti-inflammatory.

In this study, we are interested on one hand in the quantitative evaluation of the phenolic content of ethanolic and aqueous extracts of *Fraxinus angustifolia* samara and on the other hand in the evaluation of their anti-haemolytic and anti-peroxidant activities, *in vitro*, in human erythrocytes model induced by hydrogen peroxide (8 mM).

The obtained results indicate that the *Fraxinus angustifolia* samara's ethanolic extract contain high level of phenolic compounds, in particular flavonoids and tannins, whereas the total phenols amount was higher in the aqueous extract. The inhibitory power of oxidative hemolysis of the two extracts in their therapeutic margin was moderate: 48,69±4,08% at 75 µg/ml for the ethanolic extract and 55.67± 1.99% at 1000 µg/ml for the aqueous one. The anti-peroxidant activity, showed that both ethanolic and aqueous extracts exhibited a remarkable effects by all tested concentrations, with an inhibition rate up to 77,03±3,79% and 82,99±3,06% at the maximal doses, respectively.

Key words: *Fraxinus angustifolia*, hydrogen peroxide, antihemolytic, anti-peroxidant, phenolics.

ملخص

نبات الدردار من النباتات الطبية التي تنتمي لعائلة Oleaceae ، مستخدمة في العلاج كمضادة للأكسدة والالتهاب. في هذه الدراسة، تم التقييم الكمي للمركبات الفينول لبذرة نبات الدردار من جهة، و تم تقييم نشاط مستخلصي الإيثانولي و المائي لهذا النبات ضد انحلال الدم و أكسدة الدهون التي سببت بماء الأوكسجيني (8 مل مول) من جهة أخرى. النتائج المتحصل عليها تبين أن مستخلص الإيثانول غني بمركبات الفينول بما في ذلك مركبات الفلافونويد و العفص بينما مستخلص الماء يحتوي أكثر على الفينولات. القدرة المثبطة لأكسدة الكريات الحمراء للمستخلصين اللذان تم دراستهما حسب الجرعات المحددة قدرت بمتوسطة بنسبة تقدر ب48,69±4,08% عند 75مكغ/مل لمستخلص الإيثانول و بنسبة قدرت ب 1,99±55,67% عند 1000 مكغ /مل لمستخلص الماء. أما بالنسبة لفعاليتهما كمضاد لأكسدة الدهون فقد قدرت بالنسبة لكلا المستخلصين الإيثانولي و المائي بجد معتبرة لكل الجرعات المختبرة حيث تصل عند الجرعات القصوى إلى 77,03±3,79% و 82,99±3,06% على الترتيب.

الكلمات المفتاحية : نبات الدردار، ماء أوكسجيني، مضاد الإنحلال الدموي، مضاد لأكسدة الدهون، مركبات الفينول.