

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

Université Abderahmane Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En biologie

Option : biologie moléculaire

Thème

*Caractérisation de l'activité antioxydante des extraits de
Pistacia lentiscus et Fraxinus angustifolia*

Préparé par :

Mr Boukerouis Djoudi

Membres du jury :

M^{lle} Louaïleche H.

Professeur (UAMB), Présidente

M^r Atmani D.

Maître de conférence (UAMB),

Rapporteur

M^r Iguerouada M.

Maître de conférence (UAMB),

Examineur M^r Tamendjari AR.

Maître de conférence

(UAMB), Examineur

Année 2007/2008

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude envers tous ceux qui m'ont aidé et soutenu tout au long de la réalisation de ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères d'abord à mon promoteur; Docteur Atmani D, pour m'avoir ouvert les portes de la recherche et l'encadrement continu qu'il m'a assuré lors de la réalisation de cette étude. Je lui suis très reconnaissant pour, ses conseils, sa disponibilité, sa patience et surtout son sérieux dans le travail. Je saisi aussi l'occasion, pour lui exprimer ma reconnaissance et ma gratitude en tant que mon enseignant de la graduation, de la poste graduation, et responsable de la poste graduation.

Toutes mes expressions de respect au Professeur M^{lle} Louaïleche H, qui ma fait honneur par sa présence en qualité de présidente du jury.

Mes sincères considérations vont également à monsieur le Docteur Iguerouada. M et monsieur le Docteur Tamendjari. AR qui ont accepté d'examiner ce travail et consacré de leur temps pour son évaluation.

Comme je suis très reconnaissant à tous les membres de l'équipe de laboratoire, leur qualités humaine et scientifique m'ont été indispensables pour mener à bien ce travail commençant par M^{me} Atmani D, M^{me} Debbache N, M^{lle} Boudaoud H, M^{lle} Ayouni K, M^{lle} Berboucha M, M^{lle} Lounis H et M^{lle} Chaher N. M^{me} Arkoub S. et M^{lle} Tahiri O. Sans leurs aides ce travail ne serait pas ce qu'il est. Toutes mes salutations à tous mes collègues de la post graduation.

Mes remerciements vont aussi à mon frère Djafar et sa femme pour leur aides et encouragements, ainsi que mon ami M^r Lamriben A.

Dédicace

Ce travail est dédié :

A mon père et ma mère, pour l'éducation et le soutien moral qu'ils m'ont prodigué durant

tout mon cursus

A mes frères et soeurs

A mes neveux et nièces

A mes beaux frères

A mes belles soeurs

A mes amies et amis

Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux.



Sommaire

Sommaire

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

Synthèse bibliographique :

I-1- Espèces oxydantes, antioxydants et stress oxydant

I-1-1- Espèces oxydantes	02
I-1-1-1- Chimie et biochimie des ERON	02
I-1-1-2- Principales sources des ERON	05
I-1-1-2-1- Source mitochondriale	05
I-1-1-2-2- Xanthine oxydase	05
I-1-1-2-3- La NADPH oxydase	06
I-1-1-2-4- Nitrique oxyde synthase (NOS)	06
I-1-1-2-5- Autres sources	07
I-1-1-3- Rôles physiologiques des ERON	08
I-1-1-4- Réactivité et propagation des ERON	08
I-1-2- Défense physiologique contre les espèces oxydantes	09
I-1-2-1- Système antioxydant enzymatique	09
I-1-2-1-1- Catalase	09
I-1-2-1-2- Superoxyde dismutase (SOD)	10
I-1-2-1-3- Glutathion peroxydases et glutathion réductase	10
I-1-2-2- Système antioxydant non enzymatique	11
I-1-2-2-1- Protéines non enzymatiques	11
I-1-2-2-2- Vitamine C	11
I-1-2-2-3- Caroténoïdes	11
I-1-2-2-4- Vitamine E	11
I-1-2-2-5- Le coenzyme Q	12
I-1-3- Stress oxydant	13
I-1-3-1- Cibles moléculaires du stress oxydant	13
I-1-3-1-1- Effets sur les lipides	13
I-1-3-1-2- Effets sur les protéines	14
I-1-3-1-3- Effets sur les acides nucléiques	15
I-1-3-2- Marqueur biochimique et mise en évidence du stress oxydant	15
I-1-3-3- Stress oxydant et atteintes pathologiques	16

Synthèse bibliographique

I-2- Plantes médicinales et composés phénoliques

I-2- Les composés polyphénols	17
I-2-1- Biosynthèse des composés phénoliques	18
I-2-1-1- Voie de l'acide shikimique	18
I-2-1-2- Voie de polyacétates	18
I-2-2- Classification des composés phénoliques.....	20
I-2-2-1- Acides phénols simples	20
I-2-2-2- Flavonoides	21
I-2-2-3- Les tannins.....	24
I-2-2-3-1- Tannins hydrolysables.....	24
I-2-2-3-1- Tannins condensés ou tannins catéchiques	25
I-2-3- Propriétés des composés phénoliques.....	25
I-2-3-1- Propriétés physicochimiques.....	25
I-2-3-2- Propriétés biologiques	26
I-2-3-3- Propriétés antioxydantes	27
I-2-3-3-1- Chélation des métaux	27
I-2-3-3-2- Effet scavenger.....	28
I-2-3-3-3- Inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres	30
I-2-3-3-4- Induction de synthèse des enzymes antioxydantes	30

II- Matériel et méthodes

II-1- Préparation de la poudre végétale.....	31
II-1-1- Cueillette du matériel végétale.....	31
II-1-2- Séchage, broyage et tamisage	31
II-1-3- Préparation des extraits	31
II-2- Dosage des composés phénoliques.....	34
II-2-1- Dosage des phénols totaux	34
II-2-2- Dosage des flavonoides.....	34
II-2-3- Dosage des tannins	35

II-3- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH.....	35
II-4- Etude statistique	36
II-5- Etude chromatographique des extraits des plantes.....	36
II-5-1- Chromatographie sur couche mince.....	36
II-5-1-1- Préparation des plaques	36
II-5-1-2- Développement des plaques	37
II-5-1-3- Caractérisation post-chromatographique des plaques	37
II-5-1-3- Mise en évidence, sur CCM, de l'activité anti-radicalaire contre le DPPH	38
II-5-2- Chromatographie sur colonne	38

III- Résultats et discussions

III-1- Extraction des composés phénoliques	39
III-2- Dosage des composés phénoliques	40
III-2-1- Dosage des phénols totaux	41
III-2-2- Dosage des tannins	42
III-2-3- Dosage des flavonoides	43
III-3- Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le DPPH.....	44
III-4- Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH à différentes concentrations	48
III-5- Corrélation	52
III-5-1- Corrélation entre l'activité anti-radicalaire et les teneurs phénols totaux.....	52
III-5-2- Corrélation entre l'activité anti-radicalaire et les teneurs en flavonoides	53
III-5-3- Corrélation entre l'activité anti-radicalaire et la teneur en tannins	53
III-6- Caractérisation chromatographique de l'activité anti-radicalaire	54
III-6-1- Caractérisation de l'activité anti-radicalaire des feuilles de <i>P. lentiscus</i>	54
III-6-1-2- Caractérisation de l'activité anti-radicalaire des extraits organiques	54
III-6-1-2- Caractérisation de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux	56
III-6-2- Caractérisation de l'activité anti-radicalaire de l'écorce de <i>F. angustifolia</i>	60
III-6-3- Caractérisation de l'activité anti-radicalaire de feuilles de <i>F. angustifolia</i>	65
III-7- Etude chromatographique sur colonne des extraits des plantes.....	69
IV- Conclusion et perspectives	71
V- Références bibliographiques	74

- Annexes

Liste des abréviations

-BH4	tétrahydrobioptérine
-BSA	bovine sérum albumine
-CAT	catalase
-CCM	Chromatographie sur couche mince
-DPPH	radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
-ERN	espèces réactives de l'azote
-ERO	espèces réactives de l'oxygène
-GPx	glutathion peroxydase
-GR	glutathion réductase
-GSH	glutathion réduit
-GSSG	glutathion oxydé
-HPLC	high performance liquid chromatography
-MDA	malonaldialdéhyde
-NADPH	nicotinamide adénine dénucléotide phosphate
-NOS	oxyde nitrique synthase
-NOSI	NOS neuronales
-NOSII	NOS endothéliales
-NOSII	NOS macrophagique
-SDS	Sodium dodecyl sulfate
-SOD	superoxyde dismutase
-TNF α	Facteur de nécrose des tumeurs α

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Principales sources des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.	5
2	Model de biosynthèse de NO ^o à partir de L-arginine par les NOS.	7
3	Système antioxydant enzymatique.	10
4	Mécanisme d'activité antioxydante de la vitamine E et son effet synergique avec la vitamine C.	12
5	Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aigue ou chronique des ERO/ERN.	13
6	Effet du radical OH ^o sur la guanine.	15
7	Implication des ERON dans le dysfonctionnement tissulaire.	16
8	Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques.	19
9	Structures des composés phénoliques simples.	20
10	Structure de base des flavonoides avec la numérotation classique.	21
11	Les différentes classes de flavonoides.	23
12	Unités élémentaires des tannins hydrolysables.	24
13	Exemple de structure d'un tannin condensé	25
14	Sites de chélation des métaux par les flavonoides.	28
15	Mécanisme de l'activité scavenger des flavonoides via la fonction catéchol.	28
16	Groupes fonctionnels de l'activité anti-radicalaire des flavonoides.	29
17	Photographies de l'écorce et les feuilles de <i>F. angustifolia</i> ainsi que les feuilles de <i>P. lentiscus</i> respectivement de la gauche.	31
18	Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction.	33
19	La chromatographie sur couche mince.	37
20	Photographie représentant la chromatographie sur colonne.	38
21	Teneurs en phénols totaux des extraits de <i>P. lentiscus</i> et <i>F. angustifolia</i> .	42
22	Teneurs en tannins des extraits de <i>P. lentiscus</i> et <i>F. angustifolia</i> .	43

Suite :

Figure	Titre	Page
23	Teneurs en flavonoïdes des extraits de <i>P. lentiscus</i> et <i>F. angustifolia</i> .	44
25	Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits de feuilles de <i>P. lentiscus</i> et certains standards à 100 µg/ml.	45
26	Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits de l'écorce, de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et certains standards à 100µg/ml.	47
27	Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits organiques de feuilles de <i>P. lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations.	49
28	Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits aqueux de feuille de <i>P. lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations.	50
29	Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> et certains standards à différentes concentrations.	51
30	Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> et certains standards à différentes concentrations.	51
31	Chromatogramme des extraits organiques de feuilles de <i>P.lentiscus</i> à la lumière du jour, avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H ₂ O).	55
32	Chromatogramme des extraits organiques de feuilles de <i>P. lentiscus</i> pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H ₂ O).	56
33	Chromatogramme des extraits aqueux de feuilles de <i>P. lentiscus</i> à la lumière du jour avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H ₂ O).	57
34	Chromatogramme des extraits aqueux de feuilles de <i>P. lentiscus</i> révélés par la vanilline sulfurique avec le système (EA- AF- AAc- H ₂ O).	58
35	Chromatogramme des extraits aqueux de feuilles de <i>P. lentiscus</i> pulvérisés par la solution DPPH avec le système (EA- AF- AAc- H ₂ O).	59
36	Chromatogrammes des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> révélés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (Chlor-Méth-H ₂ O-Aac).	60
37	Chromatogrammes des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (Chlor-Méth.-H ₂ O-Aac).	61

Suite :

Figure	Titre	Page
38	Chromatogrammes des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> à la lumière du jour avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H ₂ O).	62
39	Chromatogrammes des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> révélés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H ₂ O).	63
40	Chromatogrammes des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H ₂ O).	64
41	Chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> à la lumière du jour avec le système de séparation (EA-Hex-AF).	65
42	Chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (EA-Hex-AF).	66
43	Chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> à la lumière du jour avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H ₂ O).	67
44	Chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> pulvérisés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H ₂ O).	68
45	Chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H ₂ O).	68
46	Effet scavenger contre le radical DPPH des fractions F ₁ , F ₂ , F ₃ , et F ₄ de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>F. angustifolia</i> et certains standards.	70
47	Chromatogramme de la fraction F ₄ des feuilles de <i>F. angustifolia</i> avec le système de séparation (EA- AF- AAc- Eau).	70

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
I	Exemples d'acides phénols.	21
II	Exemples des différentes classes de flavonoïdes.	22
III	Gammes d'absorption des différents composés phénoliques	26
IV	Taux de l'extraction des extraits de <i>F. angustifolia</i> et <i>P. lentiscus</i> .	40
V	Activité anti-radicalaire contre le DPPH à 100µg/ml des extraits de <i>P. lentiscus</i> , <i>F. angustifolia</i> .	47
VI	Activité anti-radicalaire contre le DPPH à 100µg/ml des standards.	48
VII	Détermination des IC ₅₀ des extraits de <i>P. lentiscus</i> et <i>F. angustifolia</i> .	52
VIII	Détermination des IC ₅₀ des standards.	52
IX	Corrélation entre l'effet anti-radicalaire et les teneurs des extraits en composés phénoliques.	53
X	Caractéristiques des chromatogrammes des extraits organiques de feuilles de <i>P. lentiscus</i> .	56
XI	Caractéristiques des chromatogrammes des extraits aqueux de feuilles de <i>P. lentiscus</i>.	59
XII	Caractéristiques des chromatogrammes des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> ⁽¹⁾.	61
XIII	Caractéristiques des chromatogrammes des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> ⁽²⁾ .	64
XIV	Caractéristiques des chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> ⁽¹⁾ .	66
XV	Caractéristiques des chromatogrammes des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> ⁽²⁾ .	69



Introduction

Introduction

Les espèces réactives oxygénées et nitrogénées (ERON) (espèces oxydantes) sont définies comme étant des molécules ayant un électron non apparié sur leur dernière orbitale, provoquant ainsi une distribution électronique instable qui leur confère une très grande réactivité. Afin de les maintenir à des concentrations physiologiques, notre organisme a développé un système antioxydant constitué de deux barrières de protection ; l'une enzymatique endogène (catalase, superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase) et l'autre non enzymatique exogène (vitamine C, vitamine E, caroténoïdes....etc.).

Cependant, dans certains cas, les capacités de ce système sont dépassées par la production incontrôlée de ces molécules, induisant ainsi un stress oxydatif, avec création d'un nouvel équilibre redox de niveau oxydant plus élevé et permanent (Beaudeau *et al.*, 2006). Dans ce cas, les molécules oxydantes exercent un effet délétère sur les constituants cellulaires (ADN, lipides, et protéines), ce qui provoque par conséquent, diverses pathologies regroupées sous le nom de pathologies oxydatives (maladies cardiovasculaires, athérosclérose....etc).

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère alors indispensable pour lutter contre ce phénomène. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel intéressant pour la découverte de nouvelles substances à caractère antioxydant, si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ces derniers sont constitués, en grande partie, des composés phénoliques tels que les acides phénols simples, les flavonoïdes et les tannins.

La reconnaissance des composés phénoliques comme des antioxydants naturels est maintenant bien acquise et est pour une part à l'origine du regain d'intérêt que l'on porte à ces composés dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. En effet, un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires ou maladies inflammatoires.

Fraxinus angustifolia et *Pistacia lentiscus*, choisies sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement de diverses pathologies à caractère inflammatoire, ont déjà démontré un potentiel antioxydant certain. Cette présente étude a pour but de caractériser le potentiel anti-radicalaire contre le radical stable, 2, 2 diphénylpicrylhydrazil (DPPH) des extraits de ces deux plantes par chromatographies sur couche mince (CCM) et sur colonne.



I- Synthèse bibliographique

*I-1-Espèces oxydantes, antioxydants
et stress oxydant*

I-1- Espèces oxydantes, antioxydants et stress oxydant

I-1-1- Espèces oxydantes

Le terme « espèces oxydantes ou pro-oxydantes » essaie de rassembler trois caractéristiques : espèce (molécule, atome ou radical) capable d'en oxyder une autre ou capable de générer une espèce réactive, de manière spontanée et relativement aspécifique (Vamecq et al., 2004). Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique.

Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron (réaction 1), soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons (réaction 2,3) à partir d'un composé non radicalaire. Ce dernier mécanisme, le plus fréquemment dans les milieux biologiques, nécessite toujours un apport énergétique par catalyse enzymatique ou non enzymatique pour son initiation (Cheeseman et Slater, 1993; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

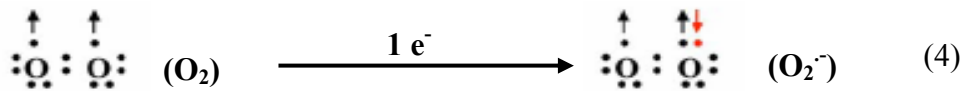


Parmi ces espèces pro-oxydantes, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN) que nous désignerons par l'abréviation ERON; occupent une place centrale dans les systèmes biologiques dont plusieurs travaux leur accordent un intérêt croissant tant sur leurs rôles pathologique que physiologique.

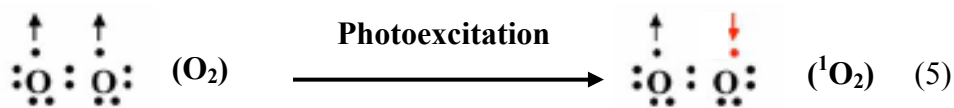
Actuellement, on emploie le terme ERO pour désigner un ensemble plus large de molécules, à savoir les ERO radicalaires qui réfèrent aux entités chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyle (HO^{\bullet}), le radical peroxyde (ROO^{\bullet}) et le radical alkoxyde (RO^{\bullet}) et les ERO non radicalaires caractérisées par l'absence d'électrons non appariés comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2) (Pasquier, 1995).

I-1-1-1- Chimie et biochimie des ERON

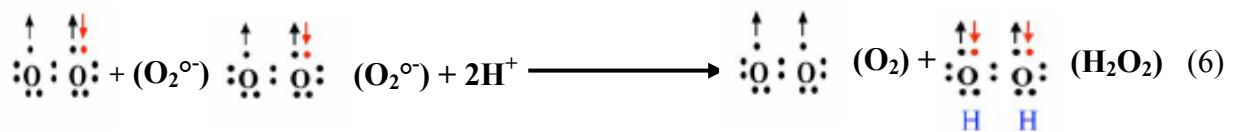
Les ERON, *in vivo*, sont produites en cascade de réactions d'oxydoréduction. Cette chaîne de réaction commence par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire sous sa forme fondamentale en superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), un radical libre chargé négativement (réaction 4) (Sies, 1993; De Leiris, 2003; Edreva, 2005). Cette étape initiale est endothermique non spontanée c'est-à-dire, nécessite un apport énergétique couplé à une catalyse enzymatique ou chimique.



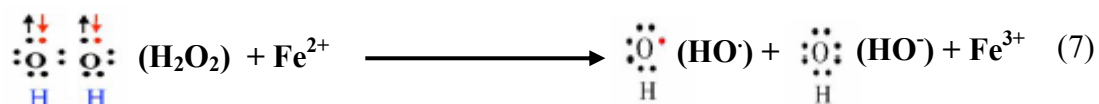
Toutefois, l'oxygène triplet peut subir une photoexcitation via plusieurs pigments biologiques (chlorophylle, porphyrine) et former ainsi l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) qui correspond à un état excité de l'oxygène moléculaire dont il se distingue par sa configuration électronique (réaction 5). L'un des électrons à spins parallèles devient antiparallèle et crée ainsi un doublet électronique pour former dès lors une molécule plus réactive et plus oxydante que l'oxygène à l'état basal (Halliwell et Gutteridge, 1984; Khan et Kasht, 1994; Edreva, 2005).



L'anion superoxyde à un pH physiologique se transforme immédiatement en peroxyde d'hydrogène (réaction 6), en subissant une dismutation, généralement sous l'effet de la superoxyde dismutase (SOD) (Halliwell et Gutteridge, 1984; Edreva, 2005).

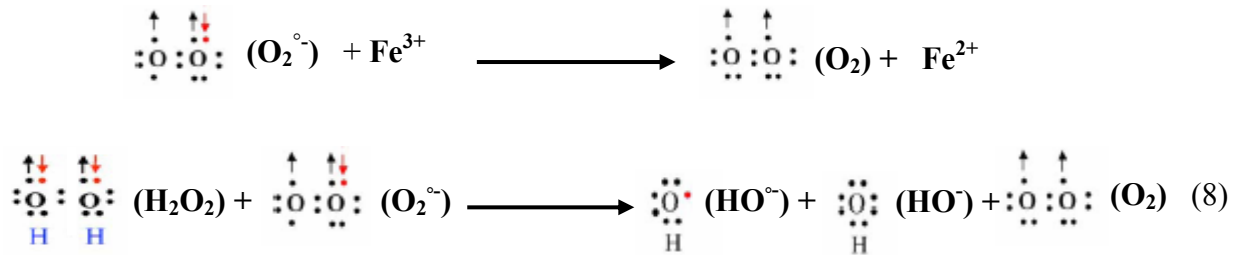


Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive non radicalaire ayant tous ses électrons périphériques appariés, plus stable que le radical superoxyde, mais c'est un redoutable précurseur de radicaux libres (Halliwell, 2000). L'absence de charge à sa surface rend cette espèce réactive très lipophile et peu réactive en milieu aqueux et la majeure partie de sa toxicité provient de sa capacité de générer le radical hydroxyle (HO^\bullet). En effet, le peroxyde d'hydrogène en présence des ions ferriques (Fe^{2+}) donne le radical hydroxyle lors de la réaction de Fenton (réaction 7) (De Leiris, J. 2003; Vamecq et *al.*, 2004; Edreva, 2005).

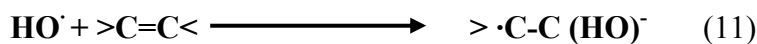
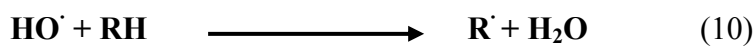


Le fer ferreux (Fe^{2+}) peut se produire à partir du fer ferrique (Fe^{3+}) par interaction avec le radical superoxyde qui est oxydé en oxygène moléculaire. La résultante de cette dernière

réaction et la réaction de Fenton est connue sous le nom de réaction de Haber Weiss (réaction 8) (Vamecq et al 2004; Edreva, 2005).



Le radical hydroxyle, le dernier produit de cette chaîne de réaction est particulièrement délétère vis-à-vis des constituants biologiques. C'est un oxydant puissant qui réagit selon trois modes d'action : soit en arrachant un électron (réaction 9), ou un atome d'hydrogène (d'un substrat organique RH) (réaction 10), soit encore en s'additionnant aux doubles liaisons (réaction 11) (Gardès-Albert et al., 2003).



En plus de ces espèces réactives directement dérivées de l'oxygène, des composés radicalaires peuvent être formés par action du radical hydroxyle sur différents composés, en particulier les lipides (Girotti, 1998). Ces radicaux (ROO° , RO°) peuvent être générés à partir des chaînes d'acide gras polyinsaturées. Les radicaux peroxy (ROO°) sont peu réactifs par rapport aux radicaux alcoxy (RO°), mais capables de diffuser à travers les membranes biologiques où ils sont à l'origine de la réaction en chaîne qui constitue le processus de base de la lipoxydation des membranes cellulaires (Goudable et Favier, 1997; Abdelghafour, 2003).

Les ERN représentées par le monoxyde nitrique (NO°) et le peroxy-nitrique (ONOO°) sont généralement désignées comme étant des médiateurs chimiques (Bérard, 1997). Le monoxyde d'azote est une molécule diatomique gazeuse non chargée sous forme de radical libre, contenant un électron non apparié sur sa dernière couche électronique. Il est synthétisé à partir de L-Arginine par les NO synthases en présence de l'oxygène et du NADPH. En biologie, l'intérêt de cet élément est focalisé sur son effet vasodilatateur (Gutteridge, 1995; Valko et al., 2007).

Le NO° en présence du O_2° aboutit à la formation de ONOO° , des augmentations relativement faibles des taux de production de ces deux éléments pourraient accroître fortement les quantités de peroxy-nitrite formé, jusqu'à des taux potentiellement cytotoxiques par son

caractère oxydant puissant, capable de détruire diverses molécules biologiques (Gutteridge, 1995; Vergely et Rochette, 2002).

I-1-1-2- Principales sources des ERON

Plusieurs sites de formation d'ERON ont été décrits, autant intracellulaires qu'extracellulaires (figure1). Divers types cellulaires et tissulaires donnent naissance à des ERON par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normal et parfois en réponse à un stimulus spécifique. Nous décrivons ici les principales sources potentielles dans notre organisme.

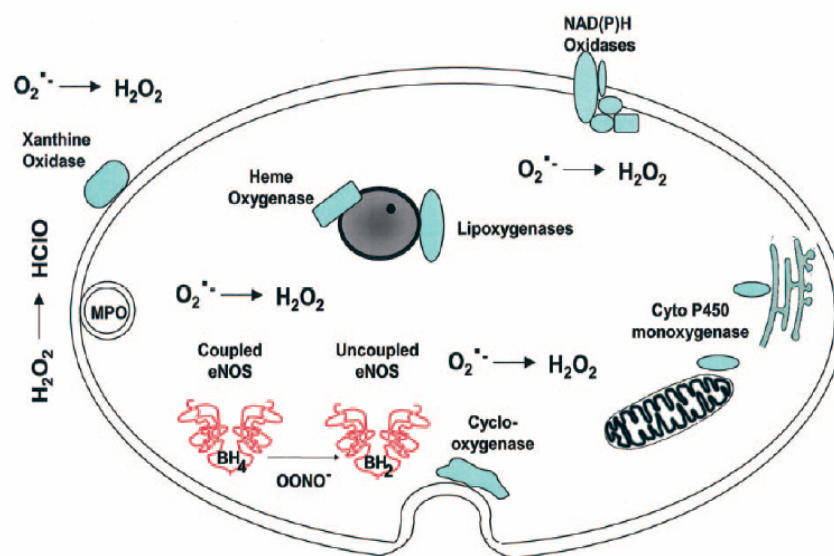


Figure 1. Principales sources des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Griendling et Fitzgerald, 2003).

I-1-1-2-1- Source mitochondriale

Dans les conditions physiologiques, la chaîne de transport d'électrons située dans la membrane interne mitochondriale est la source la plus importante de production d'ERO. Environ 2% de l'oxygène utilisé par les mitochondries est partiellement réduit en superoxyde par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire au niveau de la NADH déshydrogénase du complexe I et du site ubisemiquinone du complexe III (coenzymeQ) (Aurousseau, 2002).

I-1-1-2-2- Xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est largement distribuée dans l'organisme surtout au niveau de la partie apicale de la membrane des cellules mammaires et des cellules épithéliales intestinales. Cette enzyme est impliquée dans le métabolisme des purines. La XOR est un

complexe flavoprotéique de 300 kD constituée de deux sous unités identiques, chacune contenant quatre centres redox : molybdoptérine, FAD et de deux centres fer soufre (Fe_2S_2) (Harrison, 2006).

La XOR existe sous deux formes, la forme déshydrogénase se transforme en forme oxydase sous l'action d'une protéase Ca^{++} -dépendante, activée via une élévation du calcium intracellulaire, apparaissant au cours d'une période d'ischémie (Pasquier, 1995). De plus, au cours de l'ischémie, l'ATP intracellulaire est catabolisé en AMP et finalement en hypoxanthine qui, en présence de l'oxygène au cours de la reperfusion, est oxydée par la xanthine oxydase en xanthine puis en acide urique; cette oxydation est accompagnée d'une libération d'anion superoxyde et ces dérivés radicalaires (Phillis, 1994).

I-1-1-2-3- La NADPH oxydase

L'autre principale source enzymatique de production de l'anion superoxyde est la famille des protéines NADPH oxydases. Ces enzymes sont exprimées sous différentes isoformes et partagent un mécanisme réactionnel commun, avec une chaîne de transfert séquentiel des électrons à partir de leur substrat nicotinamide adénine dénucléotide phosphate (NADPH) jusqu'à l'oxygène passant par différents centres redox actifs et produisant ainsi l'anion superoxyde (Alyson et *al.* 2006). La NADPH oxydase phagocytaire est présente initialement dans les macrophages et les neutrophiles et intervient lors de la réponse immunitaire non spécifique en produisant les espèces oxydantes capables de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques (Babior, 2000). Son activité est souvent modulée par plusieurs facteurs intervenant dans ce processus tels que, les lipoprotéines, les lipopolysaccharides et les cytokines (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2002).

Les NADPH oxydases des cellules vasculaires constituent aussi une source importante des ERO. Ces enzymes sont exprimées dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes de l'adventice et les cellules mésangiales. Leur activité peut être régulée par de multiples facteurs dont l'angiotensine II, la thrombine, l'acide arachidonique et ses métabolites. Dans ce cas de figure, les radicaux $\text{O}_2^{\circ-}$ produits et le H_2O_2 agissent au niveau des cellules vasculaires sur les voies de signalisation «redox-sensibles» (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2002; Moldovan et *al.*, 2006).

I-1-1-2-4- Nitrique oxyde synthase (NOS)

Le NO° est synthétisé par des enzymes appelées nitrique oxyde synthase (NOS), qui consomment de l'oxygène et du NADPH pour oxyder la L-arginine en citrulline (figure 2). Les

NOS sont actives sous leur forme homodimérique en utilisant un ensemble de co-facteurs : la tétrahydrobioptérine (BH4), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et un groupement héménique (Sennequier et Valon-le Goff, 1998). En effet, il existe trois types d'isoenzymes de NOS qui diffèrent par plusieurs caractéristiques, y compris leur expression (constitutive ou inductible), leur distribution subcellulaire et leur dépendance au calcium et à la calmoduline. Les NOS neuronales (NOSI) et endothéliales (NOSII), contrairement aux NOS macrophagiques (NOSIII), sont constitutives et dépendantes de l'augmentation du calcium intracellulaire (Vergely et Rochette, 2002).

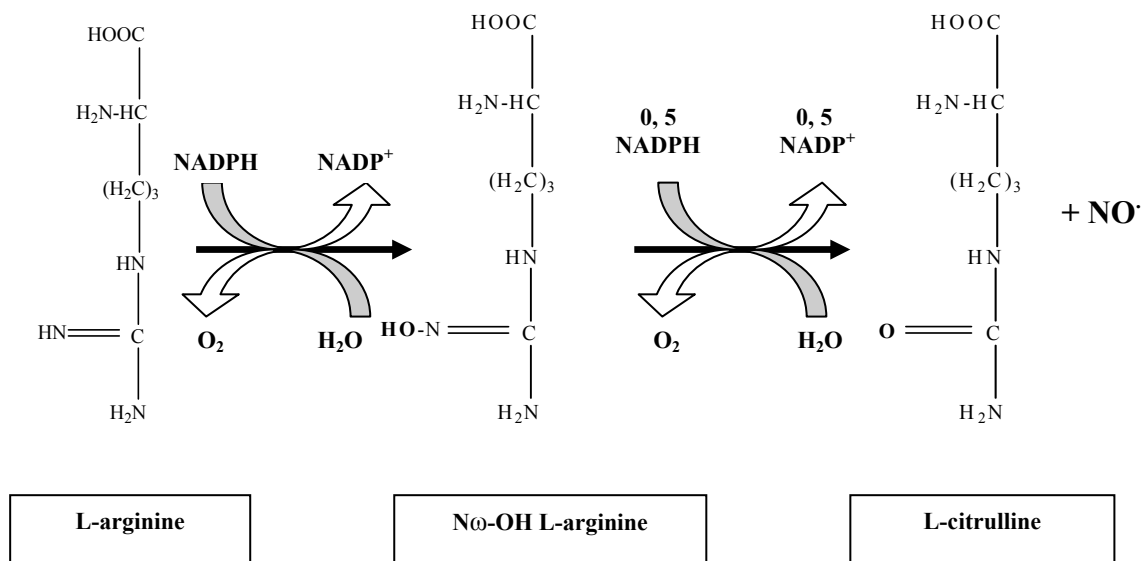


Figure 2. Biosynthèse de NO \cdot à partir de L-arginine par les NOS (Vergely et Rochette, 2002).

I-1-1-2-5- Autres sources

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent des réactions pour détoxifier les drogues liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est la P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques et produit ainsi les ERO. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments (Ames et *al.*, 1993; Favier, 2003; Servais, 2004).

Les métaux toxiques comme le chrome, le vanadium et le fer peuvent facilement céder un électron par les réactions d'oxydo-réduction et générer ainsi les radicaux hydroxyles à partir de l'espèce peu réactive H₂O₂. Les rayonnements sont capables aussi de générer des radicaux libres, soit en scindant les molécules d'eau lorsque il s'agit des rayons χ ou γ , soit en activant des

molécules photosensibles (pigments naturels) lorsque il s'agit des rayons ultraviolets qui vont, par ce mécanisme, produire l'anion superoxyde et l'oxygène singulet (Favier, 2003).

I-1-1-3- Rôles physiologiques des ERON

La découverte des ERO dans les systèmes biologiques il y'a 50 ans a considéré ces dernières seulement comme des agents destructifs de la matière vivante. Des travaux récents autour de ces molécules, lorsqu'elles sont présentes à des niveaux de production physiologiques, indiquent leur implication dans plusieurs processus biologiques comme second messenger dans diverses voies de signalisation en réponse à différents stimuli et comme agents bactéricides lors de la réponse immunitaire (Droge, 2002).

Parmi les ERON qui peuvent agir comme molécules de signalisation, le peroxyde d'hydrogène et l'oxyde nitrique semblent être les plus habiles vu leurs caractéristiques de stabilité et de réactivité modérées nécessaires pour un tel rôle (Azzi et *al.*, 2004). En effet, l'anion superoxyde et son métabolite, le peroxyde d'hydrogène, sont capables d'induire des modifications fonctionnelles de plusieurs protéines, incluant des tyrosine kinases importantes pour la croissance et la prolifération cellulaire (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2002; Griendling et Fitzgerald, 2003).

Le mécanisme par lequel le NO° agit sur ces protéines est assuré par la nitrosation des groupements thiols (SH) ou par liaisons covalentes avec des métaux de transition de leurs groupements prosthétiques. Cette nitrosylation peut aboutir à des activations ou à des inhibitions enzymatiques (Bérard, E. 1997). Ainsi, le NO° peut activer la guanylate cyclase qui aboutit à la production du GMPc, un second messenger impliqué dans plusieurs voies de signalisation notamment celle de la vasodilatation endothéliale. Par ailleurs, des canaux ioniques et certains facteurs de transcription peuvent être directement modulés par le NO° (Griendling et Fitzgerald, 2003; Lamotte et *al.*, 2006; Valko et *al.*, 2006).

I-1-1-4- Réactivité et propagation des ERON

Du fait de la présence d'un électron non apparié sur sa dernière couche électronique, le dérivé radicalaire présente donc un danger potentiel, car vu son instabilité structurale, il va réagir le plus rapidement possible avec son environnement pour se stabiliser. Ceci est obtenu soit en cédant l'électron célibataire à un autre composé (oxydation), soit en captant un (réduction). Dans tous les cas, le composé nouvellement agressé va se retrouver à son tour déstabilisé avec un électron non apparié et, ainsi, l'effet radicalaire se propage. Plus le composé est instable, plus il réagit vite et plus il est physiologiquement dangereux (Leverve, 2004).

Toutefois, cette réactivité est très variable selon la nature du radical concerné. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion superoxyde (O_2°) comme le monoxyde d'azote (NO°), ne sont pas très réactifs mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques comme la vasodilatation capillaire. Ceux sont donc des espèces dont la durée de vie est relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de secondes) et qui peuvent diffuser bien au-delà de leur lieu de production pour atteindre leur cible (Bérard, 1997; Gardès-Albert et *al.*, 2003).

Par contre des radicaux comme les radicaux peroxydes (ROO°) ou surtout le radical hydroxyle (HO°) sont extrêmement réactifs et ce avec toutes les molécules des tissus vivants. Les radicaux hydroxydes sont les plus dommageables des ERO, en raison de leur extrême réactivité qui se traduit, par conséquent, avec une demi-vie extrêmement faible (inférieure à la microseconde) et les distances qu'ils peuvent parcourir sont également très faibles. Ce sont donc des radicaux qui diffusent peu et qui réagissent quasiment sur le lieu de leur production (Khan et Kashat, 1994; Gardès-Albert et *al.*, 2003).

I-1-2- Défense physiologique contre les espèces oxydantes

L'organisme possède deux grands systèmes de défense : les systèmes enzymatique (figure 3) et non enzymatique qui fonctionnent de façon complémentaire et synergique selon une compartimentation bien précise pour protéger les cellules contre les métabolites cytotoxiques de l'oxygène. A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des co-facteurs importants pour l'activité de certaines enzymes antioxydants (Berger, 2006). Un antioxydant (AOX) est une substance qui inhibe ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, alors qu'elle est présente à une concentration très faible dans le milieu où elle intervient (Antolovich et *al.*, 2001; Pincemail et Defraigne, 2004). En donnant un électron, les antioxydants deviennent eux-mêmes des radicaux libres qui doivent se rééquilibrer, autrement dit être réduits. Ainsi, le tocophéryl résultant de l'oxydation du tocophérol dépend de l'ascorbate qui devient du dihydroascorbate, lui-même régénéré par le glutathion, qui dépend à son tour de la NADPH pour sa réduction, constituant ainsi une spirale antioxydante (Berger, 2006).

I-1-2-1- Système antioxydant enzymatique

I-1-2-1-1- Catalase

La catalase est présente dans un grand nombre de tissus mais particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. C'est une enzyme tétramérique, chaque unité portant une

molécule d'hème et une molécule NADPH. Dans les cellules de mammifères, sa principale localisation subcellulaire est le peroxysome où elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène (Coulon, 2004). L'un des rôles majeurs de la catalase est donc de diminuer la formation des radicaux hydroxyles générés par la réaction de Fenton à partir de peroxyde d'hydrogène (Goudable et Favier, 1997).

I-1-2-1-2- Superoxyde dismutase (SOD)

Ces enzymes semblent être omniprésentes dans plusieurs types cellulaires et peuvent jouer un rôle essentiel dans la lutte contre le stress oxydant. Il existe deux types de superoxydes dismutases, l'une dont le site actif contient du cuivre et du zinc (Cu, Zn-SOD) est essentiellement localisée dans le cytosol, tandis que l'autre qui contient du manganèse (Mn-SOD) est présente dans les mitochondries. Ces différentes formes agissent par le même mécanisme en convertissant le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène moins réactif (Uriu-Adams et Keen, 2005; Rahman *et al.*, 2006).

I-1-2-1-3- Glutathion peroxydase et glutathion réductase

Parmi les enzymes antioxydantes, la famille des glutathion peroxydases (GPx) est ubiquitaire : il s'agit d'un groupe de sélénoenzymes que l'on considère comme les plus importantes défenses intra- et extracellulaires contre l'oxydation. Les GPx réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (Garait, 2006).

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. Du moment que la concentration cellulaire en glutathion est limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction (Goudable et Favier., 1997; Garait, 2006).

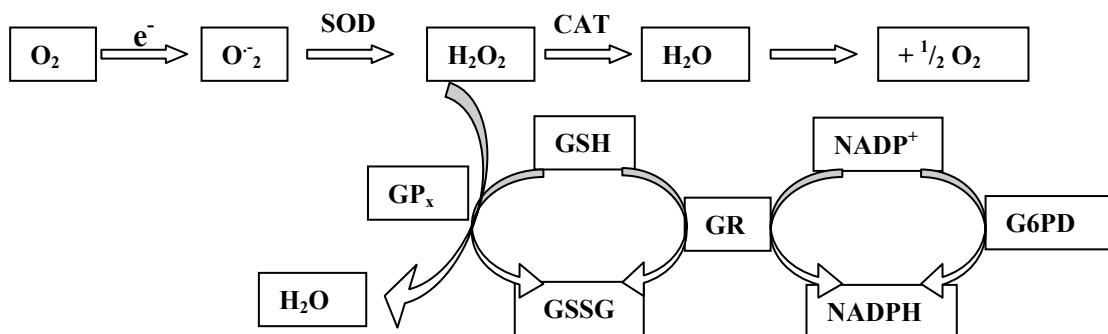


Figure 3. Système antioxydant enzymatique (Marfak, 2003).

I-1-2-2- Système antioxydant non enzymatique

I-1-2-2-1- Protéines non enzymatiques

L'organisme réagit lors d'une agression radicalaire en rendant moins accessible le fer libre, la transferrine est capable de piéger jusqu'à deux atomes de fer ferrique. Celui-ci devient incapable d'intervenir dans des mécanismes d'oxydoréductions générateurs de radicaux libres. L'albumine, une autre protéine plasmatique, joue le même rôle que la transferrine mais en captant l'ion cuivreux (Goudable et Favier., 1997; Marfak, 2003).

I-1-2-2-2- Vitamine C

La vitamine C (ou acide ascorbique), connue comme étant le principal antioxydant hydrosoluble dans les fluides biologiques est douée d'activité anti-radicalaire directe par transfert d'électron sur les radicaux libres et devient ainsi le radical ascorbyl relativement stable. Une deuxième oxydation de ce dernier produit le déshydro-L-ascorbique (DHAA) qui peut régénérer l'acide ascorbique par l'intermédiaire de l'enzyme, la DHAA réductase. De même, la vitamine C exerce un effet antioxydant synergique généralement avec la vitamine E en la régénérant après son oxydation au niveau des biomembranes (Pinnell et *al.*, 2003; Kaliora et *al.*, 2006).

I-1-2-2-3- Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments végétaux liposolubles qui contiennent deux cycles aromatiques reliés par une chaîne polyinsaturée, le niveau d'insaturation de cette dernière est à l'origine de l'activité antioxydante de ces molécules, notamment sur la neutralisation de l'oxygène singulet (1O_2), permettant ainsi d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets. Par ailleurs, les caroténoïdes peuvent interagir aussi avec les radicaux libres soit par transfert d'électron (réduction) ou bien par addition (complexation avec le radical libre) (Min et Boff, 2002; Dutta et *al.*, 2005)

I-1-2-2-4- Vitamine E

La vitamine E, α -tocophérol proprement dite, la plus importante de la famille des tocophérols (α , β , γ , δ), est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble reconnue, grâce à sa capacité d'inhiber les peroxydations lipidiques au niveau des membrane cellulaires (Cheeseman et Slater, 1993; Pincemail et *al.*, 1998).

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein de la membrane biologique riche en acides gras polyinsaturés (RH) où elle joue un rôle protecteur efficace en

empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les espèces oxygénées activées. Au cours de ces réactions, la vitamine E (TOH) passe par un stade radicalaire en devenant le radical tocophéryle (TO°). Le recyclage de ce dernier par des systèmes réducteurs dont le plus important est l'ascorbate, lui permet de jouer son rôle d'antioxydant à plusieurs reprises (figure 4) (Huang *et al.*, 2002; Min et Boff, 2002; Cuvelier *et al.*, 2003).

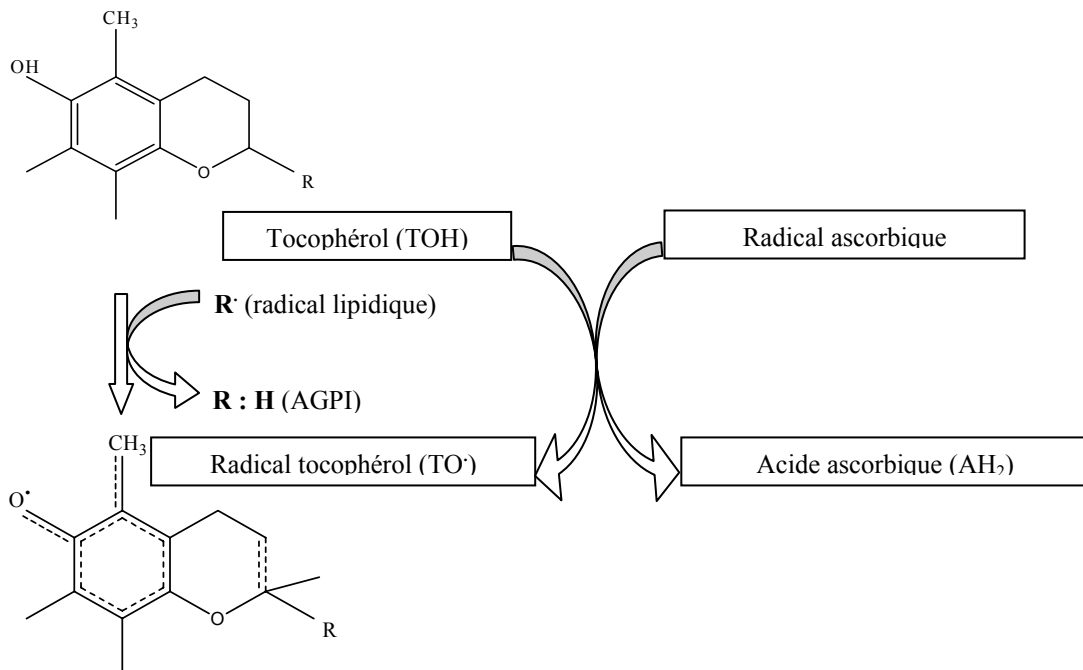


Figure 4. Mécanisme d'activité antioxydante de la vitamine E et son effet synergique avec la vitamine C (Pincemail *et al.*, 1998).

I-1-2-2-5- Le coenzyme Q

Le coenzyme Q (CoQ), appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est une molécule antioxydante qui se singularise par un comportement particulier. Il s'agit d'un dérivé benzoquinonique avec une longue chaîne latérale isoprénique qui confère à la molécule un caractère lipophile important qui lui permet de s'insérer dans toutes les membranes subcellulaires et les lipoprotéines sériques. De par son caractère lipophile, le CoQ est présent dans les membranes biologiques au même titre que l' α -tocophérol ou vitamine E, et inhibe la peroxydation lipidique en synergie avec cette dernière. Toutes ces données indiquent clairement que l' α -tocophérol et le CoQ agissent comme deux véritables alliés dont les effets contribuent à élaborer une défense antioxydante particulièrement complexe mais efficace contre la peroxydation des membranes cellulaires (Pincemail et Defraigne, 2003).

I-1-3- Stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre entre la production des espèces réactives oxygénées/nitrogénées (ERON) et les mécanismes de leur élimination (Gutteridge, 1995). En réponse à des stimuli spécifiques correspondant à divers rôles physiologiques qui impliquent les ERON, un stress oxydant de courte durée pourrait être provoqué. Ce dernier est limité immédiatement par le système antioxydant avec un retour rapide à un état redox physiologique (Halliwell et Cross, 1994; Beaudoux et *al.*, 2006).

Cependant, dans certaines situations, les ERO sont produites en quantité anormalement importante, dépassant les capacités des systèmes de protection, ce qui induit une situation d'un stress oxydatif profond, (figure 5). Dans ce cas de figure, les ERON exercent des effets délétères sur les lipides, les protéines et le matériel génétique provoquant ainsi plusieurs pathologies (Fukagawa, 1999; Beaudoux et *al.*, 2006).

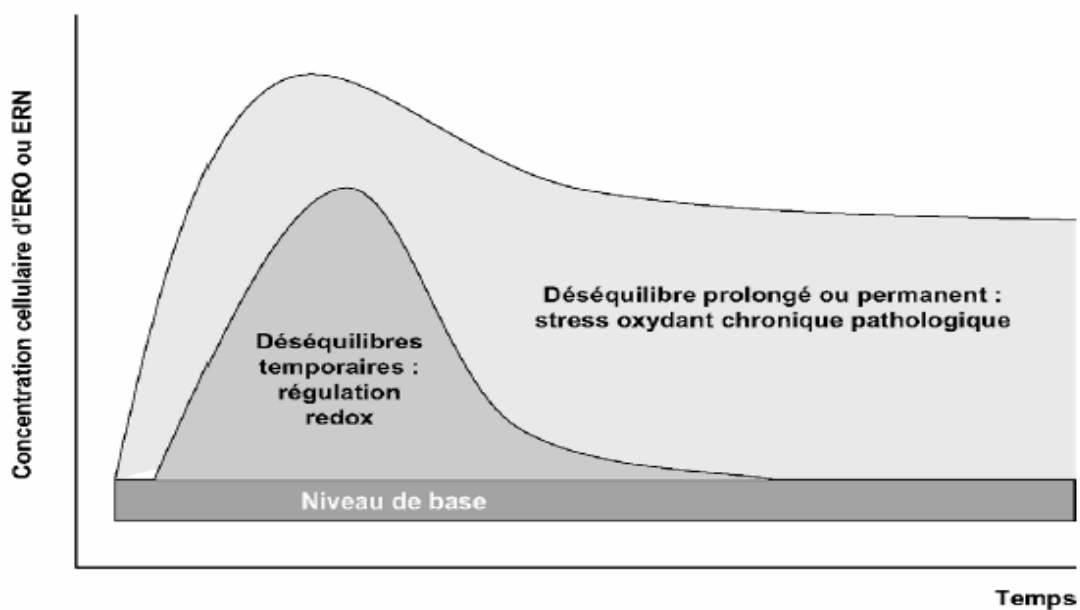


Figure 5. Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aigue ou chronique des ERO/ERN (Beaudoux et *al.*, 2006).

I-1-3-1- Cibles moléculaires des ERON

I-1-3-1-1- Effets sur les lipides

Les lipides membranaires sont la première cible des ERO lors du phénomène de la peroxydation lipidique (Flourie et *al.*, 2006). Les ERO peuvent attaquer les lipides, et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés qui sont facilement oxydables. Ceci conduit à une réaction en chaîne, qui modifie la fluidité et la perméabilité de la membrane, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, et altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de

barrière et d'information (Koechlin-Ramonatxo, 2006). La peroxydation des lipides est généralement initiée par le radical hydroxyle, l'oxygène singulet et le peroxy-nitrique selon la réaction suivante (Ré et *al.*, 2005; Girotti, 1998)



Le radical lipidique (L^\bullet , radical alkyle) formé lors de cette réaction réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxy (LOO^\bullet) capable de transformer un autre acide gras polyinsaturé en radical lipidique, propageant ainsi la réaction de peroxydation (Girotti, 1998).



L'hydroperoxyde lipidique (LOOH) formé lors de la phase de propagation de la réaction de peroxydation est relativement stable. Cependant, en présence de métaux de transition, il peut reformer de nouveaux radicaux lipidiques (LO^\bullet ou LOO^\bullet) (Ré et *al.*, 2005).

Les radicaux peroxytes issus de cette cascade de réactions peuvent subir à leur tour une cyclisation qui donne comme produit final le malondialdéhyde (MDA), une molécule mutagénique sur les cellules bactériennes et eucaryotes (Valko et *al.*, 2007). La réaction de peroxydation se termine lorsque deux radicaux lipidiques se rencontrent ou lorsque le radical lipidique interagit avec un antioxydant liposoluble tel que la vitamine E et des fois par intervention de la glutathion peroxydase (Niki et *al.*, 2005).

I-1-3-1-2- Effets sur les protéines

Les effets des ERO sur les protéines sont complexes, allant de l'oxydation du squelette protéique, c'est-à-dire de la chaîne polypeptidique conduisant à son clivage, à celle des chaînes latérales de différents acides aminés. A l'exception notable de l'oxydation des cystéines et des méthionines pour lesquelles des systèmes enzymatiques spécifiques de réversion de l'oxydation ont été mis en évidence, l'oxydation des autres acides aminés apparaît comme un phénomène irréversible (Pasquier, 1995; Ré et *al.*, 2005). Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical OH^\bullet s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Dean et *al.*, 1997). Les protéines ainsi modifiées sont généralement affectées dans leur fonction, voir complètement inactivées. Il n'existe quasiment pas de système de réparation des protéines. En outre, lorsqu'une protéine possède une fonction enzymatique, les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'inactiver, tout au moins en partie, le site actif (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

I-1-3-1-3- Effets sur les acides nucléiques

Les ERO peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. Il peut y avoir jusqu'à 70 modifications oxydatives différentes des acides nucléiques, certaines affectant les bases d'autres induisant des cassures dans les brins. L'un des marqueurs d'une attaque oxydative des acides nucléiques est la présence de 8-hydroxy-guanine (8-HOG) (figure 6) (Ré et *al.*, 2005).

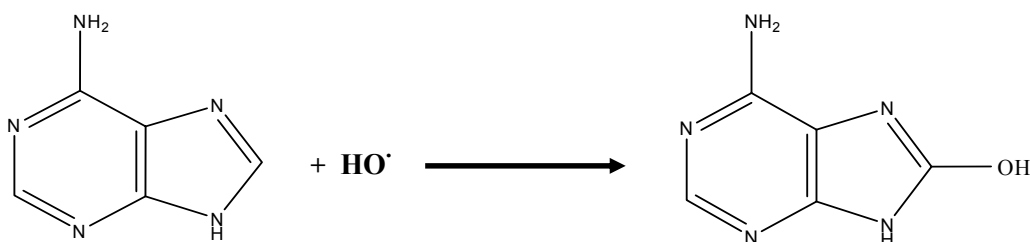


Figure 6. Effet du radical OH[•] sur la guanine (Valko et *al.*, 2006).

I-1-3-2- Marqueurs biochimiques et mise en évidence du stress oxydant

La difficulté de mettre en évidence un stress oxydant de façon directe réside dans le fait que les ERO ont une demi-vie extrêmement courte. Les techniques mises en oeuvre afin de doser les radicaux oxygénés sont difficilement réalisables en pratique. Par conséquent, des produits issus des processus d'oxydation, appelés marqueurs biochimiques du stress oxydant, sont utilisés afin de mettre en évidence indirectement le stress oxydant subi par l'organisme (De moffarts et *al.*, 2005). Parmi les méthodes permettant de mettre en évidence une attaque des lipides par les radicaux libres, il existe la mesure du MDA plasmatique qui est un produit de la peroxydation lipidique en réagissant avec l'acide thiobarbiturique pour donner un composé chromogène quantifiable à 532nm (Pasquier, 1995) . La mise en évidence dans les milieux biologiques de l'oxydation des protéines par le radical OH[•] se fait par la mesure des groupements carbonyles détectés par HPLC, ou anticorps contre ces mêmes groupements (Berger, 2006). La mesure de 8-Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG), produit de l'effet des ERO sur l'ADN, est une autre méthode pour l'estimation du stress oxydant. Cette dernière méthode semble prometteuse, car applicable en clinique et très reproductible (Berger, 2006; Hwang et Kimb, 2007).

I-1-3-3- Stress oxydant et atteintes pathologiques

La notion de «stress oxydant» et de «radicaux libres» est de plus en plus utilisée pour expliquer différentes atteintes pathologiques. Il est responsable de lésions directes de molécules biologiques (figure 7), mais aussi de lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides. Ces produits se lient à l'ADN, formant des adduits responsables de mutagenèse et carcinogénèse. D'autre part, c'est ainsi que dans l'athérosclérose, le rôle des ERO apparaît comme majeur, validant la «théorie oxydative de l'athérosclérose» proposée il y a une quinzaine d'années par Steinberg et ses collègues (Gardès-Albert et *al.*, 2003) et rejoignant la théorie inflammatoire. Les ERO sont donc susceptibles d'oxyder les lipoprotéines, première étape dans l'apparition de la plaque d'athérome. Elles seraient également impliquées dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres. Enfin, les ERO semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

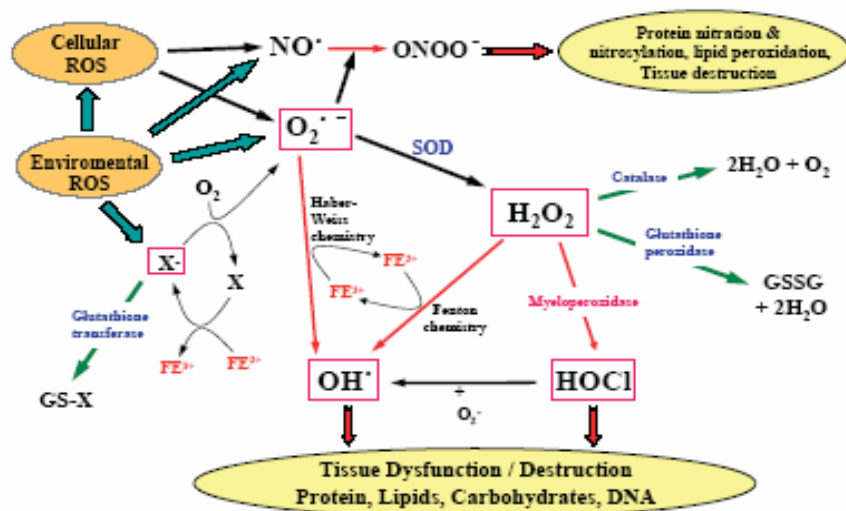


Figure 7. Implication des ERO dans le dysfonctionnement tissulaire (Kirkham et Rahman, 2006).

Devant cette situation, plusieurs travaux se sont consacrés à la recherche de nouvelles molécules à caractère antioxydant à partir des plantes médicinales qui en sont très riches grâce à leur métabolites secondaire, notamment les composés phénoliques dont le pouvoir antioxydant est bien admis aujourd'hui et l'intérêt tant nutritionnel que pharmacologique ne cesse de croître.



***I-2-Plantes médicinales
et composés phénoliques***

I-2- Les composés phénoliques

Les plantes médicinales sont une source intéressante de nouvelles molécules candidates pour la lutte contre différentes pathologies, grâce à leurs métabolites secondaires. Mais, avant de pouvoir recommander l'usage de telle ou telle espèce contre une maladie, il est nécessaire de valider l'usage traditionnel qui en est fait. En d'autres termes, il convient d'évaluer scientifiquement l'activité pharmacologique de la plante médicinale retenue. De plus, il est impératif de vérifier également l'absence de toxicité des plantes employées. L'usage de plantes médicinales locales, en réponse à des problèmes de santé peut-être perçu comme une alternative aux médicaments, en particulier dans les pays du Sud où ces médicaments sont souvent chers, peu accessibles et quelquefois contrefaits.

L'Algérie, un de ces pays, compte une flore de plantes médicinales d'environ 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Parmi celles-ci, *Fraxinus angustifolia* (Aslen) et *Pistacia lentiscus* (Amadghagh), sujet de ce présent travail, sont deux plantes médicinales utilisées par les populations locales comme remède traditionnel pour le traitement de certaines pathologies d'origine inflammatoire.

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* sont douées d'activité antibactérienne, antioxydant et antimutagénique (Abdelwahed et al., 2007); cette plante est utilisée dans quelques régions de l'Espagne pour le traitement de l'hypertension (Kordali et al., 2003). Les feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont appliquées dans la médecine traditionnelle locale contre l'arthrose. Les autres espèces du même genre, telles que *F. americana*, *F. bungeana* et *F. excelsior*, sont aussi utilisées en médecine traditionnelle chinoise dans le traitement de différentes pathologies (Kostova et Iossifova, 2007).

Les différentes propriétés, notamment antioxydantes des plantes médicinales sont essentiellement dues à leurs composés phénoliques. L'intérêt porté sur ces composés ne cesse de croître ces dernières années. Ils sont étudiés dans le but de trouver de nouvelles structures modèles pour le développement de médicaments thérapeutiques ou protecteurs (Bossokpi, 2003).

Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal. Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaires, tels que les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Bahorun, 1997; Martin et al., 2002). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié un ou plusieurs groupements hydroxyles, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Ribéreau-Gayon, 1968; Kevin et al., 1999;

Hennebelle et *al.*, 2004). Cette définition purement chimique des composés phénoliques est toutefois insuffisante, car elle inclurait même des métabolites secondaires, tels que les alcaloïdes et les huiles essentielles qui possèdent dans leur structure de base le noyau benzénique. Il est donc nécessaire de faire intervenir le critère biosynthétique pour mieux cerner les limites de ce groupe de composés (Bruneton, 1993).

I-2-1- Biosynthèse des composés phénoliques

Dans la nature, la synthèse du noyau benzoïque est exclusivement le fait des végétaux et micro-organismes. Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies métaboliques, la voie la plus courante est celle de l'acide shikimique, qui conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés (Richter, 1993; Martin et *al.*, 2002). En revanche, la voie des polyacétates, qui est à l'origine des poly β -cétosters (polyacétates) participe d'une manière secondaire à leur biosynthèse (Guignard, 1996). La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité, très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origines mixtes des deux voies (figure 8) (Bruneton, 1999).

I-2-1-1- Voie de l'acide shikimique

La première réaction de cette voie est la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose-4-phosphate pour former au bout de plusieurs réactions enzymatiques l'acide chorismique, ce dernier se transforme en acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine) qui, par désamination, mènent aux acides cinnamiques, précurseurs de la majorité des acides phénols (figure 8) (Richter, 1993; Croteau, et *al.*, 2000).

I-2-1-2- Voie de polyacétates

Une seconde voie de biosynthèse consiste à réaliser un ensemble de noyaux aromatiques par cyclisation des chaînes polycétoniques, elles-mêmes obtenues par condensation de groupements acétate (Richter, 1993). Cette seconde voie intervient pour accomplir un second noyau benzénique chez les végétaux supérieurs pour de nombreux composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie du shikimate : ce sont les composés mixtes dont les représentants les plus importants sont les flavonoïdes (Bruneton, 1993).

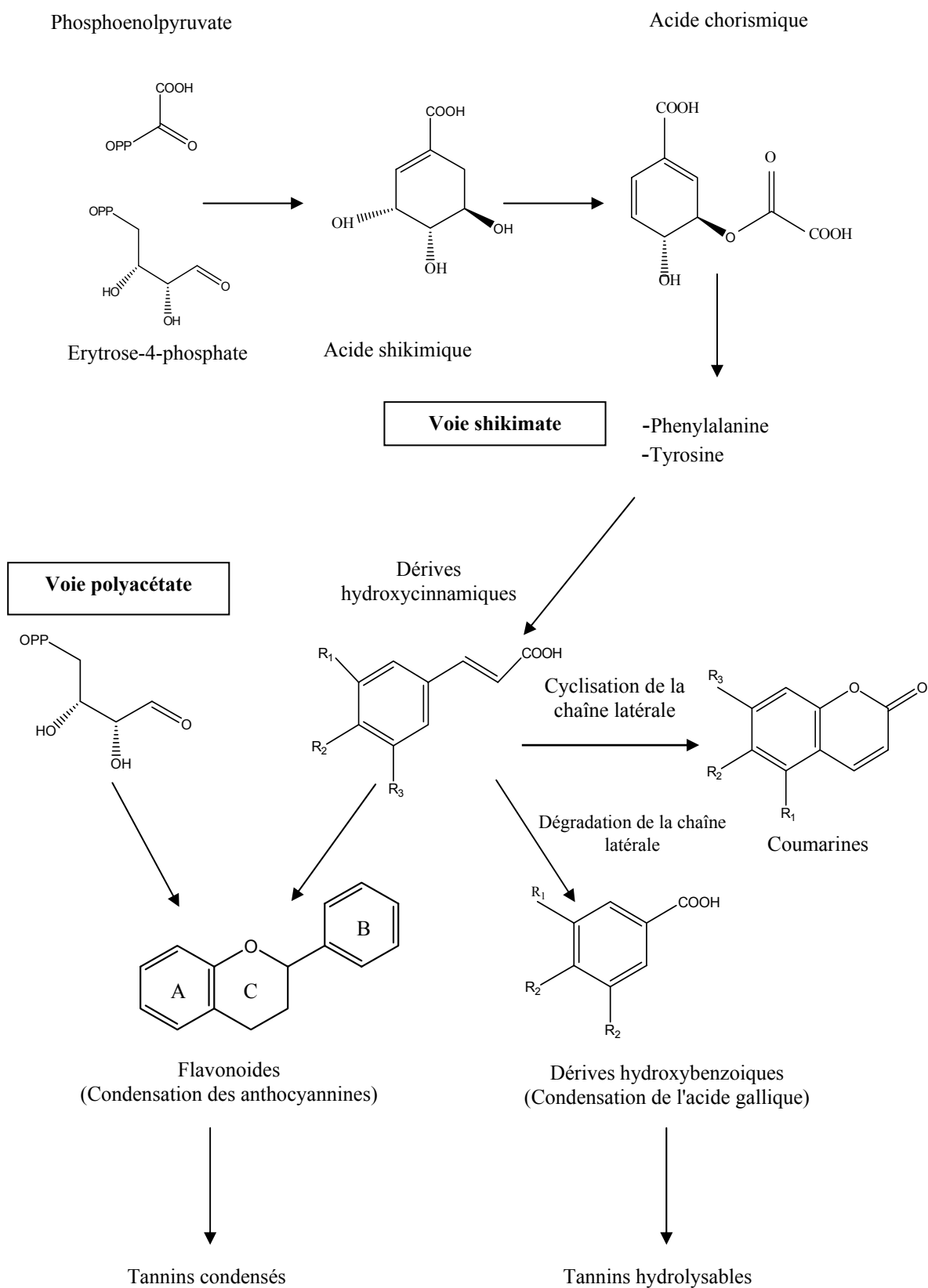


Figure 8. Voies de biosynthèse des différentes classes de composés phénoliques.

I-2-2- Classification des composés phénoliques

I-2-2-1- Acides phénols simples

Dans cette classe, on compte les dérivés hydroxybenzoïques à sept atomes de carbone (C6-C1), les dérivés hydroxycinnamiques à neuf atomes de carbones (C6-C3) et enfin des coumarines (Ribéreau-Gayon, 1968).

Les dérivés hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérive de l'acide cinnamique, l'ensemble de ce groupe est souvent rapporté sous la dénomination commune de phénylpropanoïdes (Valk-Skerget et *al.*, 2004). Ils sont les plus abondants des composés phénoliques simples, et leur présence dans le règne végétal est, généralement à l'état d'ester avec d'autres molécules organiques tels que les glucides (Richter, 1993).

Les dérivés hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque avec une formule de base C6-C1 (figure 9). Ces composés peuvent provenir directement de l'acide 3-déshydroshikimique (cas de l'acide gallique) ou de l'acide chorismique (cas de l'acide salicylique) ; mais en règle générale, ils résultent de la dégradation de la chaîne latérale des acides cinnamiques. Ils sont moins abondants par rapport à leurs précurseurs et peuvent exister sous forme d'esters ou de glucosides qui représentent des formes de stockage et de circulation dans les plantes (Bruneton, 1999).

Les coumarines sont des composés qui dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de leur chaîne latérale (figure 9). Ils sont les moins répandus des deux premiers et leur répartition dans la nature est assez limitée. Le composé le plus fréquent est l'ombelliférone (Guignard, 1996; Bruneton, 1999).

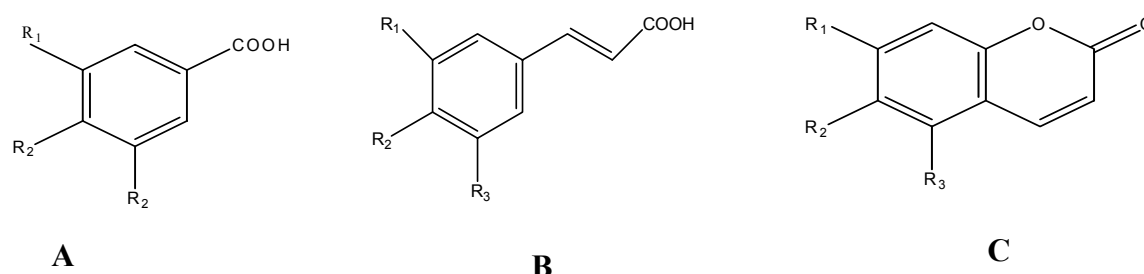


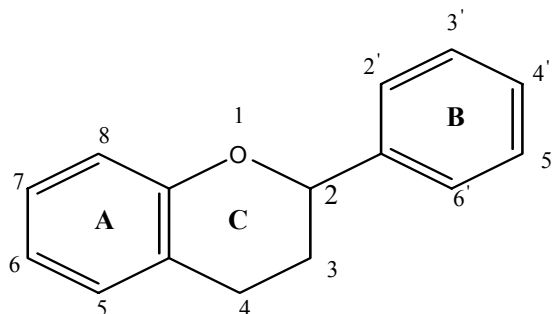
Figure 9. Structures des composés phénoliques simples. A) acide benzoïque. B) acide cinnamique. C) coumarine (Handique et Baruah, 2002).

Tableau I. Exemples d'acides phénols (Kaneko *et al.*, 2003^(a); Mello et Kubota, 2007^(b)).

Acides phénols	R ₁	R ₂	R ₃
Acides hydroxycinnamiques ^(b)			
Acide <i>p</i> -cinnamique	H	H	OH
Acide caféique	OH	OH	H
Acide férulique	OCH ₃	OH	H
Acide sinapique	OCH ₃	OCH ₃	OH
Acides hydroxybenzoïques ^(b)			
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	OH	H
Acide protocatéchique	OCH ₃	OH	OH
Acide vanillique	OCH ₃	OH	H
Acide gallique	OH	OH	OH
Coumarines ^(a)			
Esculetin	OH	OH	H
ombélliférone	OH	H	H
Fraxitine	OH	OCH ₃	OH
Scopolitin	OH	OCH ₃	H

I-2-2-2- Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments universels des végétaux, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles (Croteau, *et al.*, 2000). L'ensemble des flavonoïdes est de structure générale en C₆-C₃-C₆ et comprend à lui seul plus de 4000 molécules d'une origine biosynthétique commune constituant ainsi, le groupe le plus répandu des composés phénoliques (Havsteen, 2002). Ils sont le modèle le plus connu des composés d'origine biosynthétique mixte dont, le cycle A provient de la voie poly-acétate, tandis que les cycles B et C dérivent de la voie shikimate (figure 10) (Pietta, 2000).

**Figure 10.** Structure de base des flavonoïdes avec la numérotation classique (Gramza et Korczak, 2005).

La structure de l'hétérocycle central (C) et son degré d'oxydation permettent de distinguer les différentes classes des flavonoïdes (figure 11). Le cas extrême d'oxydation de l'hétérocycle central correspond aux anthocyanidines, toujours présentes en milieux acides, sous forme d'un cation de couleur rouge, dit flavylum (Buelga et Williamson, 2003). En revanche, dans le cas des flavane-3-ols (catéchine) et les flavane-3,4-diols, le cycle central est fortement réduit. Entre ces deux cas, il y'a des situations intermédiaires comme les flavanones, flavonols, les flavones et d'autres groupes (figure 11), qui diffèrent entre eux par la présence ou l'absence de la double liaison C2-C3, les fonctions 3-hydroxy et 4-oxo. Exceptionnellement, le noyau central peut ne pas être cyclisé dans le cas des chalcones, comme il peut se présenter sous une forme à cinq sommets dans le cas des auronnes. A l'intérieur de chacune des classes, les variations de substitution sur le squelette C15 portent principalement sur le degré d'hydroxylation, le niveau de méthylation (groupement OCH₃) et de glycosylation des deux cycles A et B (tableau II) (Middleton et al., 2000; Macheix et al., 2005).

Tableau II. Exemples des différentes classes de flavonoïdes (Valk-Skerget et al., 2004^(b); De Rijke et al., 2006^(a)).

Flavonols ^(b)	5	6	7	3'	4'	5'
Quercétine	OH	H	OH	OH	OH	H
Kaempferol	OH	H	OH	H	OH	H
Galangine	OH	H	OH	H	H	H
Myricétine	OH	H	OH	OH	OH	OH
Flavones ^(b)	5	6	7	3'	4'	5'
Lutéoline	OH	H	OH	OH	OH	H
Apigénine	OH	H	OH	H	OH	H
Chrysin	OH	H	OH	H	H	H
Flavanones ^(b)	5	6	7	3'	4'	5'
Hesperétine	OH	H	OH	OH	OCH ₃	H
Naringénine	OH	H	OH	H	OH	H
Anthocyanidines ^(a)	5	6	7	3'	4'	5'
Pélagonine	OH	H	OH	H	OH	H
Cyanidine	OH	H	OH	OH	OH	H
Delphénidine	OH	H	OH	OH	OH	OH
Flavanols ^(a)	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-Catéchine	β OH	OH	OH	OH	OH	H
(-)-Epicatéchine	α OH	OH	OH	H	OH	OH
(-)-Gallocatéchine	α OH	OH	OH	OH	OH	OH

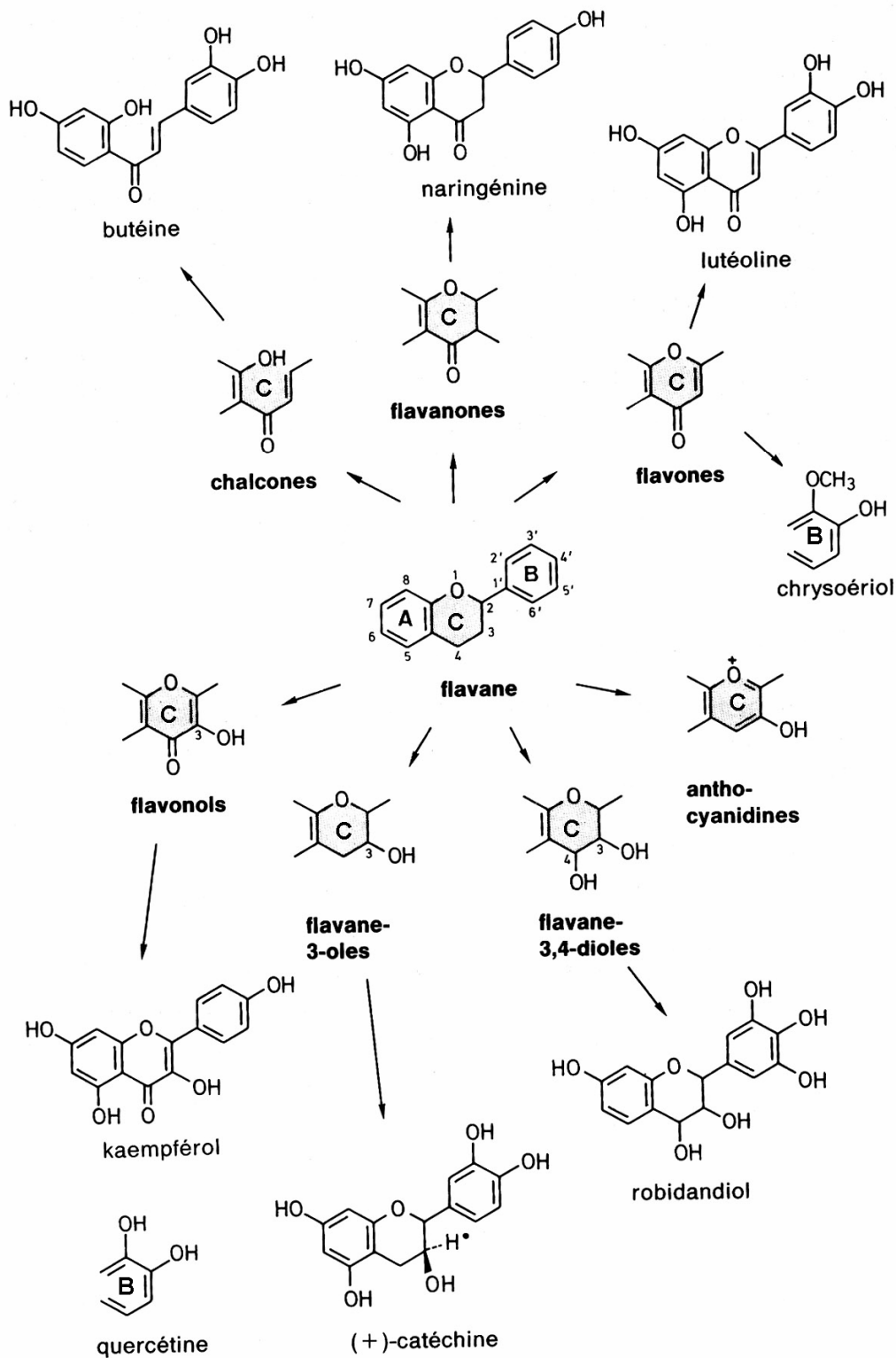


Figure 11. Les différentes classes de flavonoïdes (Richter, 1993).

I-2-2-3- Les tannins

Ces composés résultent généralement de la condensation des formes simples précédemment évoquées. Selon la nature des constituants impliqués et le type de condensation, il est classique de distinguer deux grands groupes de tannins différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Reed, 1995; Khanbabaee et Ree, 2001).

I-2-2-3-1- Tannins hydrolysables

Ils sont d'abord caractérisés par le fait qu'ils peuvent être hydrolysés par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique. En effet, dans ces conditions ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins, soit un dimère de ce même composé qui est l'acide éllagique dans le cas des éllagitannins. La forme la plus simple des tannins hydrolysables est le penta-galloylglucose (figure 12), molécule très réactive qui est à l'origine de la plupart des formes complexes de ce type de tannins (Khanbabaee et Ree, 2001; Bennick, 2002).

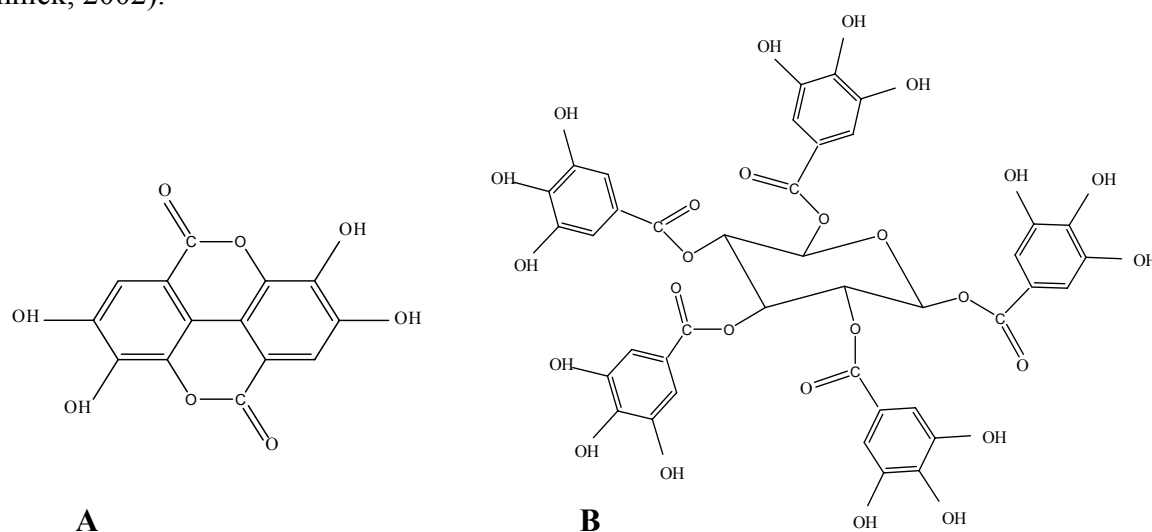


Figure 12. Unités élémentaires des tannins hydrolysables. A) Acide éllagique. B) penta-galloylglucos (acide tannique) (Reed, 1995; Macheix et al., 2005).

I-2-2-3-2- Tannins condensés ou tannins catéchiques

Les tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ols dérivés de la (+)-catéchine (figure 13). Contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse, et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide à chaud, ils se transforment en pigments rouges et, pour cette raison, les formes dimères et oligomères sont dénommées proanthocyanidines. L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit par liaisons C-C ou par liaisons C-O-C conduisant à des structures de plus en plus complexes (Bruneton, 1999; Xie et Dixon 2005).

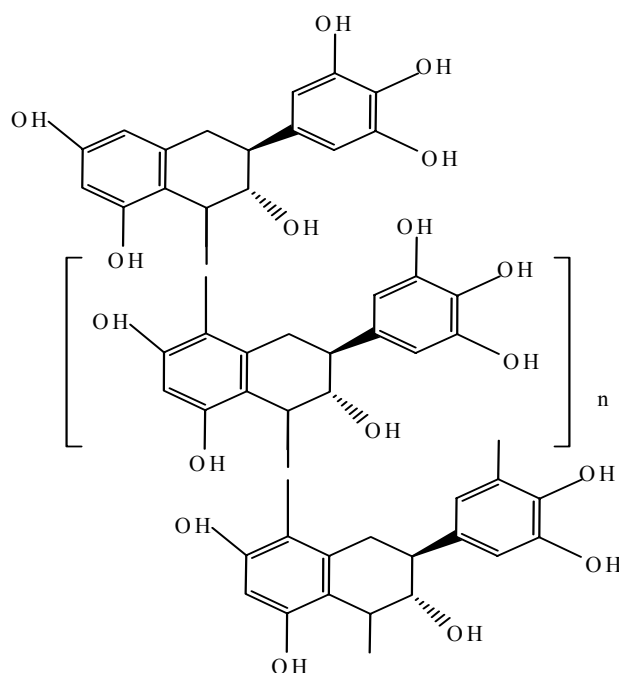


Figure 13. Exemple de structure d'un tannin condensé (Macheix *et al.*, 2005).

I-2-3- Propriétés des composés phénoliques

I-2-3-1- Propriétés physicochimiques

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

méthanol/HCL (Buelga et Wiliamson, 2003) et les flavonoides glycones sont connus comme étant des composés hydrosolubles vu la présence de la partie osidique. A l'opposé, certains flavonoides apolaires, par exemple ceux liés aux stérols, doivent être extraits avec des solvants plus apolaires, comme le chloroforme et l'hexane. Les formes condensées, comme les tannins sont de préférences extraits par l'acétone (Bruneton, 1999; Macheix et *al.*, 2005).

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

Tableau III. Gammes d'absorption des différents composés phénoliques (Robards et *al.*, 1999).

Composés phénoliques	Bande UV nm (I)	Bande UV nm (II)	Visible
Acides benzoïques	270-280		
Acides cinnamiques	290-300	305-330	
Anthocyanines	240-280	315-325	450-560
Flavonols	250-270	350-380	
Coumarines	220-230	310-350	
Flavones	250-270	330-350	
Flavanoles, flavanonols	270-295	300-330	
Chalcons	220-270	340-390	
Aurones	240-270		340-370
Isoflavones	245-270	300-340	

I-2-3-2- Propriétés biologiques

Au cours de ces dernières années, les études sur les composés phénoliques et les plantes médicinales qui les accumulent, en dehors des légumes et des fruits qui en sont aussi riches, ont prouvé l'implication de ces composés dans plusieurs activités biologiques, dont des publications font état d'activités antimicrobienne, anti-inflammatoire ainsi que la protection contre les pathologies tumorales et cardiovasculaires (Brasseur, 1989; Guy et *al.*, 2000; Balasundram et *al.*, 2005; Derbel et Ghedira, 2005; De Lima et *al.*, 2006; Rahman et *al.*, 2006). Citant un exemple, les flavonoides sont de puissants inhibiteurs de la phospholipase A2, une

enzyme responsable des dommages moléculaires via la production de l'acide arachidonique et ses dérivés lors de la réponse inflammatoire (Manthey et *al.*, 2001). De plus, parmi les tannins hydrolysables du groupe des ellagitannins, certains dimères ou trimères cycliques présentent une activité antitumorale intéressante (Macheix et *al.*, 2005). Ces différents aspects, actuellement en pleine évolution sur le plan biochimique, moléculaire et clinique, représentent des voies d'investigations importantes pour comprendre les mécanismes mis en jeu et les applications médicales qui pourront en découler.

Dans la plupart des cas, qu'il s'agisse de préparations brutes ou de fractions purifiées, l'action pharmacologique des composés phénoliques est associée à deux propriétés : d'une part, leur capacité à se fixer aux protéines, propriété particulière des tannins, ce qui peut conduire à l'inhibition d'activités enzymatiques telles que la lipoxygénase, la peroxydase et la xanthine oxydase qui sont à l'origine de pathologies d'origine inflammatoire (Macheix et *al.*, 2005; Porat, 2006). Et d'autre part, comme cela sera cité ci-dessous, le caractère antioxydant permet de neutraliser les formes toxiques de l'oxygène et les radicaux libres issus de la peroxydation lipidique responsables de vieillissement cellulaire (Nijveldt et *al.*, 2001; Macheix et *al.*, 2005).

I-2-3-3- Propriétés antioxydantes

La reconnaissance des composés phénoliques comme antioxydants naturels est maintenant bien acquise et elle est pour une part à l'origine du regain d'intérêt que l'on porte à ces molécules dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie (Macheix et *al.*, 2005). Grâce à leur diversité structurale, les composés phénoliques sont impliqués dans cette activité via plusieurs mécanismes en agissant à différents niveaux des réactions radicalaires par la chélation des métaux, l'effet scavenger, l'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres et l'induction de la synthèse des enzymes antioxydantes (Cotelle et *al.*, 1995; Bors et *al.*, 1997 ; Gramza et Korczak, 2005; Siddhuraju, 2006).

I-2-3-3-1- Chélation des métaux

Les métaux de transition Fe^{++} et Cu^{++} qui sont essentiels pour le déroulement de différentes fonctions physiologiques peuvent être aussi une source du radical OH° lors de la réaction de Fenton par réduction de H_2O_2 . Cette réaction peut être empêchée par les composés phénoliques notamment les flavonoides en chélatant ces métaux grâce à leurs fonctions catéchols 3'-hydroxyl, 4'-hydroxyl sur le cycle B, les fonctions 3-hydroxy, 4-oxo du l'hétérocycle C et les fonctions 4-oxo, 5-hydroxy de l'hétérocycle C et le cycle B, respectivement (figure14) (Bors et *al.* 1997; Pietta, 2000 ; Heim et *al.*, 2002).

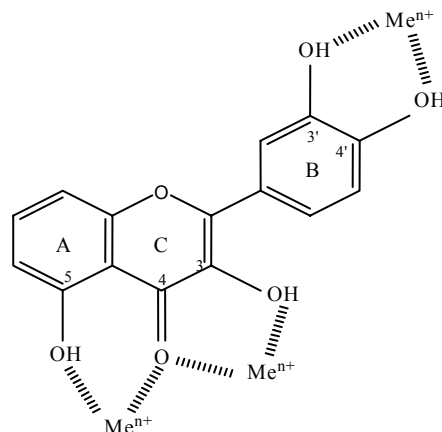


Figure 14. Sites de chélation des métaux par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

I-2-3-3-2- Effet scavenger

L'effet scavenger des composés phénoliques consiste à piéger et à neutraliser les formes toxiques de l'oxygène en les réduisant par transfert direct d'un électron sur leur dernière couche électronique (Ghedira, 2005). De ce fait, les composés phénoliques interfèrent et bloquent la propagation de la réaction radicalaire en chaîne grâce à leur caractère réducteur en devenant, eux-mêmes, des radicaux phénoxyls assez stables grâce au phénomène de résonance (délocalisation des doublets électroniques) ; ces derniers peuvent aussi interagir avec un autre radical selon la figure suivante (figure 15) (Pietta, 2000; Macheix *et al.*, 2005).

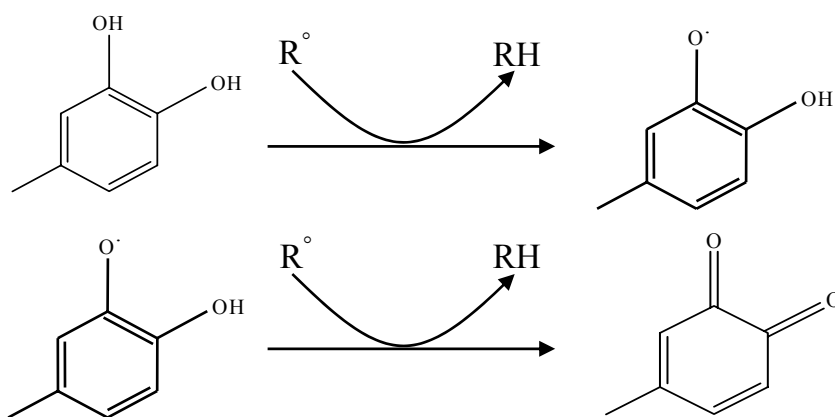


Figure 15. Mécanisme de l'activité scavenger des flavonoïdes via la fonction catéchol (Pietta, 2000).

Ce mécanisme semble être le plus important sur le plan biologique via la protection des LDL de la peroxydation lipidique et la régénération des formes réduites du tocophérol et la vitamine C (Robards *et al.*, 1999; Narayana, *et al.*, 2001). L'activité des flavonoïdes comme piègeurs de radicaux libres étant bien établie ; des études récentes suggèrent qu'ils seraient

également de puissants piègeurs du radical NO° et ONOO^- (McCarty, 2008; Ha et al., 2008). Cette activité est étroitement liée aux propriétés structurales des composés phénoliques, à savoir le nombre et la position des groupements hydroxyls et le degré de méthylation, de glycosylation et de polymérisation (Heim et al., 2002).

Prenant l'exemple des flavonoïdes, la présence des groupements hydroxyls et leur configuration spatial ainsi que la présence des doubles liaisons sur l'hétérocycle C sont déterminantes de l'efficacité antioxydante de ces composés (figure 16) (Rietjens et al., 2002; Lugasi et al., 2003; William et al., 2004). D'autre part, cet effet augmente avec le degré de polymérisation. En effet, l'epigallocatechine gallate (EGCG), une molécule oligomérique des tannins, est plus active que la catéchine, cela est expliqué par la présence de la forme galloyl en position C3 avec trois groupements hydroxyls de plus par rapport à la catéchine. En fin, les tannins hydrolysables et les procyanidines présentent des propriétés antioxydantes significatives, ils agissent comme donneurs de protons face aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation (Okuda, 2005; Soobrattee et al., 2005).

En revanche, la méthylation et la glycosylation des flavonoïdes au niveau des groupements hydroxyls diminuent considérablement leur effet anti-radicalaire. La différence de l'effet anti-radicalaire des flavonoïdes polyhydroxylés et les flavonoïdes polyméthylés est due essentiellement à l'hydrophobicité et la planarité de ces molécules (Soobrattee et al., 2005).

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

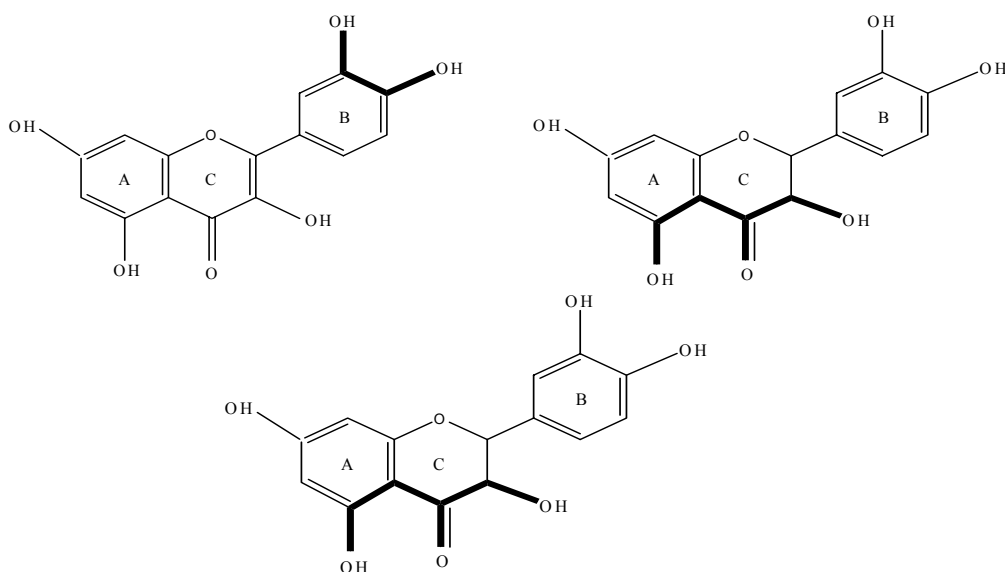


Figure 16. Groupes fonctionnels de l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes (Soobrattee et al., 2005).

I-2-3-3-3- Inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres

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

I-2-3-3-4- Induction de synthèse des enzymes antioxydantes

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

Les multiples propriétés chimiques ou biologiques des composés phénoliques donnent à ces molécules et aux plantes qui les contiennent un intérêt thérapeutique certain.

En effet, les composés phénoliques font actuellement l'objet de nombreuses études dans le domaine thérapeutique vu leur propriétés antioxydantes. Ces composés sont susceptibles d'être impliqués dans la lutte contre le stress oxydant, mettant ainsi en valeur l'application des plantes dans la médecine traditionnelle.

P. lentiscus et *F. angustifolia* sont utilisées, en Algérie, dans le traitement de certaines maladies sans base ou référence scientifique. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'activité antioxydante des extraits des deux plantes en utilisant le radical synthétique DPPH. L'évaluation de l'activité anti-DPPH et la caractérisation de cet effet par la chromatographie sur couche mince (CCM) nous permettra de mettre en évidence éventuellement de nouvelles molécules à caractère antioxydant et justifiera l'effet protecteur que pourraient assurer leurs composés phénoliques dans la lutte contre les maladies liées aux stress oxydant.

II- Matériels et méthodes

II-1- Préparation de la poudre végétale

II-1-1- Récolte du matériel végétal

Les feuilles et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ainsi que les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été cueillies de la forêt d'Azru n Bechar; un site situé dans la localité d' Amizour, wilaya de Bejaia, loin de tout impact de pollution. Les feuilles ont été récoltées en juillet et les écorces en novembre 2006.

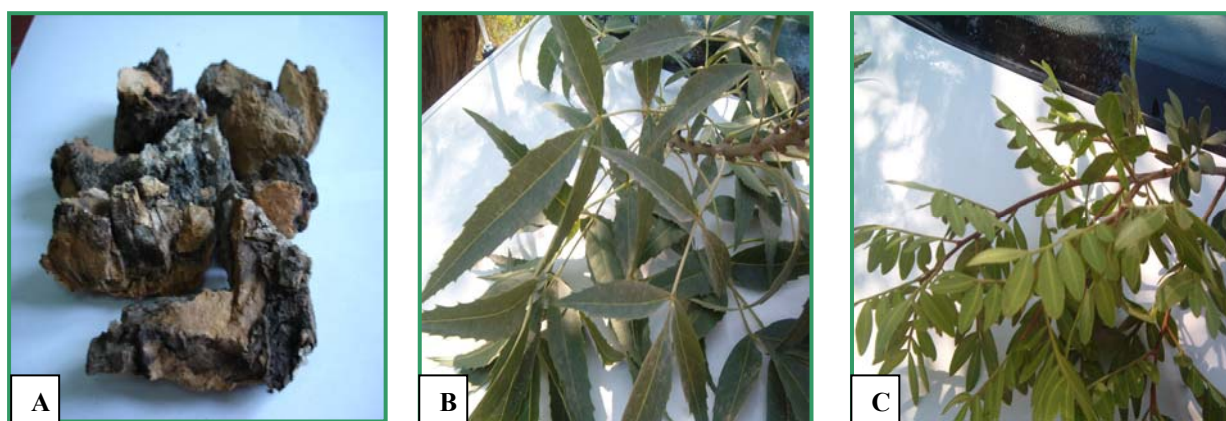


Figure 17. Photographies du matériel végétal. A) L'écorce de *F. angustifolia*. Feuilles de *F. angustifolia*. C) Feuilles de *P. lentiscus*.

II-1-2- Séchage, broyage et tamisage

Après la récolte, le matériel végétal des deux plantes est laissé se dessécher à la température ambiante à l'abri de la lumière vive jusqu'à son épuisement en eau. La matière sèche obtenue est réduite à l'aide d'un broyeur électrique en poudre de granulométrie plus ou moins fine. Le broyat de tamisage a fait l'objet de raffinage via un tamiseur, permettant le recouvrement d'une poudre fine à particules de granulométrie homogène équivalente à 63 μm .

La finalité de cette étape est de mettre au point une poudre végétale qui permet l'extraction des taux importants des composés phytochimiques (phénols, flavonoïdes et tannins), doués de toutes leurs activités biologiques.

II-1-3- Préparation des extraits

Le procédé d'extraction que nous employons au niveau de notre laboratoire est celui de Chiang et ses collaborateurs (1994), qui porte sur trois principales étapes (figure 18).

La première est la macération de la matière végétale fine dans l'éthanol (95%) à raison de 4,0ml pour 1,0g de la poudre végétale sous agitation pendant 24h. La suspension éthanolique est ensuite laissée se décanter (24 h) pour donner deux phases bien distinctes; une phase de précipité de la matière végétale et une phase de surnageant qui est la solution éthanolique de l'extrait

végétale. Cette dernière est récupérée soigneusement et soumise au séchage à la température ambiante de laboratoire loin de la lumière vive.

À la stabilité de son poids, l'extrait éthanolique, mis à part une petite portion retenue pour l'étude, est transféré dans un mélange acétate d'éthyle/ eau (3/1 : v/v). Au bout de 24 h de macération, deux phases non miscibles (une phase aqueuse d'acétate d'éthyle et une phase organique d'acétate d'éthyle) ont été obtenues; celles-ci ont été séparées soigneusement et laissées sécher dans les mêmes conditions citées précédemment.

Après avoir mis de côté la phase aqueuse d'acétate d'éthyle et une petite portion de l'extrait d'acétate d'éthyle, le reste de cette dernière est répartie équitablement en deux parties; dont chacune est transférée dans un mélange soit d'hexane/eau ou chloroforme/eau (3 :1, v/v). Après une nuit de macération, quatre phases ont été obtenues séparément et laissées sécher jusqu'à la stabilisation de leur poids sec. Le pourcentage d'extraction de chaque étape est calculé par la formule suivante :

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

P₁ : poids d'extrait après évaporation (g).

P₀ : poids vide du cristalliseur ou boîte de pétri (g).

E : poids de la poudre ou de l'extrait sec de la phase précédente (g).

Ainsi, on est parvenu à disposer de sept extraits pour les feuilles de *P. lentiscus* et cinq extraits pour les feuilles et l'écorce de *F. angustifolia*.

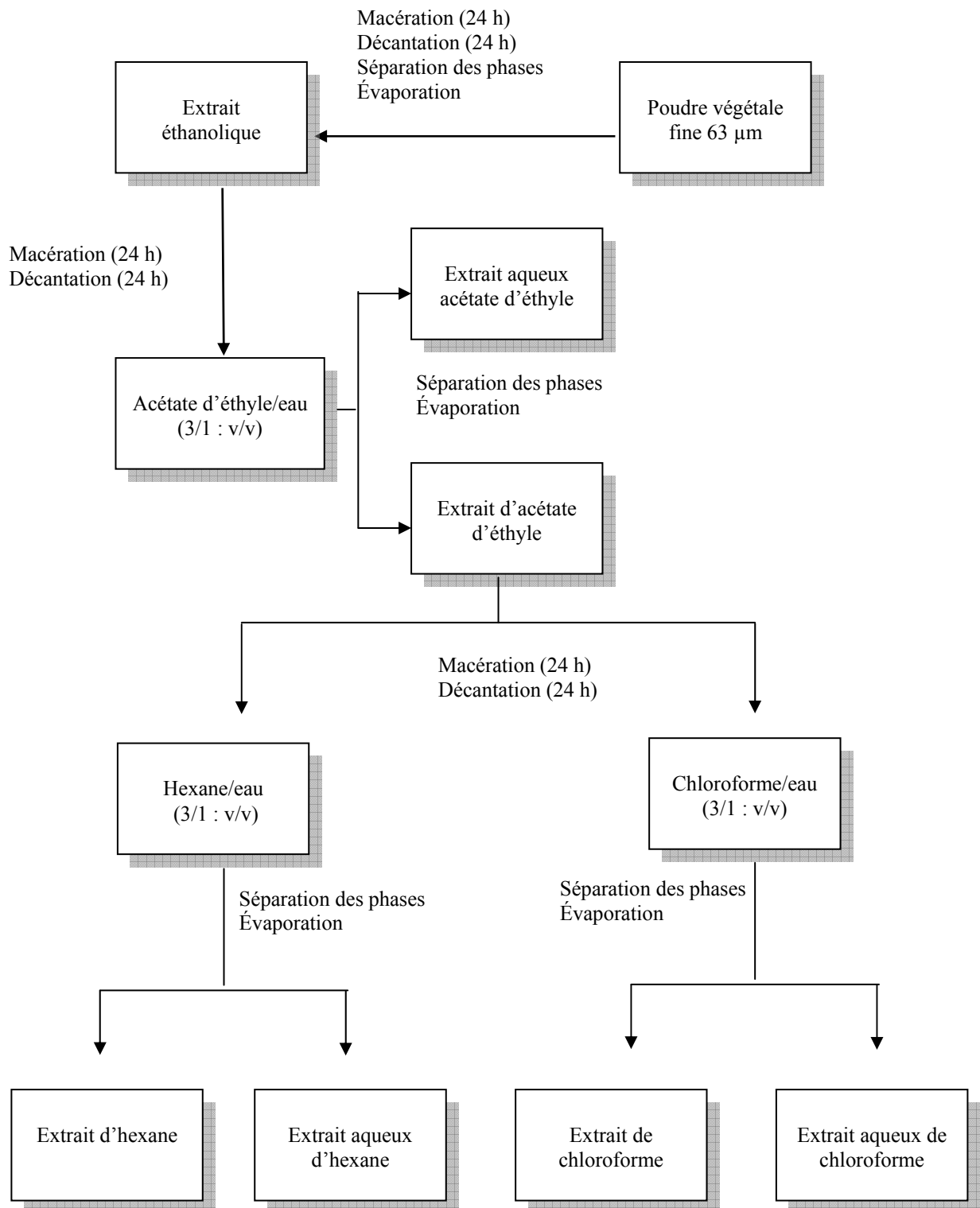


Figure 18. Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction (Chiang *et al.*, 1994).

II-2- Dosage des composés phénoliques

II-2-1- Dosage des phénols totaux

- Principe de la méthode

Le dosage des phénols totaux est effectué suivant le procédé de Owen et Johns (1999), son principe repose sur le fait que les ions phénolates formés par adition de carbonate de sodium à la solution d'extrait sont oxydés par le réactif de Folin-Ciocalteu, donnant ainsi à la solution une couleur bleuâtre, dont l'intensité reflète la concentration des phénols totaux dans les extraits.

- Mode opératoire

Les différents extraits des plantes sont d'abord préparés et bouillies dans du méthanol à 50%, filtrés et ajustés à un volume de 100ml pour obtenir à la fin des solutions de 100µg/ ml pour chaque extrait. 2,5ml de ces solutions sont dilués dans 25ml d'eau distillée et le tout est mélangé successivement avec 1,5ml de carbonate de sodium (200g/l) et 0,5ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Au bout d'une heure d'incubation, la densité optique est mesurée à 750 nm et les concentrations sont exprimées en milligramme équivalent acide gallique par rapport à un gramme d'extrait (mgEAG/g d'extrait) à partir de la courbe d'étalon réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits (annexe 1).

II-2-2- Dosage des flavonoides

- Principe de la méthode

Les méthodes de dosage des flavonoides sont le plus souvent colorimétriques ; elles reposent sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$), qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont le pic d'absorption est fixé à la longueur d'onde de 430 nm.

- Mode opératoire

La concentration des flavonoides a été évaluée selon la méthode de Maksimovié et ses collaborateurs (2004). Une méthode simple qui consiste, après 10 min d'incubation, en la mesure de l'absorbance à 430 nm de la solution jaunâtre contenant 2,0ml de l'extrait dissout dans du méthanol (1mg/ml) et 1,0ml de réactif de chlorure d'aluminium (133mg du chlorure d'aluminium et 400 mg d'acétate de sodium cristalline dans 100ml d'eau distillée). Les taux de flavonoides des extraits sont exprimés en milligramme équivalent rutine par rapport à un gramme d'extrait (mgER/g d'extrait) à partir de la courbe d'étalonnage réalisée au préalable dans les mêmes conditions expérimentales que les extraits (annexe 1).

II-2-3- Dosage des tannins

- Principe de la méthode

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

- Mode opératoire

Le protocole expérimental de cette méthode nécessite d'abord la préparation des solutions suivantes :

- Tampon A : le tampon A est préparé par une solution de 0,2M d'acide acétique avec 0,17M de NaCl, ajusté à pH 4,9.
- SDS/TEA : 5% (v/v) triéthanolamine avec 1% (p/v) SDS (50ml triéthanolamine, 10g de SDS ajusté à 1,0 litre d'eau distillée).
- FeCl_3 : 1,62g est dissout dans 0,01M de HCl. La solution est filtrée.

La BSA est solubilisée d'abord dans le tampon A à raison d'une concentration de 1mg/ml. Un volume de 2,5ml de cette suspension protéique est ensuite mélangé avec 1,0ml de l'extrait à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour former, après 24 h d'incubation à 4°C, un précipité de complexe tannins-BSA au fond des tubes. Afin de séparer ce précipité du surnageant, les solutions ont été centrifugées à 3000g pendant 15min. Le précipité débarrassé du surnageant est ensuite solubilisé et hydrolysé avec 4,0ml de SDS/TEA et le mélange est agité vigoureusement par vortex.

Enfin, 1,0ml de FeCl_3 a été ajouté pour manifester avec les tannins une couleur pourpre pendant 15min de contact et les absorbances à la longueur d'onde de 510nm sont traduites en milligramme équivalent acide tannique par gramme d'extrait (mgEAT/g d'extrait) à partir de la courbe d'étalonnage. La courbe d'étalonnage de l'acide tannique a été préparée suivant les mêmes étapes prescrites par la méthode, sauf que la durée d'incubation de l'acide tannique avec la BSA est de 15min à 4°C au lieu de 24h comme dans le cas des extraits.

II-3- Evaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH

- Principe de la méthode

La méthode menée dans notre travail pour l'évaluation de l'effet scavenger des extraits de plantes contre le DPPH est celle de Maisuthisakul et ses collaborateurs (2007). Cette méthode

tire profit de la décoloration de la solution méthanolique du radical DPPH lors de sa réduction par les antioxydants. La différence de la densité optique, entre la solution de radical DPPH en absence et en présence de l'extrait reflète le potentiel des composés responsables de cette activité à réduire le radical DPPH, et le taux réduit de radical DPPH par ces molécules est exprimé en pourcentage suivant la formule suivante :

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

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

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

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

- Mode opératoire

On ajoute 50,0 μ l de la solution DPPH préparée à 5mM dans du méthanol (95%) à chaque 2,45ml des solutions méthanoliques des extraits. Tous les extraits ont été testés à des concentrations de 100, 75, 50, 25, et 10 μ g/ml. Toutefois, les extraits aqueux des feuilles de *P. lentiscus* ont été testés à des concentrations inférieures, à savoir 8, 6, 4 et 2 μ g/ml. Après 30min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm.

A titre d'indication, quatre standards : l'acide ascorbique, l'acide gallique, la catéchine et la rutine, connus pour leur effet anti-radicalaire contre le DPPH ont été testés en parallèle au mêmes concentrations que les différents extraits. Quant aux concentrations inhibitrices (IC_{50}), elles ont été calculées par le logiciel «Origine», à partir des courbes à régression linéaires pour certains et des courbes sigmoïdales pour d'autres.

II-4- Etude statistique

L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application «ANOVA» (STATISTICA 5.5) et la comparaison des données est considérée significative à la probabilité $P < 0,05$.

II-5-Etude chromatographique des extraits des plantes

II-5-1- Chromatographie sur couche mince

II-5-1-1- Préparation des plaques

A l'aide d'un étaleur manuel, la plaque de chromatographie en verre est recouverte d'une fine couche de silice (Silica gel 60 F₂₅₄ avec indicateur fluorescent) comme phase stationnaire à une épaisseur de 0,5mm, puis séchée et réactivée à 110°C pendant 30min. La plaque est tracée par deux lignes, limitant la distance (14cm) de migration des extraits qui sont déposés sous

forme de spots de volume de 10 μ l à raison de 100 μ g/ml par dépôt ; en parallèle, des standards ont été déposés de la même manière.

II-5-1-2- Développement des plaques

Le développement des plaques est un processus au cours duquel l'échantillon est entraîné par une phase mobile à travers la phase stationnaire. On place la plaque en position légèrement inclinée dans une chambre de chromatographie ; elle est immergée d'environ 0,5cm dans la phase mobile constituée d'un ou plusieurs solvants dont les vapeurs auront préalablement saturé la chambre (figure 19). L'échantillon sera entraîné par la progression capillaire de la phase mobile vers le haut de la plaque et le déplacement de chaque molécule dépendra de ses interactions entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les composés phénoliques seront séparés en fonction de leur solubilité et leurs poids moléculaires. Les systèmes d'éluion utilisés ont été adaptés des études similaires déjà réalisées (Dohou, 2003 ; Males et *al.*, 2006).

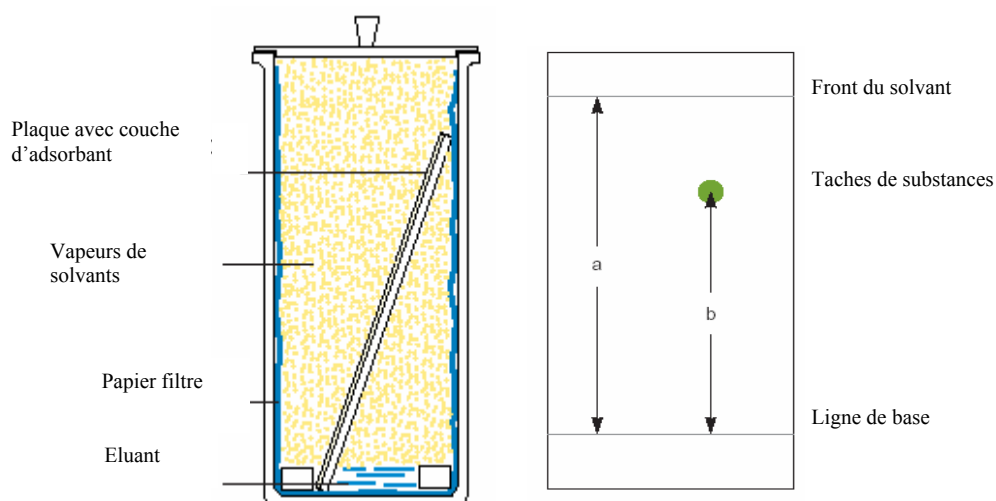


Figure 19. La chromatographie sur couche mince.

II-5-1-3- Caractérisation post-chromatographique des plaques

On prépare pour les extraits de chaque plante deux plaques, une sera analysée directement sous UV et laissée après à la lumière du jour pour son observation. La deuxième sera pulvérisée soigneusement avec la vanilline sulfurique, un révélateur à large spectre, préparée selon la méthode de Eloff et ses collègues (2005) dans le but de visualiser et de caractériser les fractions invisibles sous UV et à la lumière du jour. L'analyse des chromatogrammes est accompagnée du calcul des rapports frontaux (RF), caractéristiques de chaque fraction.

II-5-1-3- Mise en évidence, sur CCM, de l'activité anti-radicalaire contre le DPPH

La détection des composés ayant une activité de capteurs de radicaux libres a été réalisée par la pulvérisation d'une solution du radical DPPH (500 μ M préparée dans l'éthanol), selon la méthode de Sievers et al. (2002). Les composés actifs manifestent des taches jaunes sur un fond violet, qui représentent la forme réduite du radical DPPH (DPPH-H).

II-5-2- Chromatographie sur colonne de gel de silice

La silice de chromatographie sur colonne (0.063mm-0.2mm) a été préparée dans le solvant le plus apolaire des systèmes d'élution (chloroforme). L'échantillon à fractionner (20mg/ml préparé dans le méthanol) est déposé soigneusement en haut de la phase stationnaire et la progression de la phase mobile (sous pression atmosphérique) entraîne avec elle les différentes fractions. Des fractions ont été recueillies progressivement avec une élution de polarité croissante, chloroforme, chloroforme/acétate d'éthyle (1/1 : v/v), acétate d'éthyle et enfin eau/acide formique (1/0,1 : v/v). Les fractions récupérées (séchées à l'air libre), ont fait l'objet d'une évaluation de l'activité anti-radicalaire (100 μ g/ml) et d'un fractionnement chromatographique.



Figure 20. Photographie représentant la chromatographie sur colonne.

III- Résultats et discussions

III-1- Extraction des composés phénoliques

Les procédés d'extraction des antioxydants phytochimiques à partir des plantes médicinales constituent une étape cruciale, car elle est déterminante de la qualité et de la quantité de principes actifs recherchés, qui reflètent directement leurs activités pharmacologiques.

Considérant la diversité et les propriétés structurales complexes de ces composés, notamment les composés phénoliques, il est impossible de mettre au point des méthodes exhaustives pour leur extraction (Vercauteren et *al.*, 1998). Ainsi, les conditions de l'extraction, à savoir le type du solvant, la taille des particules, l'état du matériel végétal (sec ou frais) et les conditions thermiques de l'extraction peuvent influencer significativement le taux et la nature des composés extraits (Naczki et Shahidi, 2006 ; Lim et Murtijaya, 2007).

Dans notre cas, avant de procéder à l'extraction, nous avons d'abord séché le matériel végétal à l'air libre et à l'abri de la lumière comme préconisé par Rijke et al (2006), afin d'éviter la dégradation de certains composés phénoliques sous l'effet des hydrolases qui peuvent exister dans le matériel végétal frais. Par la suite, la matière sèche retenue est réduite en poudre fine, pour augmenter la surface de contact avec le solvant et améliorer le rendement de l'extraction.

L'utilisation de l'éthanol comme solvant d'extraction de départ présente plusieurs avantages : Sa polarité fait qu'il est utilisé comme solvant par excellence pour l'extraction des composés phénoliques ; d'autre part il est moins altérant que le méthanol, qui peut exercer un effet de méthanolyse sur les tannins, pouvant perturber la teneur réelle des extraits en ces composés (Bruneton, 1999 ; Mueller-Harvey, 2001)

L'extrait éthanolique des feuilles de *P. lentiscus* présente le taux d'extraction le plus élevé (26 %), par rapport aux extraits de l'écorce et des feuilles de *F. angustifolia* avec des taux de 10,55 et 8,73%, respectivement (tableau IV). Ce résultat présume, au préalable, la richesse de cette plante en composés phénoliques.

Dans la deuxième étape, l'extraction liquide-liquide repose sur la répartition sélective des composés contenus dans l'extrait éthanolique retenu selon leur solubilité entre les phases organiques utilisés: acétate d'éthyle, chloroforme et hexane et leurs phases aqueuses correspondantes. Nous constatons que la majeure partie des composés de l'extrait éthanolique de l'écorce de *F. angustifolia* et les feuilles de *P. lentiscus* ont tendance à se retrouver dans l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, dont les taux d'extraction atteignent une moyenne de 80%, ce qui donne un signe de leur richesse en composés hydrosolubles. Par ailleurs, les composés de l'extrait éthanolique de feuilles de *F. angustifolia* sont répartis, presque équitablement, entre les deux phases.

L'extrait aqueux du chloroforme et d'hexane n'ont pas été récupérés à partir des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* suite à l'épuisement des composés hydrosolubles par la phase aqueuse de l'étape précédente de l'extraction, quant aux feuilles de *P. lentiscus*, ces extraits sont obtenus à des taux presque similaires à ceux de leurs phases organiques correspondantes (tableau IV).

A titre d'indication, les extraits obtenus lors des différentes étapes ont tous été séchés à température ambiante, afin d'éviter la détérioration de certains composés de structure sensible et instable comme la catéchine qui peut être détruite à des températures qui dépassent 35°C (Cacace et Mazza, 2001).

Tableau IV. Taux de l'extraction des extraits de *P. lentiscus* et *F. angustifolia*.

Extraits	Taux d'extraction (%*)		
	<i>P. lentiscus</i> Feuilles	Ecorce	<i>F. angustifolia</i> Feuilles
Ethanol	26,24	10,55	8,73
Acétate d'éthyle	18,33	12,75	56,65
Aqueux acétate d'éthyle	81,66	87,20	43,34
Chloroforme	49,16	70,28	82,93
Aqueux chloroforme	41,20	nd	nd
Hexane	54,66	28	60,48
Aqueux hexane	45,33	nd	nd

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

- nd : non déterminé.

III-2- Dosage des composés phénoliques

Il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques présents dans un extrait végétal brut. Néanmoins, une estimation peut être obtenue par différentes méthodes. La méthode de Folin-Ciocalteu est très sensible mais malheureusement peu spécifique, car beaucoup de composés réducteurs non phénoliques peuvent interférer tels que les caroténoïdes et la vitamine E (Kahkonen et al., 1999), cependant, elle reste la méthode la plus employée.

Pour le dosage des tannins, il existe aussi plusieurs méthodes, dont la plus spécifique est basée sur la précipitation des protéines par les tannins, car cette propriété est étroitement liée aux tannins seulement, sans qu'il y'ait d'autres interférents (Reed, 1995).

III-2-1- Dosage des phénols totaux

Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires (Bruneton, 1999 ; Macheix et *al.*, 2005). Cette propriété est prouvée par nos résultats de dosage des phénols totaux dont l'évaluation globale des teneurs des extraits en ces composés indique qu'ils sont plus concentrés dans les extraits éthanoliques ainsi que dans les extraits aqueux par rapport aux extraits organiques apolaires (chloroforme et hexane).

Suivant les taux de recouvrement de la première phase d'extraction, l'extrait éthanolique de feuilles de *P. lentiscus* confirme ce qu'a été déjà supposé concernant sa richesse en phénols totaux comparativement aux extraits éthanoliques de l'écorce et de feuilles de *F. angustifolia* (figure 21), mais il reste inférieur par rapport aux extraits aqueux d'hexane, aqueux du chloroforme et aqueux d'acétate d'éthyle de la même plante, qui marquent les taux les plus élevés ($P < 0,05$) avec des teneurs de 1675,81, 1328,28 et 822,15mg EAG/g d'extrait, respectivement. Goli et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que les extraits aqueux de feuilles de *P. vera* sont aussi les plus riches en phénols totaux par rapport aux différents solvants d'extraction qu'ils ont employé dans leur étude. D'autre part, *P. terebinthus*, une autre plante du même genre que *P. lentiscus*, a été aussi rapportée comme étant une source importante de composés phénoliques (Topçu et *al.*, 2007).

Concernant *F. angustifolia* (figure 21), à la première lecture des résultats de dosage des phénols totaux, nous constatons que tous les extraits de l'écorce sont plus riches par rapport à ceux des feuilles ($P < 0,05$). En effet, il a déjà été prouvé que la répartition des composés phénoliques au sein de la même plante varie d'une partie à une autre (Machier et *al.*, 2005).

Le taux des phénols totaux des extraits de l'écorce diminue progressivement de l'extrait éthanolique le plus élevée avec 572,47mg EAG/g jusqu'au taux le plus faible de l'extrait d'hexane avec 87,32mg EAG/g ($p < 0,05$).

Les extraits de feuilles de *F. angustifolia* sont relativement pauvres en phénols totaux, mais cela n'exclura pas sa richesse en la comparant à d'autres plantes médicinales. Li et ses collaborateurs (2007) ont classé *F. rhynchophylla* en deuxième place en terme de richesse en composés phénoliques parmi 45 plantes qu'ils ont étudié.

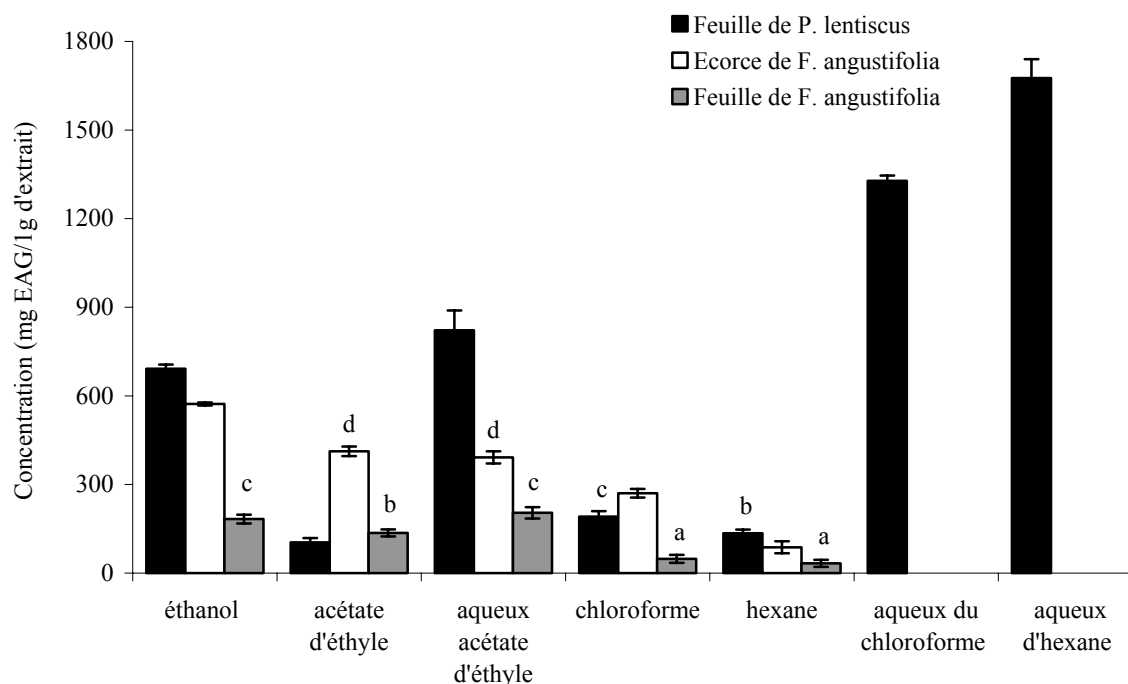


Figure 21. Teneurs en phénols totaux des extraits de *P. lentiscus* et *F. angustifolia*.

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

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

III-2-2- Dosage des tannins

Les activités pharmacologiques de *P. lentiscus* étant généralement attribuées aux tannins, les feuilles de cette plante sont rapportées par Gasmi-Boubaker et al. (2006) et Ammar et al. (2005) comme étant une source potentielle de ces composés, d'autre part, Weia et ses collaborateurs (2002) ont identifié 18 gallotannins à partir des feuilles de *P. weinmannifolia*. Dans notre étude, le dosage des tannins présenté dans la figure 22 réaffirme la richesse des feuilles de *P. lentiscus* en ces composés, notamment les extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle qui renferment les teneurs les plus élevées ($P < 0,05$) de 1239,11mg EAT/g et 1279,88mg EAT/g, respectivement ; les autres extraits sont marqués par des quantités moyennes avoisinant 650 mg EAT/g.

Contrairement aux résultats des phénols totaux où les feuilles de *F. angustifolia* en sont pauvres, les tannins y sont concentrés, surtout au niveau des extraits organiques (figure 22) avec les taux les plus élevés ($P < 0,05$), tandis que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle est marqué par le taux le plus faible (56,66 mg EAT/g) ($P < 0,05$). Cette dernière remarque pourrait être expliquée par l'insolubilité des tannins, en particulier les tannins condensés à haut poids moléculaire dans

les solutions aqueuses (Reed et *al.*, 1995 ; Cheynier, 2005). Des résultats précédents, il en ressort que les extraits de l'écorce exhibent les taux les plus faibles ($P < 0,05$) en tannins.

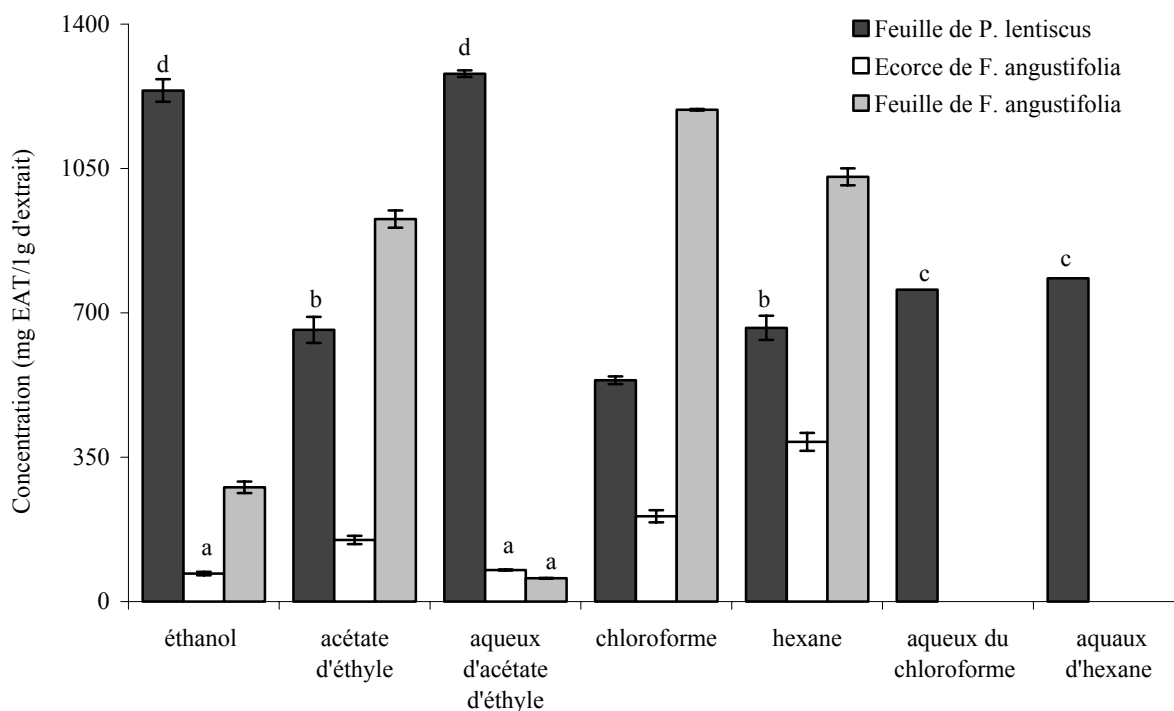


Figure 22. Teneurs en tannins des extraits de *P. lentiscus* et *F. angustifolia*.

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

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

III-2-3- Dosage des flavonoides

Les flavonoides constituent le groupe le plus hétérogène des composés phénoliques, répartis dans différentes classes dont certaines sont solubles dans les solvants polaires, tandis que d'autres sont solubles dans les solvants apolaires (Macheix et *al.*, 2005). La figure 23 montre que les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* sont les plus riches en flavonoides ($P < 0,05$), suivis par les extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle de la même plante. Parmi les extraits des feuilles de *F. angustifolia*, l'aqueux d'acétate d'éthyle a aussi exhibé autant de flavonoides (figure 23). Les taux les plus faibles sont observés dans les extraits apolaires (hexane et chloroforme) ($P < 0,05$) pour les feuilles des deux plantes, ce qui n'est pas le cas de l'écorce de *F. angustifolia*, dont la teneur la plus élevée en flavonoides est obtenue dans les extraits du chloroforme et d'acétate d'éthyle.

De cette présente analyse, on déduit que les extraits des feuilles de *P. lentiscus* et de *F. angustifolia* sont plutôt riches en flavonoides polaires, ce qui n'est pas le cas des extraits de l'écorce

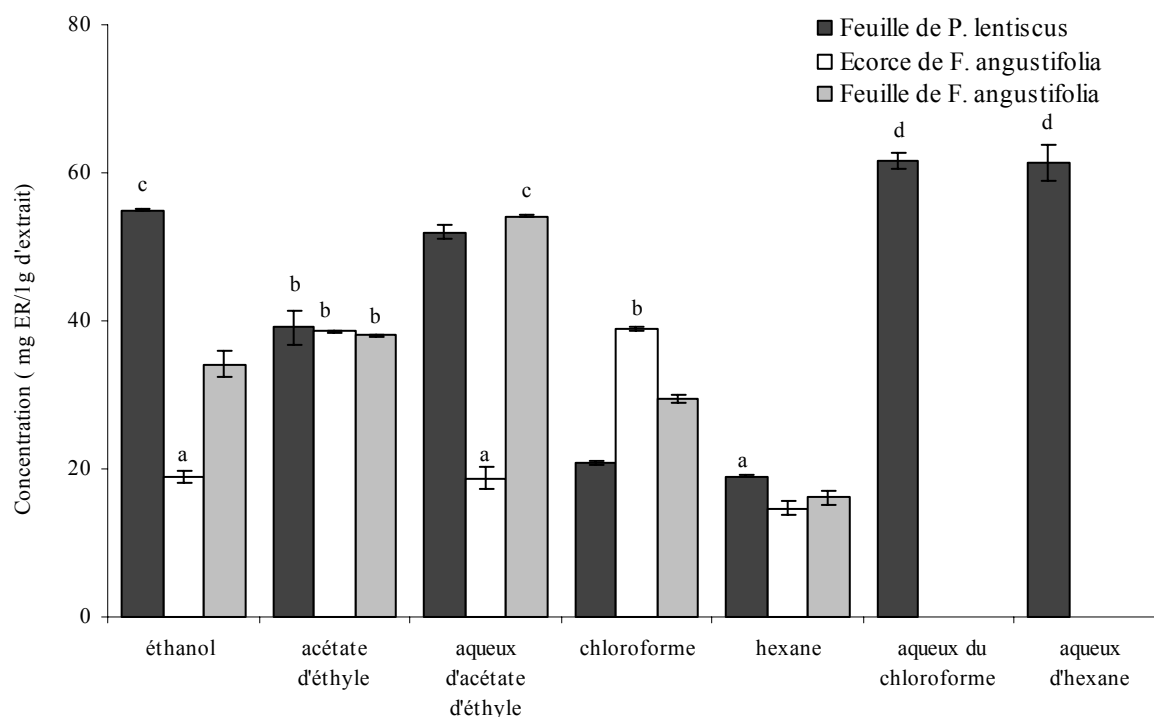


Figure 23. Teneurs en flavonoides des extraits de *P. lentiscus* et *F. angustifolia*.

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

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

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

Les extraits organiques de feuilles de *P. lentiscus* ont exhibé de puissants effets svacengers contre le radical DPPH à 100 μ g/ml (figure 24). Les effets des extraits du chloroforme et d'hexane, les plus importants, sont comparables à celui de l'acide ascorbique ($P < 0,05$), suivis par les extraits éthanolique et d'acétate d'éthyle avec des taux de 90,87 et 90,93%, significativement plus élevés que les autres standards testés ($P < 0,05$). Topçu et ses collaborateurs (2006) ont rapporté que les deux extraits organiques du méthanol et d'acétone des fruits de *P. terebinthus* ont des effets anti-radicalaires contre le DPPH de 93% et 74%, respectivement à 100 μ g/ml. Par contre, Samarth et Krishna (2007) ont démontré que l'extrait méthanolique des feuilles de *P. chinensis*, même à 125 μ g/ml, n'a exhibé qu'une modeste activité anti-radicalaire (30,12%). Ces résultats pourraient s'expliquer par les différences interspécifiques, de sol ou de climat.

De ces résultats nous constatons que, à l'exception de l'extrait éthanolique, les extraits organiques de feuilles de *P. lentiscus* biens qu'ils soient relativement pauvres en phénols totaux, ils expriment une activité anti-radicalaire assez importante. Cette remarque nous rappelle l'effet anti-radicalaire que pourrait exercer les unités oligomériques des tannins condensés et

hydrolysables, qui sont des composés polymériques doués d'un un potentiel anti-radicalaire plus prononcé par comparaison à leurs éléments monomériques, tels que l'acide gallique et la catéchine. Cette propriété est expliquée par la présence des groupements hydroxyles supplémentaires sur les parties galloyls de ces oligoéléments (Soobrattee et *al.*, 2005 ; Cai et *al.*, 2006).

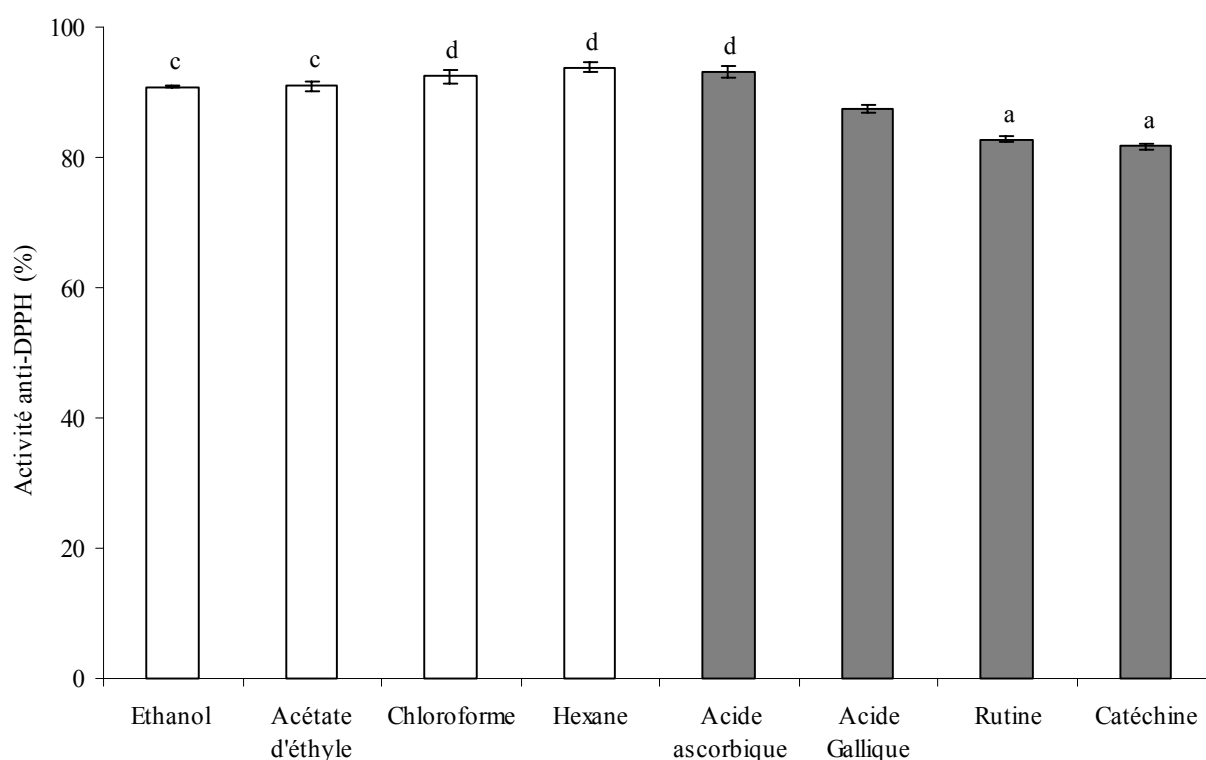


Figure24. Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits organiques de feuilles de *P. lentiscus* et certains standards à 100 µg/ml.

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

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

L'activité anti-radicalaire des extraits aqueux à la concentration de 100µg/ml est aussi intéressante autant que celle des extraits organiques (tableau V). Le effet des extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane, qui est de 93,34 et 92,92 % respectivement, est supérieur que celui de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, l'acide gallique, la catéchine et de la rutine ($P < 0,05$) (figure 25).

Ce résultat s'expliquerait non seulement par la richesse des extraits aqueux en phénols totaux, mais aussi par la nature de leurs composés phénoliques hydrosolubles. Ces composés sont caractérisés par la présence des groupements hydroxyles qui jouent un rôle primordial dans l'activité anti-radicalaire (Robards et *al.*, 1999).

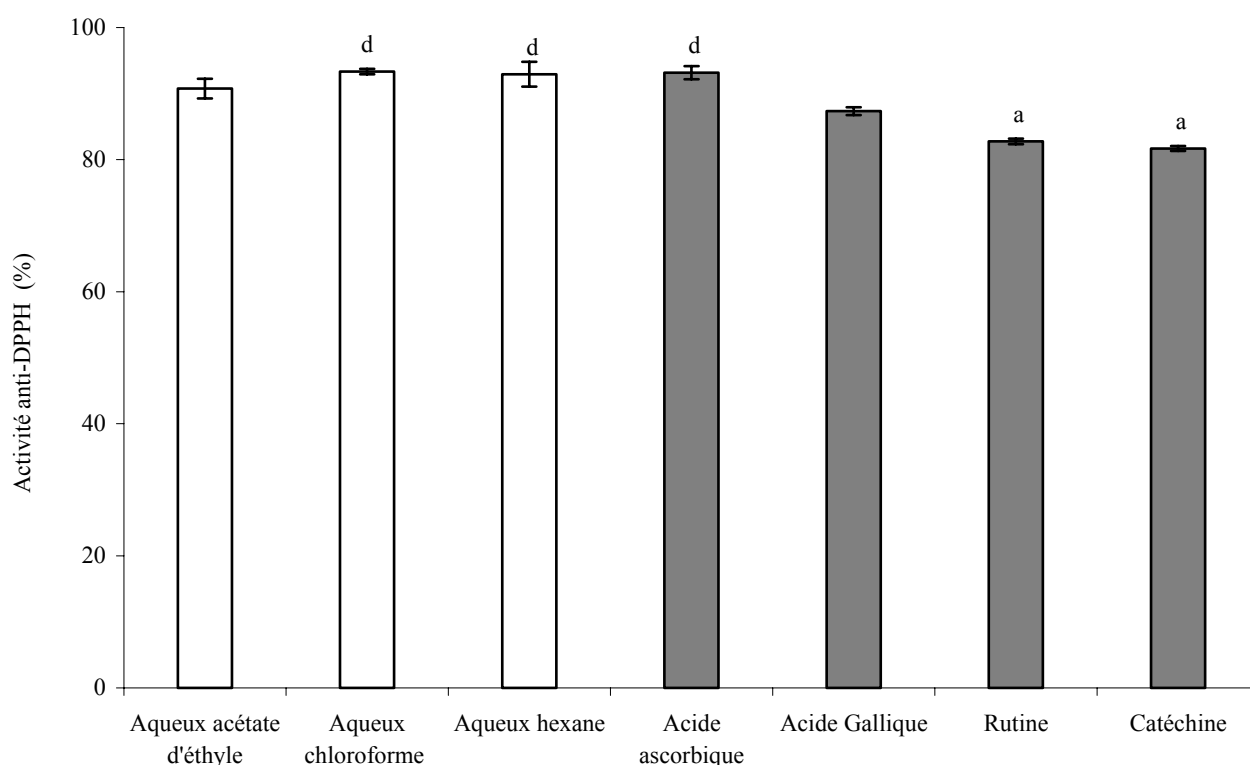


Figure 25. Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits aqueux des feuilles de *P. lentiscus* et certains standards à 100 $\mu\text{g/ml}$.

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

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

La figure 26 montre l'activité anti-radicalaire contre le DPPH des extraits de l'écorce et de feuilles de *F. angustifolia* à 100 $\mu\text{g/ml}$. Les extraits aqueux d'acétate d'éthyle des feuilles et de l'écorce ainsi que les extraits ethanologiques et acétate d'éthyle de cette dernière exhibent une activité moyennant 87%, similaire à celle de l'acide gallique ($P < 0,05$). D'autre part, Samarth et Krishna (2007) ont rapporté un effet anti-radicalaire considéré faible (57,5%) à une concentration de 1g/ml, pour l'extrait éthanologique des feuilles de *F. griffithii*. Les extraits du chloroforme et d'hexane des deux parties étudiées de *F. angustifolia*, marqués par les teneurs les plus faibles en phénols totaux, sont peu actifs ($P < 0,05$) sur le radical DPPH.

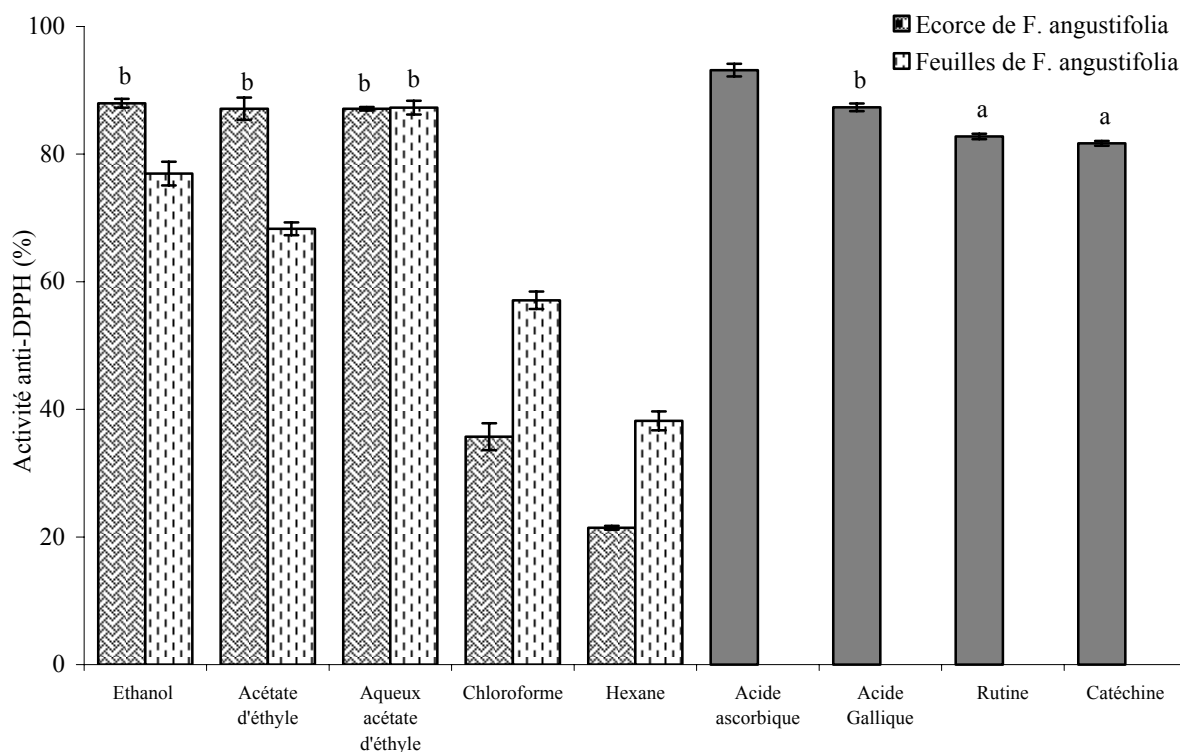


Figure 26. Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits de l'écorce, de feuilles de *F. angustifolia* et certains standards à 100 μ g/ml.

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

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

Pour conclure, d'après le tableau V ci-dessous, il en ressort que l'effet exprimé par les extraits de *P. lentiscus* est le plus fort avec une moyenne qui dépasse 90%, une valeur supérieure même à celle des standards (acide gallique, rutine et acide tannique) (tableau VI). D'autre part, l'écorce et les feuilles de *F. angustifolia* ont manifesté aussi des effets relativement importants, notamment au niveau des trois premiers extraits, allant de 68 à 87%.

Tableau V. Activité anti-radicalaire contre le DPPH à 100 μ g/ml des extraits de *P. lentiscus*, *F. angustifolia*.

Extraits	Effet scavenger (%)		
	<i>P. lentiscus</i> Feuilles	<i>F. angustifolia</i> Ecorce	<i>F. angustifolia</i> Feuilles
Ethanol	90,87 \pm 0,20b	87,96 \pm 0,68a	76,94 \pm 1,84
Acétate d'éthyle	90,93 \pm 0,77b	87,11 \pm 1,74a	68,29 \pm 1,00
Aqueux acétate d'éthyle	90,74 \pm 1,48b	87,11 \pm 0,27a	87,53 \pm 1,07a
Chloroforme	92,40 \pm 1,12c	35,70 \pm 2,10	57,09 \pm 1,37
Aqueux chloroforme	93,34 \pm 0,41c	nd	nd
Hexane	93,80 \pm 0,69c	21,44 \pm 0,29	38,18 \pm 1,47
Aqueux hexane	92,92 \pm 1,87c	nd	nd

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

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

-nd : non déterminé.

Tableau VI. Activité anti-radicalaire contre le DPPH à 100µg/ml des standards.

Standards	Effet scavenger (%)
A. ascorbique	93,15±0,98
A. gallique	87,33±0,59
Catéchine	81,68±0,37a
Rutine	82,76±0,41a

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

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

III-4- Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH à différentes concentrations

Les extraits ayant exprimés des effets importants (>50%) ainsi que les molécules de référence ont été testés sur une gamme de concentrations selon leur efficacité anti-radicalaire, dans le but d'exprimer les résultats en terme d'IC₅₀. Les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (Villano et al., 2007). Nos résultats indiquent que les IC₅₀ calculées pour l'acide ascorbique, l'acide gallique et la catéchine sont comparables à celles rapportées par plusieurs auteurs (Schmeda-Hirschmann et al., 2003; Kumaranan et karunakaran 2006; Abdelwahed et al., 2007; Rakic et al., 2007), ce qui rassure de la fiabilité de la comparaison de nos extraits.

Les résultats de la figure 27 nous montrent que l'effet anti-radicalaire des extraits d'acétate d'éthyle, du chloroforme et d'hexane des feuilles de *P. lentiscus*, à différentes concentrations, diminuent jusqu'à atteindre les taux les plus bas à 10µg/ml, exprimant ainsi des IC₅₀ proches (P<0,05) de 46,98, 47,49 et 47,66 µg/ml, respectivement, qui sont loin d'être comparables aux IC₅₀ des standards et de l'extrait éthanolique (p<0,05). Ce dernier a exceptionnellement maintenu son activité stable jusqu'à la concentration de 25µg/ml à partir de laquelle l'effet anti-radicalaire commence à diminuer pour atteindre le taux le plus bas (2%) à 2µg/ml. Cette exception fait que l'extrait éthanolique manifeste une IC₅₀ de 6,80 µg/ml, reflétant ainsi un potentiel anti-radicalaire important. Chryssavgi et al. (2007) ont rapporté une IC₅₀ de 7,07µg/ml pour l'extrait méthanolique de feuilles de *P. lentiscus*, un résultat assez proche du notre, surtout qu'il correspond à la même période de récolte.

Par ailleurs, *P. chinensis* qui exprime une IC₅₀ de 272µg/ml (Samarth et Krishna, 2007) est peu active par rapport aux extraits de notre plante, bien qu'elle soit classée la meilleure en terme d'activité anti-DPPH parmi les 15 plantes étudiées par ces auteurs.

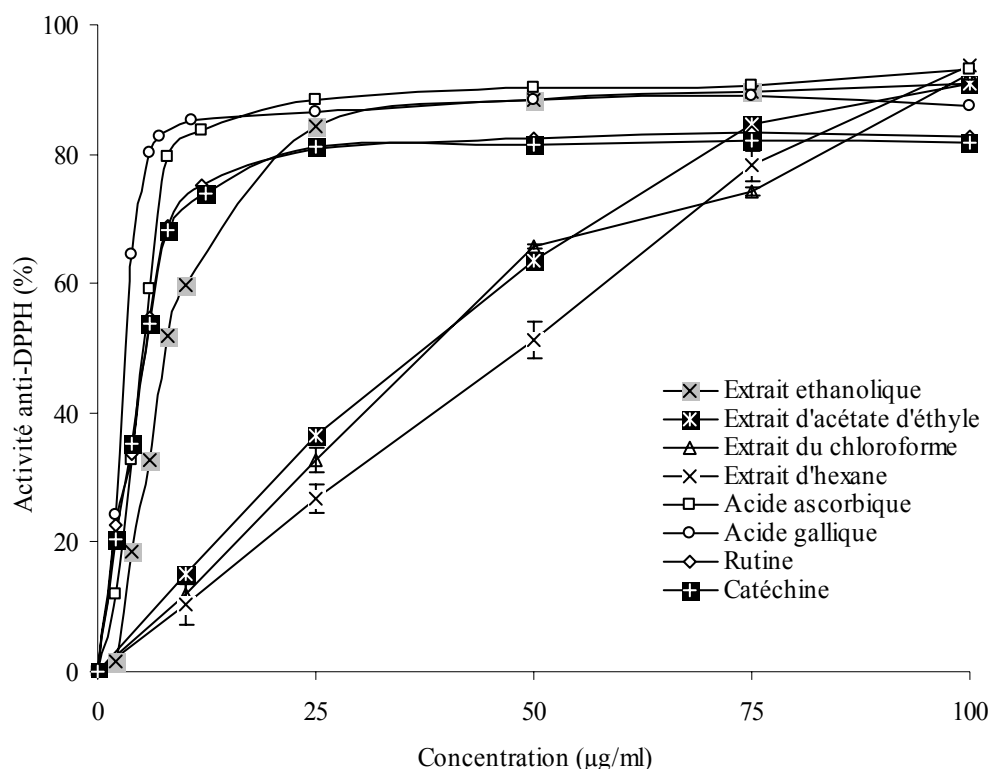


Figure 27. Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits organiques de feuilles de *P. lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

Contrairement aux phases organiques, les phases aqueuses, étant les plus riches en composés phénoliques, elles ont toutes gardé leur effet stable jusqu'à la concentration de 10 µg/ml. Lors de la deuxième série de dilution (10, 8, 6, 4, 2 µg/ml), nous constatons que la régression de la courbe arrive aux taux les plus faibles à la concentration de 2 µg/ml (figure 28).

De ce fait, les extraits aqueux d'hexane et du chloroforme manifestent des IC_{50} de 2,89 et 3,08 µg/ml, respectivement, qui sont comparables ($P < 0,05$) à celles de l'acide gallique, de la catéchine et de la rutine (voir tableau V), tandis que celle de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle est identique à celle de l'extrait éthanolique (6,45 µg/ml). D'après ces résultats, on conclut que les extraits aqueux de feuilles de *P. lentiscus* possèdent un potentiel anti-radicalaire hautement appréciable contre le radical DPPH.

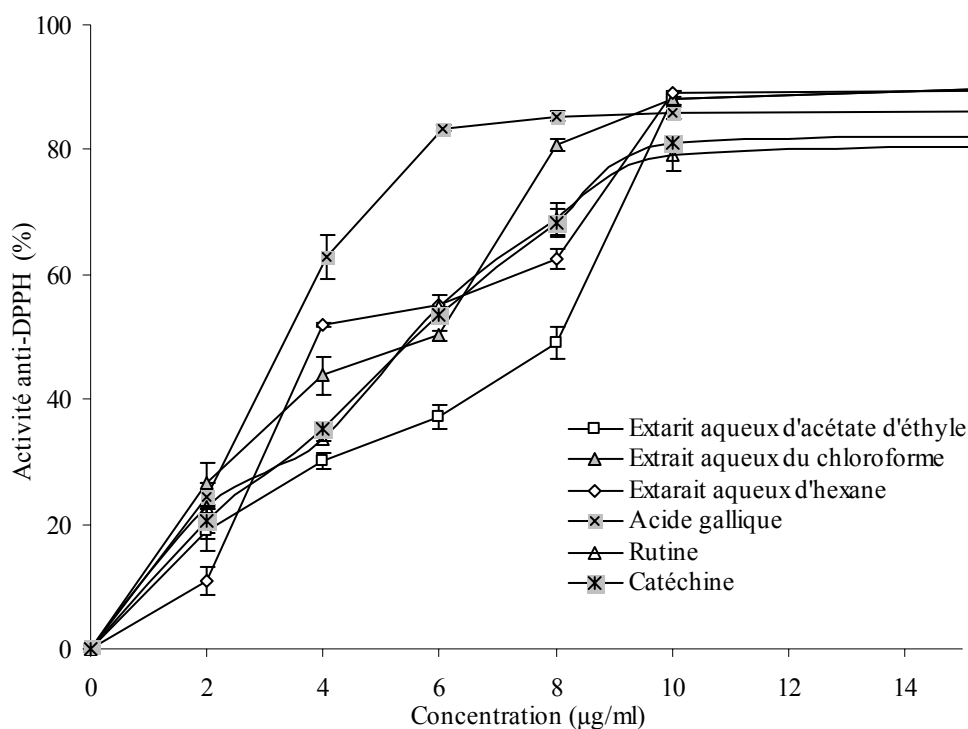


Figure 28. Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits aqueux de feuille de *P. lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

D'après les figures suivantes (29 et 30), nous constatons que l'effet de la dilution sur les extraits de l'écorce commence à partir de la concentration de $75\mu\text{g/ml}$, tandis que l'effet des extraits de feuilles, notamment celui de l'extrait du chloroforme, a sensiblement diminué à cette concentration. D'autre part, les valeurs minimales de l'écorce, à $10\mu\text{g/ml}$, ont atteint une moyenne supérieure à 20% alors que les extraits de feuilles ont des effets inférieurs à cette moyenne, indiquant que le potentiel anti-radicalaire de l'écorce est plus important que celui des feuilles (tableau VII).

Les IC_{50} élevées ($>100\mu\text{g/ml}$) qui reflètent des effets anti-radicalaires faibles sont celles de l'extrait de l'hexane des feuilles et les extraits d'hexane et du chloroforme de l'écorce (tableau VII). Des IC_{50} largement supérieurs à $100\mu\text{g/ml}$ ont été rapportées par Han et ses collaborateurs (2004) sur les feuilles de *F. mandshurica* et par Samarth et Krishna (2007) sur les feuilles de *F. griffithii*. Aussi, l' IC_{50} de l'extrait du chloroforme ($82,73\mu\text{g/ml}$) des feuilles de *F. angustifolia* est comparable à celle rapportée par Han et ses collègues (2004) sur les feuilles de *F. rhynchophylla* ($70\mu\text{g/ml}$). Les autres extraits caractérisés par des IC_{50} qui varient de 28 à $59\mu\text{g/ml}$ indiquent que les feuilles et l'écorce de *F. angustifolia* sont peu actifs par rapport aux feuilles de *Jasminum grandiflorum*, une plante médicinale appartenant à la même famille et qui exprime une IC_{50} de $15\mu\text{g/ml}$ (Umamaheswari et al., 2007).

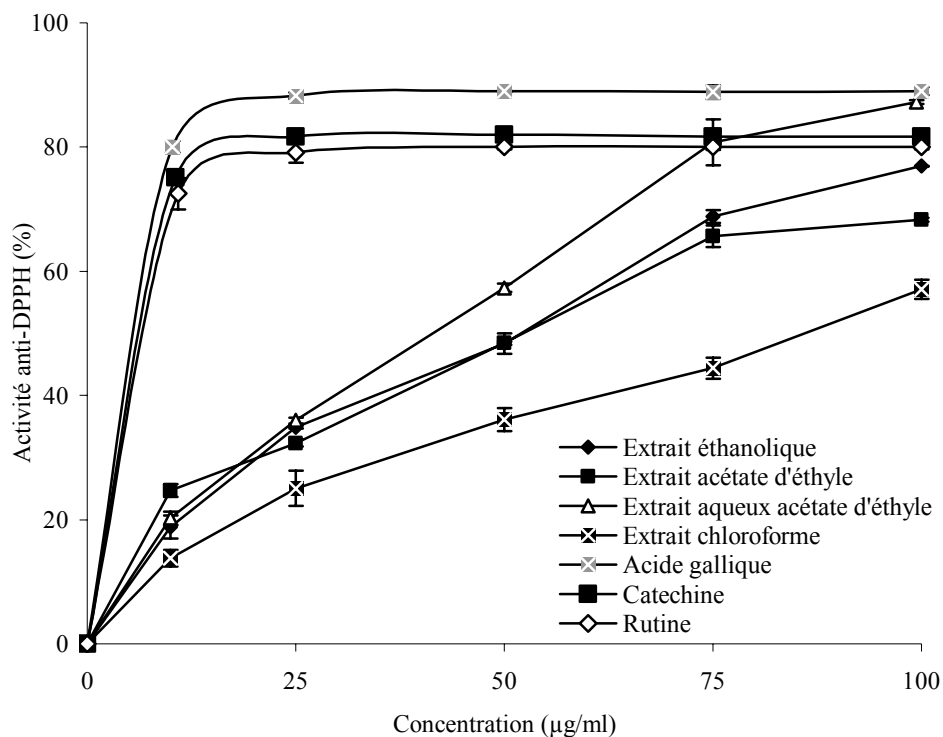


Figure 29. Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits de feuilles de *F. angustifolia* et certains standards à différentes concentrations.

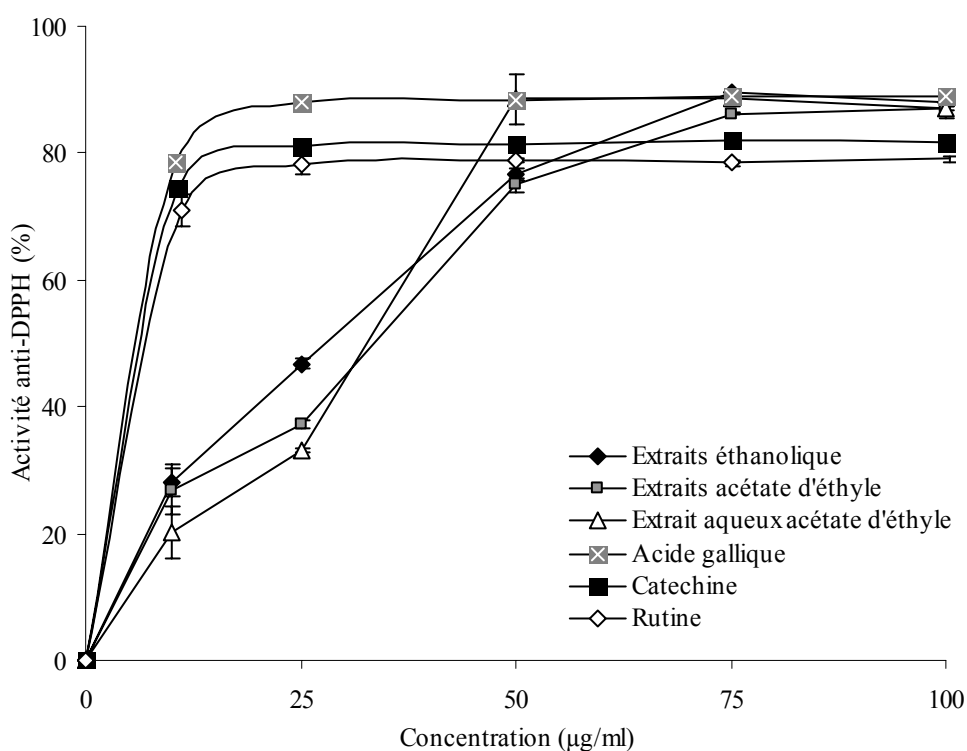


Figure 30. Effet scavenger contre le radical DPPH des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* et certains standards à différentes concentrations.

Comparativement aux standards, d'après les résultats rapportés dans le tableau VIII, les IC₅₀ qui expriment le potentiel anti-radicalaire le plus important sont celles des extraits aqueux d'hexane et chloroforme des feuilles de *P. lentiscus*, suivis par celles des extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle (6µg/ml) de la même plante (tableau VII). Pour le reste des extraits, leurs IC₅₀ varient de 28µg/ml pour l'extrait éthanolique de l'écorce aux IC₅₀ les plus élevées (>100µg/ml) des feuilles et l'écorce de *F. angustifolia*. Ces résultats se justifieraient par les teneurs variables et la diversité des molécules contenues d'un extrait à un autre.

Tableau VII. Détermination des IC₅₀ des extraits de *P. lentiscus* et *F. angustifolia*.

Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)		
	<i>P. lentiscus</i> Feuilles	Ecorce	<i>F. angustifolia</i> Feuilles
Ethanol	6,45 ± 0,59b	28,75 ± 5,83	54,46 ± 2,38
Acétate d'éthyle	46,98 ± 0,45d	40,90 ± 1,36c	59,32 ± 3,35
Aqueux acétate d'éthyle	6,08 ± 0,45b	40,16 ± 0,26c	46,87 ± 1,89d
Chloroforme	47,66 ± 0,33d	>100	82,73 ± 3,31
Aqueux chloroforme	3,08 ± 0,6a	nd	nd
Hexane	47,39 ± 0,15d	>100	>100
Aqueux hexane	2,89 ± 0,6a	nd	nd

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

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

-Nd : non déterminé.

Tableau VIII. Détermination des IC₅₀ des standards.

Standards	IC ₅₀ (µg/ml)
A. ascorbique	4,8 ± 0,38
A. gallique	2,86 ± 0,73a
Catéchine	3,7 ± 0,24
Rutine	3,42 ± 0,56a

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

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

III-5- Corrélations

III-5-1- Corrélation entre l'activité anti-radicalaire et les teneurs en phénols totaux

L'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH des deux plantes étudiées serait étroitement liée à leurs teneurs en phénols totaux d'après le tableau IX qui montre des coefficients de corrélation de 0,91, 0,95 et de 0,89 pour les feuilles de *P. lentiscus* et les feuilles et l'écorce de *F. angustifolia* respectivement. Il a été rapporté par plusieurs auteurs que les

composés phénoliques sont les antioxydants majoritaires des extraits de plantes médicinales (Cai et al., 2004, Wong et al., 2006). Cependant, l'utilisation des extraits bruts n'épargne pas l'effet anti-radicalaire que pourrait exercer des composés antioxydants non phénoliques, tels que l' α -tocophérol et les huiles essentielles (triterpènes) trouvés respectivement par Kyvcak et Akay (2005) et Dedoussis et al. (2004) au niveau des feuilles de *P. lentiscus*.

III-5-2- Corrélation entre l'activité anti-radicalaire et les teneurs en flavonoides

Le tableau IX qui révèle des coefficients de corrélation ($r=0,91$ et $r=0,92$) des extraits de feuilles de *P. lentiscus* et *F. angustifolia*, respectivement, indique que l'effet anti-radicalaire contre le radical DPPH est proportionnel à leurs teneurs en flavonoides (tableau IX), ce qui suggère leur implication dans cet effet.

Cependant, ce n'était pas le même cas pour les extraits de l'écorce qui affichent un coefficient faible de 0,043 (tableau IX). Un tel résultat déjà rencontré dans la littérature est interprété par Dawidowicz et al. (2006) par le fait que la solution n'est pas pure et la présence d'autres composés de nature antioxydant pourrait interférer. D'autre part, Miliauska et al. (2004) indique que la richesse d'un extrait en flavonoides n'implique pas forcément un effet anti-radicalaire important; en justifiant que seules certaines catégories de flavonoides sont douées de cette activité.

III-5-3- Corrélation entre l'activité anti-radicalaire et les teneurs en tannins

La corrélation entre l'effet anti-DPPH des extraits de feuilles de *P. lentiscus* et leurs teneurs en tannins est de 0,59, suggérant probablement un rôle modeste des tannins. D'autre part, les corrélations négatives ($r=-0,81$ et $r=-0,90$) concernant les extraits des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia*, respectivement montrent que l'effet anti-radicalaire contre le radical DPPH est inversement proportionnel aux teneurs en tannins. Ce résultat s'expliquerait par le fait que les tannins, à des concentrations élevées, peuvent interagir entre eux et réduit par conséquent la disponibilité des fonctions hydroxyles des groupements galloyles impliqués dans cette activité.

Tableau IX. Corrélation entre l'effet anti-radicalaire et les teneurs des extraits en composés phénoliques.

	Facteur de corrélation (R*)			
	<i>P. lentiscus</i>		<i>F. angustifolia</i>	
	Feuilles	Feuilles	Ecorce	
Phénols totaux	0,91	0,95	0,89	
Flavonoides	0,91	0,92	0,043	
Tannins	0,59	- 0,81	-0,90	

-* : Les corrélation des extraits de feuilles de *P. lentiscus* sont établies avec l'activité anti-radicalaire à la concentration de 10 μ g/ml.

-Pour plus de détails voir annexe (2).

III-6- Caractérisation chromatographique de l'activité anti-radicalaire

Les résultats précédents indiquent que les composés phénoliques comme étant les antioxydants majoritaires des extraits bruts des plantes étudiées, mais sans parvenir à attribuer cet effet à un composé phénolique bien déterminé ou à plusieurs composés.

Dans cette partie, l'utilisation de la chromatographie sur couche mince permettra, non seulement, le fractionnement des différents extraits, mais aussi elle présente l'avantage de mettre en évidence l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH en visualisant directement les fractions responsables de cet effet sous forme de taches jaunes.

D'autre part, pour écarter l'effet des composés antioxydants de nature non phénoliques tels que l' α -tocophérol et certaines résines (triterpènes) auxquels les auteurs; Kivcak et Akay (2005) et Assimopoulou et al. (2005); attribuent un effet antioxydant considérable au niveau des feuilles de *P. lentiscus*, nous avons appliqué des systèmes de séparation conçus pour la séparation des composés phénoliques qui sont l'objectif de notre étude.

III-6-1- Caractérisation de l'activité anti-radicalaire des feuilles de *P. lentiscus*

III-6-1-2- Caractérisation de l'activité anti-radicalaire des extraits organiques

Selon la figure 31, la comparaison des chromatogrammes des extraits organiques des feuilles de *P. lentiscus* indique qu'à l'exception de l'extrait éthanolique qui révèle la fraction F_0 en plus, les autres fractions (F_1 , F_2 et F_3) sont partagées en commun entre ces extraits, après vérification de leur RF et leur couleur à la lumière du jour (tableau X). Comme nous avons remarqué aussi, que les fractions F_2 et F_3 ont migré au même niveau que celui des dérivés issus de l'hydrolyse acide de l'acide tannique.

En fait, le système de séparation (Acétate d'éthyle- Acide formique- Acide acétique- Eau : EA-AF-AAc-H₂O) que nous avons appliqué exerce selon Andriambelson et al (1998) une hydrolyse acide sur les formes complexes telles que les tannins (tannins hydrolysables), permettant ainsi la migration des unités issues de cet effet. L'acide tannique (penta-galloylglucose) en est l'exemple de cette évidence, dont le chromatogramme (figure 31) révèle trois fractions qui ont migré différemment en fonction de leur solubilité et leur poids moléculaires. Ces dérivés (F_1 , F_2 et F_3) pourraient correspondre aux dérivés galloyls et l'acide gallique ; en effet, le RF et la couleur de la F_3 sont similaires à ceux de l'acide gallique utilisé comme standard sur la même plaque (figure 31).

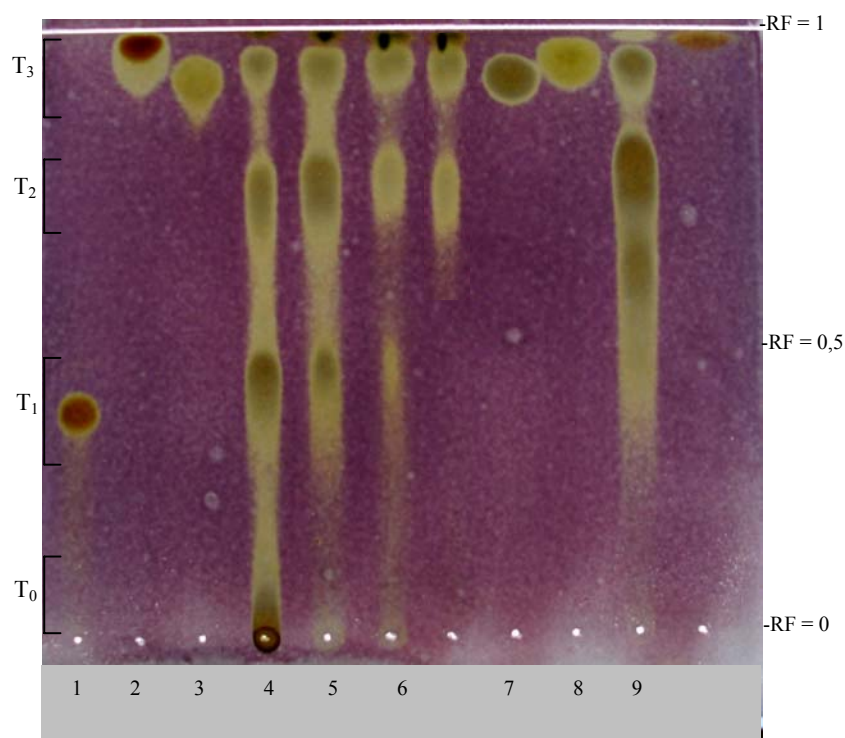


Figure 32. Chromatogrammes des extraits organiques de feuilles de *P. lentiscus* pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H₂O). **1)** Rutine. **2)** Catéchine. **3)** Quercétine. **4)** Extrait éthanolique. **5)** Extrait d'acétate d'éthyle. **6)** Extrait du chloroforme. **7)** Acide gallique. **8)** Acide caféïque. **9)** Acide tannique.

Table X. Caractéristiques des chromatogrammes des extraits organiques de feuilles de *P. lentiscus*.

Fractions	Rapports frontaux	Observation à la lumière du jour	Effet contre le DPPH
F ₀	0 - 0,20	Gris foncé	+++
F ₁	0,30 - 0,45	Gris foncé	++++
F ₂	0,70 - 0,80	Grise foncé	++++
F ₃	0,90 - 0,98	Gris	++

- Le nombre des signes (+) est proportionnel à l'intensité de la décoloration et à l'effet anti-DPPH.
- Les fractions sont tous invisibles sous U-V (250nm).

III-6-1-2- Caractérisation de l'activité anti-radicalaire des extraits aqueux

Les chromatogrammes observés à la lumière du jour soulèvent la remarque sur la diversité et la richesse des extraits aqueux du chloroforme et d'hexane par rapport aux extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle (figure 33). Ces deux derniers sont les seuls à mettre en évidence la présence de F₀ pour les feuilles de *P. lentiscus*, cette fraction pourrait correspondre à des composés à haut poids moléculaire qui n'a pas pu être éluée par ce système. Les différentes caractéristiques, couleur à la lumière du jour, RF et révélation avec la vanilline sulfurique sont rassemblés dans le tableau XI.

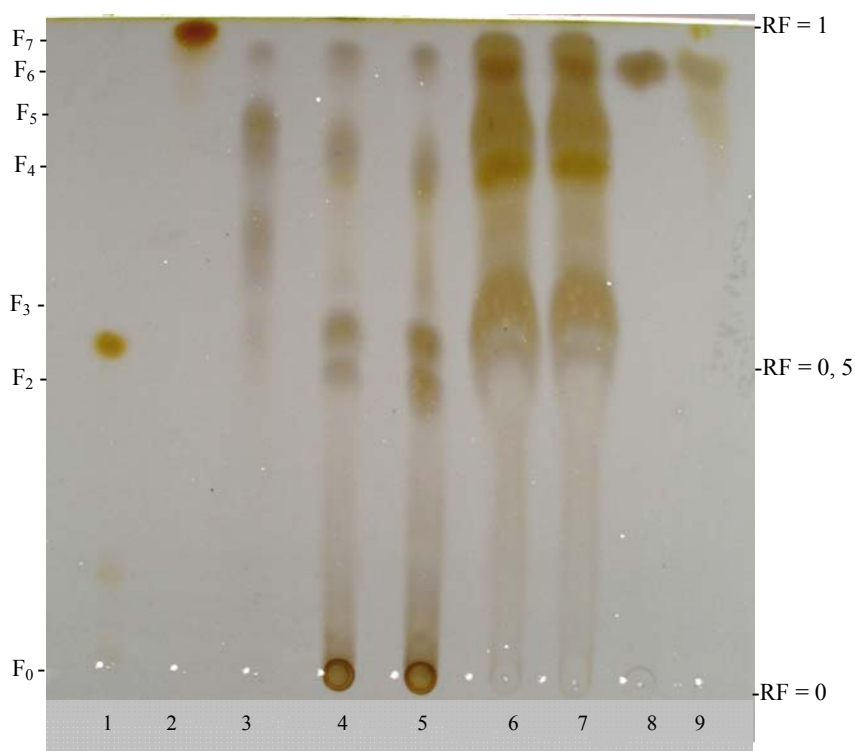


Figure 33. Chromatogrammes des extraits aqueux de feuilles de *P. lentiscus* à la lumière du jour avec le système de séparation (EA- AF- AAc- H₂O). **1)** Rutine. **2)** catéchine. **3)** Acide tannique. **4)** Extrait éthanolique. **5)** Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. **6)** Extrait aqueux du chloroforme. **7)** Extrait aqueux d'hexane. **8)** Acide gallique. **9)** Acide caféique.

La révélation avec la vanilline sulfurique (figure 34) a mis en évidence le même nombre de fractions révélées à la lumière du jour qui apparaissent sous différentes couleurs (tableau XI).

Les chromatogrammes des extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle, comme nous l'avons signalé précédemment, marquent la présence de F₀ qui pourrait correspondre aux tannins non hydrolysables, d'après sa couleur rouge avec la vanilline. En effet, d'après Mueller-Harvey (2001), cette couleur est caractéristique de la famille des tannins condensés.

Les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane ont exprimé avec ce révélateur des fractions bien distinctes de celles révélées à la lumière du jour et ils ont confirmé leur richesse en divers composés phénoliques. Les deux fractions (F₆ et F₇) peuvent correspondre à la catéchine et l'acide gallique, respectivement. En effet, ce dernier est déjà mis en évidence au niveau des extraits organiques de cette plante d'après Abdelwheb et al. (2006). Quant à la fraction (F₆), elle correspondrait à la catéchine car elle est caractérisée par un RF (0,90) et une couleur rouge similaires aux propriétés de la catéchine (standard), conformément aux données de Mueller-Harvey (2001).

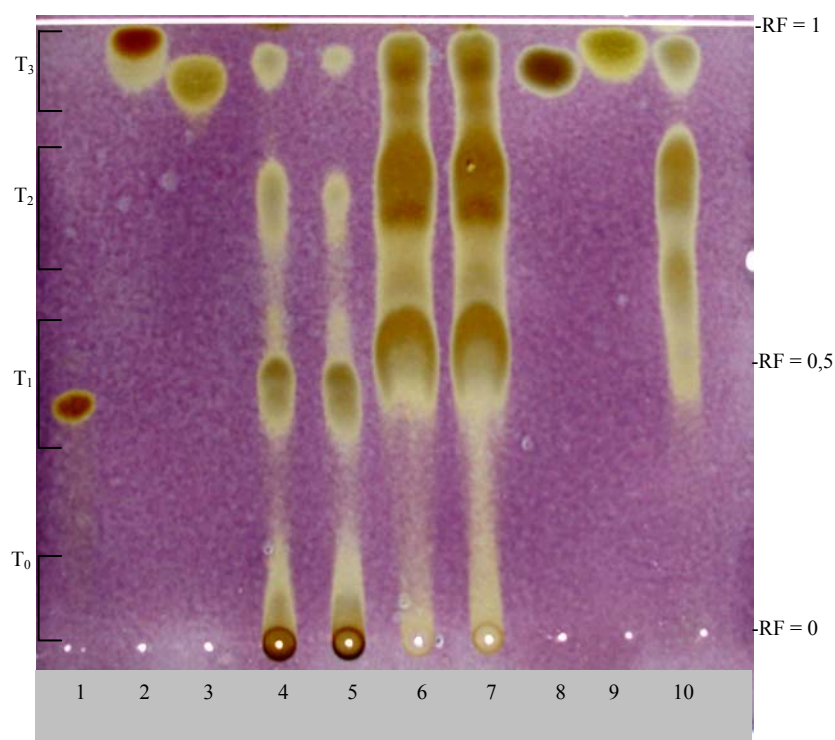


Figure 35. Chromatogrammes des extraits aqueux de feuilles de *P. lentiscus* pulvérisés par la solution DPPH avec le système (EA- AF- AAc- H₂O). 1) Rutine. 2) Catéchine. 3) Quercétine. 4) Extrait éthanolique. 5) Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. 6) Extrait aqueux du chloroforme. 7) Extrait aqueux d'hexane. 8) Acide gallique. 9) Acide caféique. 10) Acide tannique.

Table XI. Caractéristiques des chromatogrammes des extraits aqueux de feuilles de *P. lentiscus*.

Fractions	Rapports frontaux	Observation à la lumière du jour	Révélation par la vanilline sulfurique	Effet contre le DPPH
F ₀	0	Grise foncée	Rouge	+++
F ₁	0,18	Grise	Pourpre	++
F ₂	0,45	Grise foncée	Grise	++++
F ₃	0,55	Grise foncée	Pourpre	++++
F ₄	0,70	Grise foncée	Orange	++++
F ₅	0,85	Grise foncée	Grise	++++
F ₆	0,90	Grise	Rouge	++++
F ₇	0,98	Grise	Grise	++++

- Le nombre des signes (+) est proportionnel à l'intensité de la décoloration et à l'effet anti-DPPH.

- Les fractions sont tous invisibles sous UV (250nm).

- F₀ n'est exprimé que par l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle.

III-6-2- Caractérisation de l'activité anti-radicalaire de l'écorce de *F. angustifolia*

L'analyse de l'effet anti-radicalaire des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* est initialement portée sur le système de séparation (Chloroforme-Méthanol-Eau-Acide acétique : Chlor-Méth-H₂O-Aac), un système adopté par Dohou (2003) dans le but de séparer les composés phénoliques aglycones souvent rapportées comme étant d'importants agents scavengers naturels.

Les résultats de la révélation avec la vanilline sulfurique sont présentés dans la figure 36. Les fractions F₀ et F₁ réparties entre les trois extraits peuvent correspondre à des formes complexes de composés phénoliques. Par contre, les fractions à partir de F₃ jusqu'à F₁₀ correspondraient à des acides phénoliques simples en raison de leur couleur bleuâtre reflétée sous UV (250 nm) en se référant à Misirli et Ozeker (1998).

La fraction F₄ serait probablement l'acide caféique vu son RF et sa couleur similaire sous UV et à la vanilline sulfurique avec l'acide caféique. Un dérivé de cet élément, l'ester de l'acide caféique, est déjà purifié par Iossifova et al. (1999) à partir de l'écorce de *F. ornus*, une plante de la même famille que la notre.

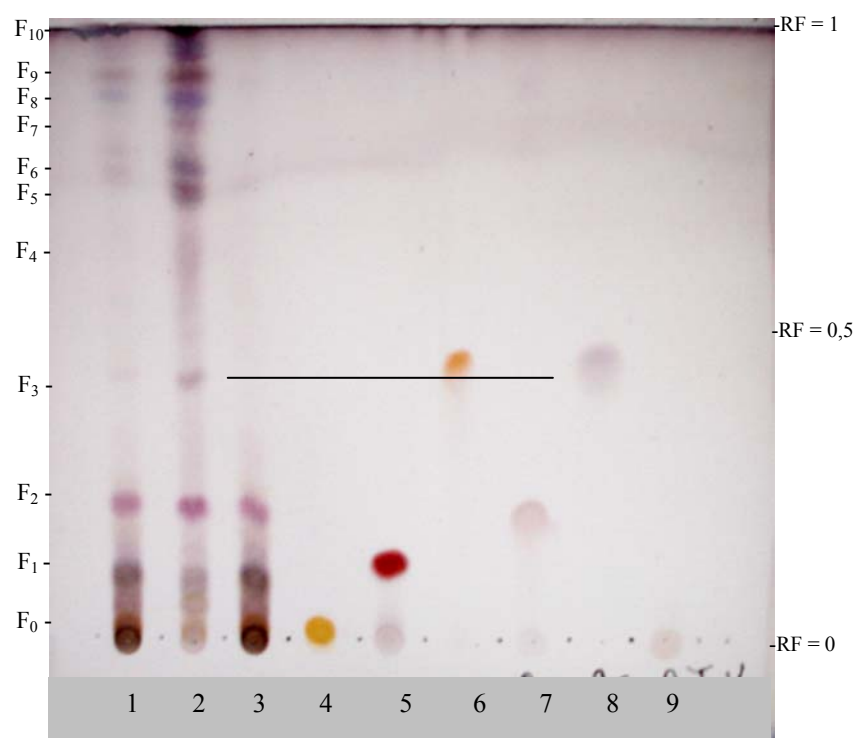


Figure 36. Chromatogrammes des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* révélés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (Chlor-Méth-H₂O-Aac). **1)** Extrait éthanolique. **2)** Extrait acétate d'éthyle. **3)** Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. **4)** Rutine. **5)** Catéchine. **6)** Quercétine. **7)** Acide gallique. **8)** Acide caféique. **9)** Acide tannique.

Les chromatogrammes de la figure 37 montrent que toutes les fractions séparées des trois extraits, en particulier celles de l'extrait d'acétate d'éthyle, participent à l'activité anti-radicalaire

contre le DPPH. L'extrait d'acétate d'éthyle constituerait une source importante de nouvelles molécules à propriétés anti-radicalaire qui restent à identifier et à exploiter dans le domaine thérapeutique.

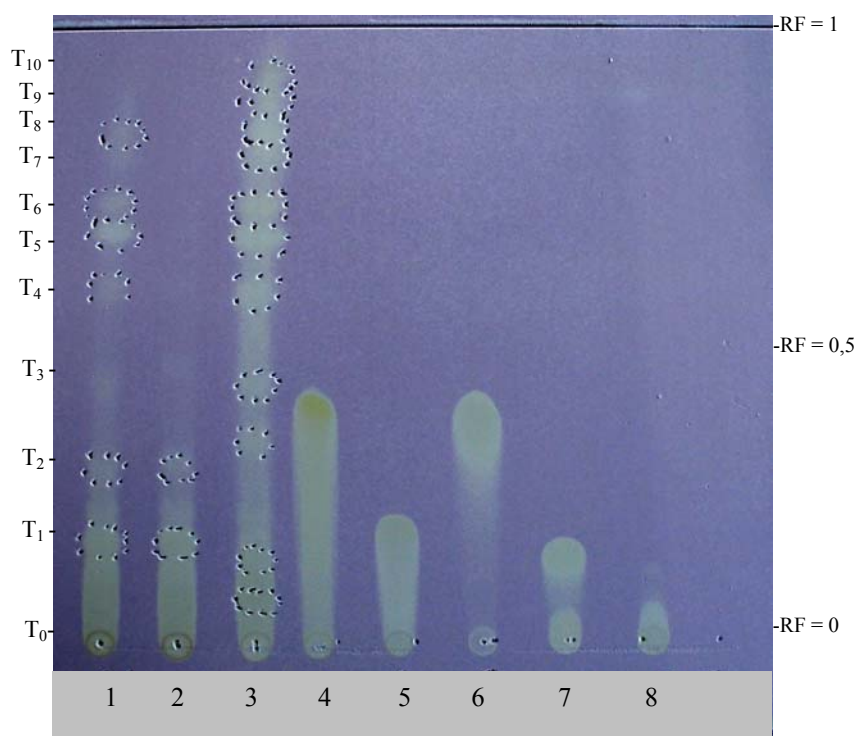


Figure 37. Chromatogrammes des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (Chlor-Méth.-H₂O-Aac). **1)** Extrait éthanolique. **2)** Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. **3)** Extrait acétate d'éthyle. **4)** Quercétine. **5)** Acide gallique. **6)** Acide caféique. **7)** Catéchine. **8)** Acide tannique.

Table XII. Caractéristiques des chromatogrammes des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* ⁽¹⁾.

Fractions	RF	Observation sous UV	Révélation par la vanilline sulfurique	Effet contre le DPPH
F ₀	0	Aucune couleur	Grise foncée	+++++
F ₁	0,15	Aucune couleur	Grise foncée	+++++
F ₂	0,25	Bleue claire	violette	+++
F ₃	0,47	Bleue claire	Bleue foncée	+++
F ₄	0,70	Bleue claire	violette	+++
F ₅	0,73	Bleue claire	Bleue foncée	+++
F ₆	0,75	Bleue claire	Bleue foncée	+++
F ₇	0,78	Bleue claire	Bleue foncée	+++
F ₈	0,82	Bleue claire	violette	+++
F ₉	0,89	Bleue claire	Bleue foncée	+++
F ₁₀	0,95	Bleue claire	Bleue foncée	++

- ⁽¹⁾ : système de séparation (Chlor- Méth- H₂O- Aac).

- Les fractions sont invisibles à la lumière du jour.

- Le nombre des signes (+) est proportionnel à l'intensité de la décoloration et à l'effet anti-DPPH.

Le système de séparation (Chlor-Méth-H₂O-Aac) a permis la séparation, en particulier, des dérivés phénylpropanoïdes de l'extrait d'acétate d'éthyle, mais beaucoup d'éléments actifs n'ont pas été séparés au niveau des extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle. Par conséquent, la pulvérisation de la solution DPPH a donné des taches de décoloration non distinctes. A cet effet, nous avons fait appel, en deuxième lieu, à l'application du premier système qui permettra peut être, par sa propriété de l'hydrolyse acide, la séparation de ces composés.

Les extraits de l'écorce, en effet, ont révélé avec ce système d'élution de nouveaux profils chromatographiques (Figure 38). Les profils des extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle observés à la lumière du jour apparaissent identiques en révélant cinq fractions chacun, alors que l'extrait d'acétate d'éthyle ne partage avec eux que peu de fractions (F₇ et F₈).

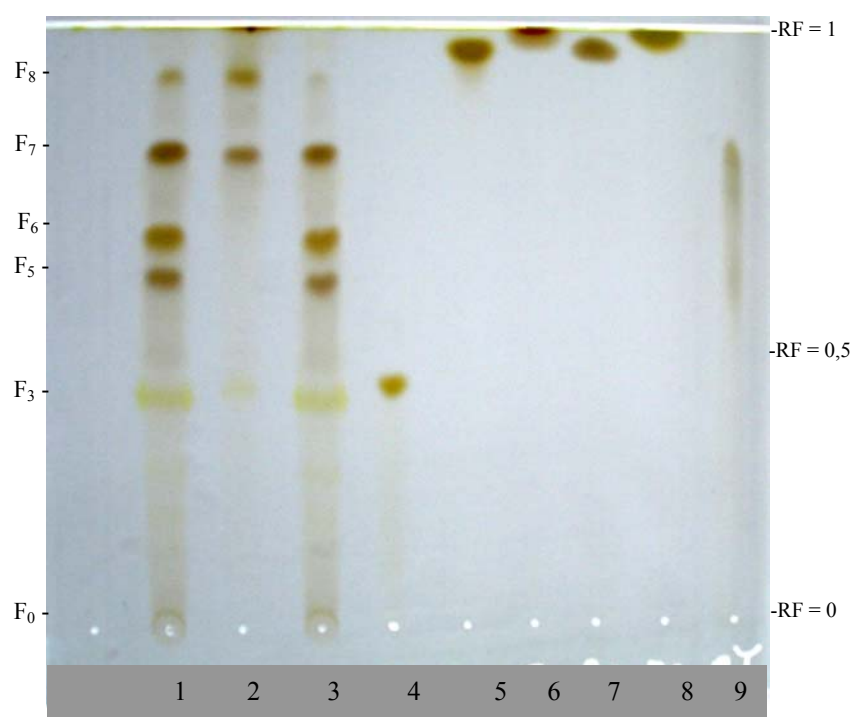


Figure 38. Chromatogrammes des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* à la lumière du jour avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H₂O). **1)** Extrait éthanolique. **2)** Extrait d'acétate d'éthyle. **3)** Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. **4)** Rutine. **5)** Catéchine. **6)** Quercétine. **7)** Acide gallique. **8)** Acide caféique. **9)** Acide tannique.

La révélation avec la vanilline sulfurique des chromatogrammes de l'écorce avec ce nouveau éluant a permis de mettre en évidence d'autres fractions non visibles à la lumière du jour. D'après la figure 39, les extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle sont séparés dans le même ordre en révélant 10 fractions de différentes couleurs. Un tel résultat témoigne la richesse de ces extraits en divers composés et met en valeur les diverses applications thérapeutiques de l'écorce de *F. angustifolia*.

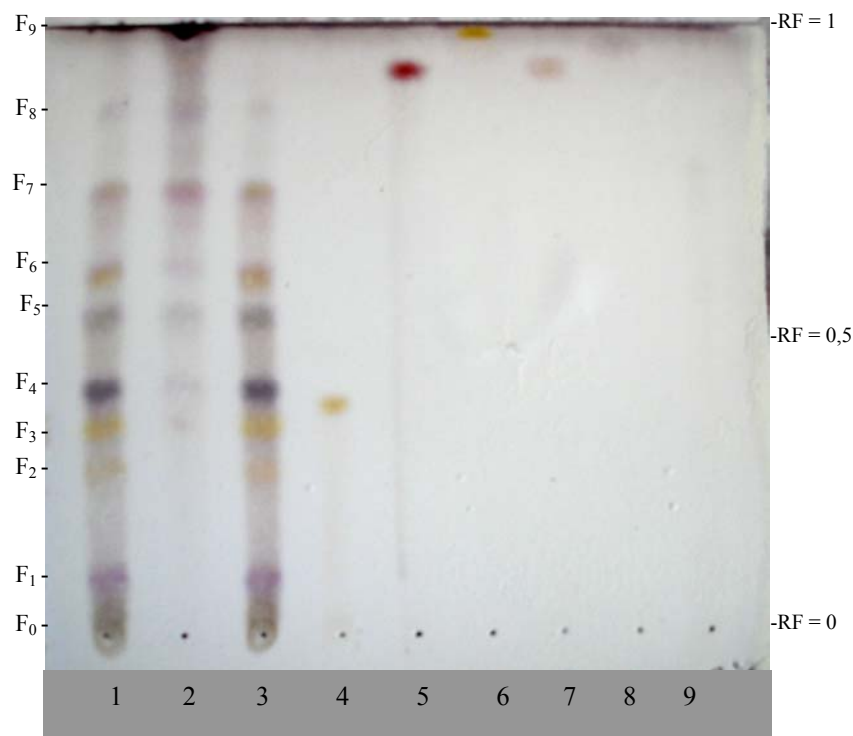


Figure 39. Chromatogrammes des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* révélés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H₂O). **1)** Extrait éthanolique. **2)** Extrait d'acétate d'éthyle. **3)** Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. **4)** Rutine. **5)** Catéchine. **6)** Quercétine. **7)** Acide gallique. **8)** Acide caféique. **9)** Acide tannique.

Parmi ces différentes fractions, seules celles visibles à la lumière du jour ont exprimé un effet anti-radicalaire. D'après la figure suivante, les chromatogrammes des extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle ont manifesté des taches de décoloration bien distinctes (T₁, T₂, T₃, T₄ et T₅). L'absence de décoloration des endroits occupés par les fractions marquées par des RF faibles, une caractéristique des composés hautement polymérisés (Andriambelason et *al*, 1998), confirme que ces composés ne sont pas impliqués dans cet effet.

Au fil des deux analyses chromatographiques des extraits de l'écorce, il est clair que cette partie de la plante est une source intéressante de molécules à propriété anti-radicalaire. En effet, l'analyse avec le système (Chlor-Méth-H₂O-Aac) a permis d'exhiber le contenu en composés à effet anti-radicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle, alors que la deuxième analyse a mis en valeur les composés des extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle.

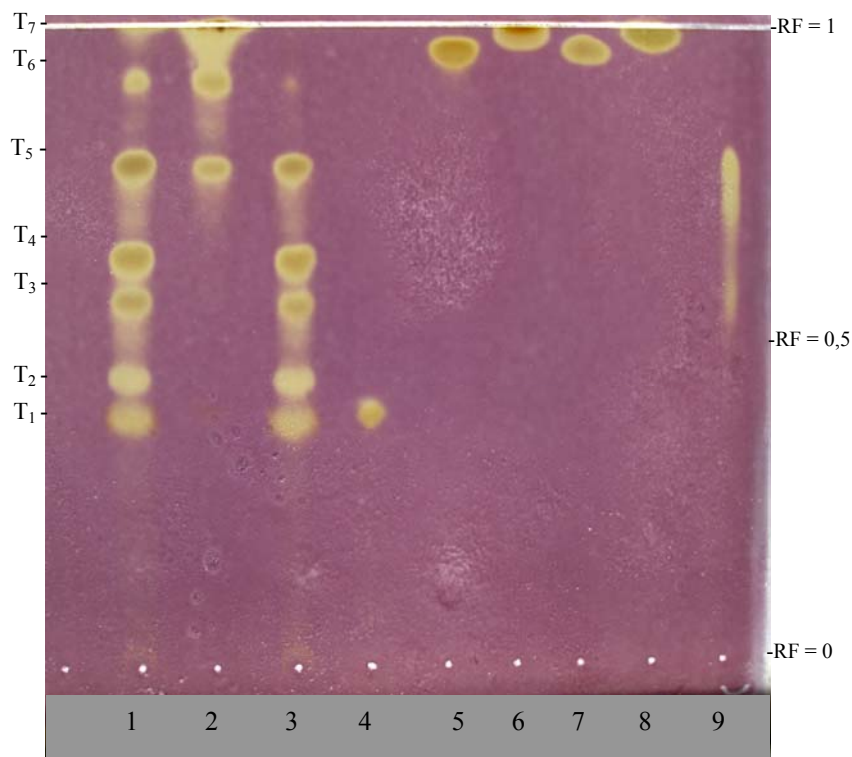


Figure 40. Chromatogrammes des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H₂O). **1)** Extrait éthanolique. **2)** Extrait d'acétate d'éthyle. **3)** Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. **4)** Rutine. **5)** Catéchine. **6)** Quercétine. **7)** Acide gallique. **8)** Acide caféique. **9)** Acide tannique.

Table XIII. Caractéristiques des chromatogrammes des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* ⁽²⁾.

Fractions	RF	Observation à la lumière du jour	Observation sous UV	Révélation par la vanilline sulfurique	Effet contre le DPPH
F ₀	0,10	Invisible	Invisible	Grise foncée	-/-
F ₁	0,17	Invisible	Invisible	Violette	-/-
F ₂	0,25	Invisible	Invisible	Jaune	-/-
F ₃	0,36	Jaune	Invisible	Jaune	++
F ₄	0,45	Invisible	Bleue claire	Bleue foncée	++
F ₅	0,56	Grise	Bleue claire	Grise	+++
F ₆	0,63	Grise	Invisible	Jaune	++++
F ₇	0,77	Grise	Bleue claire	Violette	++++
F ₈	0,82	Grise	Invisible	Bleu foncée	+++
F ₉	0,98	Invisible	Bleue claire	Bleu foncée	++++

- ⁽²⁾ : système de séparation (EA- AF- AAc- H₂O).

-/- : pas d'effet anti-radicalaire contre DPPH.

- Le nombre des signes (+) est proportionnel à l'intensité de la décoloration et à l'effet anti-DPPH.

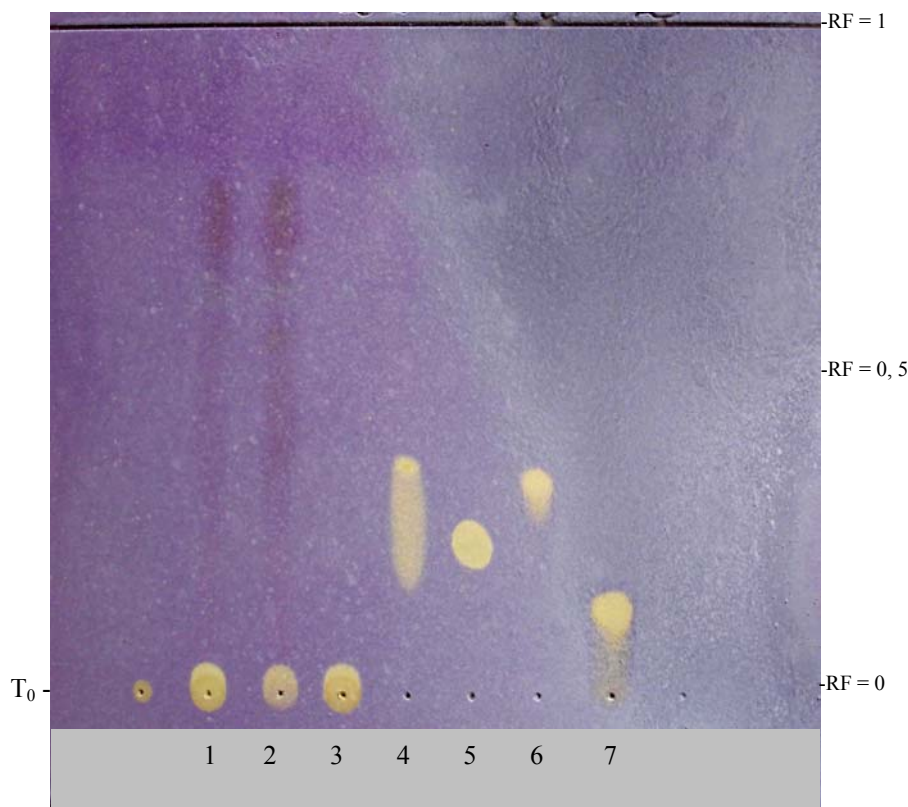


Figure 42. Chromatogrammes des extraits de feuilles de *F. angustifolia* pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (EA-Hex-AF). **1)** Extrait éthanolique. **2)** Extrait d'acétate d'éthyle. **3)** Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. **4)** Catéchine. **5)** Quercétine. **6)** Acide gallique. **7)** Acide caféïque.

Tableau XIV. Caractéristiques des chromatogrammes des extraits de feuilles de *F. angustifolia* ⁽¹⁾.

Fractions	RF	Observation à la lumière du jour	Observation sous UV	Effet contre le DPPH
F ₀	0,00	Grise foncée	Aucune couleur	++++
F ₁	0,65	Grise	Rouge orange	-/-
F ₂	0,70	Grise	Rouge orange	-/-
F ₃	0,83	Jeune	Rouge orange	-/-
F ₄	0,86	Jeune	Rouge orange	-/-
F ₅	0,93	Verte	Rouge orange	-/-

⁽¹⁾ : Système de séparation (EA-Hex-AF).

- Le nombre des signes (+) est proportionnel à l'intensité de la décoloration et à l'effet anti-DPPH.

-/- : pas d'effet anti-radicalaire contre DPPH.

Etant donné que les composés séparés par ce système n'aient pas manifesté d'effet anti-radicalaire, il nous a été donc utile d'appliquer une autre fois le système (EA-AF-AAc-H₂O). En effet, ce système a donné une nouvelle séparation des extraits dont les chromatogrammes à la lumière du jour (figure 43) révèlent quatre fractions communes entre l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle partage avec eux trois

fractions. La première fraction (F₁) a donné une couleur jaune similaire à celle de la rutine utilisée comme standard et partage avec cette dernière le même RF. Dans leur récente étude, Kostova et Iossifova (2006) ont isolé la rutine au niveau des feuilles de cette plante.

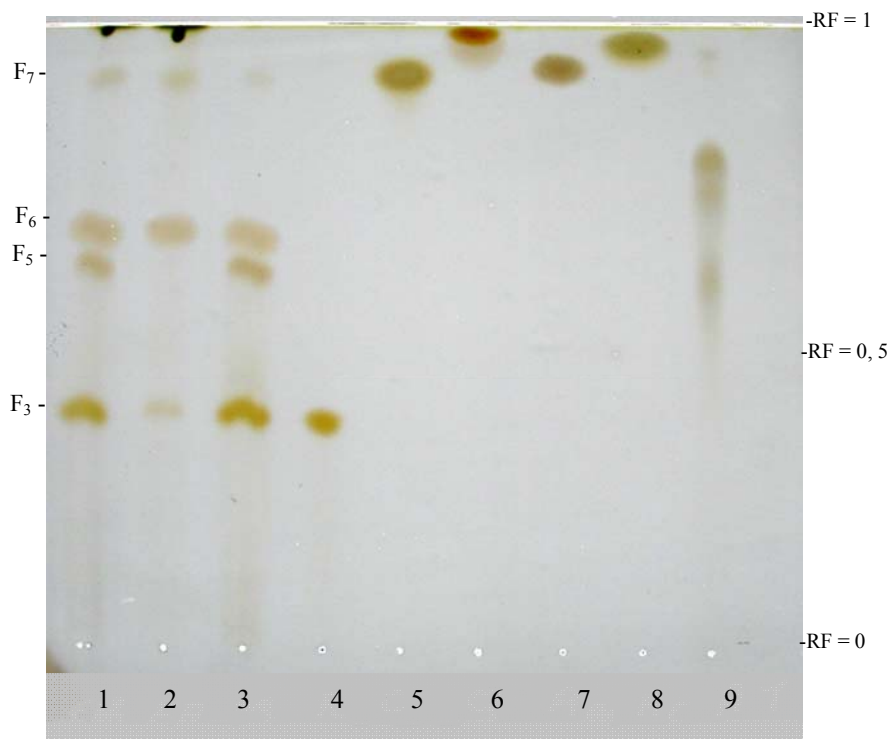


Figure 43. Chromatogrammes des extraits de feuilles de *F. angustifolia* à la lumière du jour avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H₂O). 1) Extrait éthanolique. 2) Extrait d'acétate d'éthyle. 3) Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. 4) Rutine. 5) Catéchine. 6) Quercétine. 7) Acide gallique. 8) Acide caféique. 9) Acide tannique.

La révélation avec la vanilline sulfurique des chromatogrammes des extraits de feuilles de *F. angustifolia* a permis de mettre en évidence d'autres composés qui ne sont pas visibles à la lumière du jour. La figure suivante révèle la présence de huit fractions ayant des couleurs différentes, concentrées en majorité dans les extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle.

La pulvérisation de la solution de DPPH sur ces composés, comme illustré dans la figure 45, révèle que l'effet anti-radicalaire des extraits de feuilles de *F. angustifolia* est dû essentiellement à deux composés aux niveaux de l'extrait éthanolique et l'aqueux d'acétate d'éthyle qui ont manifesté deux taches jaunes, alors que l'extrait d'acétate d'éthyle n'a exprimé qu'une seule tache (figure 45).

Bien que les feuilles de *F. angustifolia* n'aient montré que peu de fractions douées d'effet anti-radicalaire par rapport à l'écorce et les feuilles de *P. lentiscus*, elles restent quand même une source intéressante en divers composés d'après la figure 44.

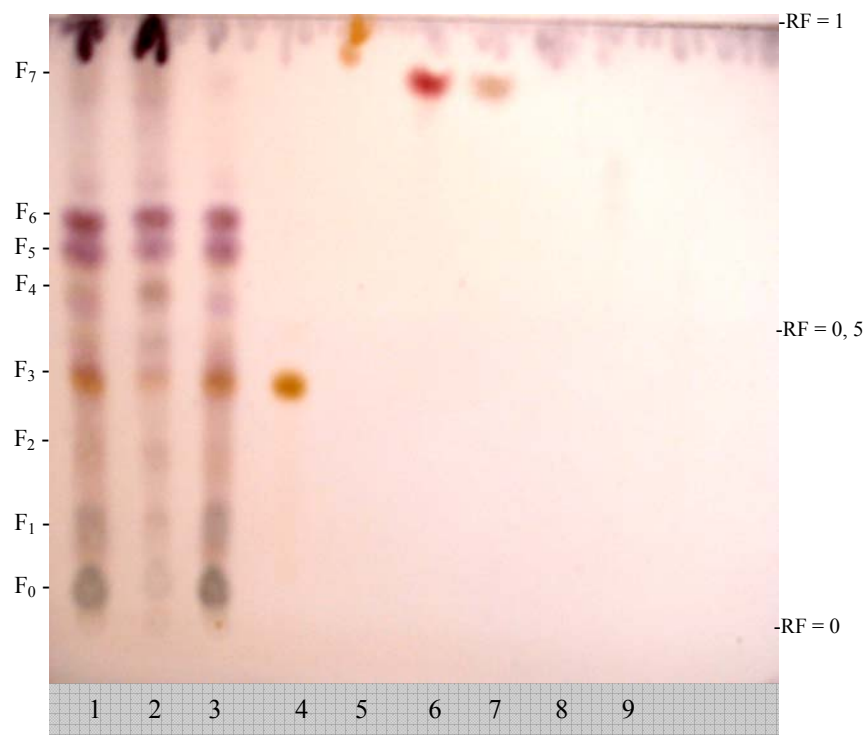


Figure 44. Chromatogrammes des extraits de feuilles de *F. angustifolia* révélés par la vanilline sulfurique avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H₂O). **1)** Extrait éthanolique. **2)** Extrait d'acétate d'éthyle. **3)** Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. **4)** Rutine. **5)** Catéchine. **6)** Quercétine. **7)** Acide gallique. **8)** Acide caféique. **9)** Acide tannique.

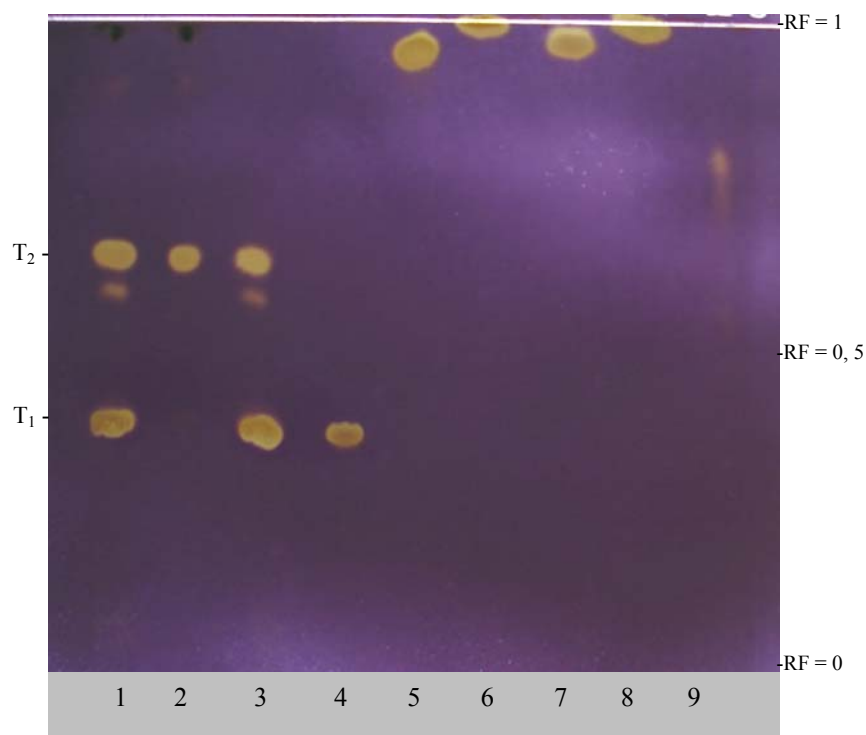


Figure 45. Chromatogrammes des extraits de feuilles de *F. angustifolia* pulvérisés par la solution DPPH avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H₂O). **1)** Extrait éthanolique. **2)** Extrait d'acétate d'éthyle. **3)** Extrait aqueux d'acétate d'éthyle. **4)** Rutine. **5)** Catéchine. **6)** Quercétine. **7)** Acide gallique. **8)** Acide caféique. **9)** Acide tannique.

Tableau XV. Caractéristiques des chromatographiques des extraits de feuilles de *F. angustifolia* ⁽²⁾.

Fractions	RF	Observation à la		Révélation par la	Effet contre le
		lumière du jour	Observation sous UV	vanilline sulfurique	DPPH
F ₀	0,11	Invisible	Invisible	Pourpre	-/-
F ₁	0,17	Invisible	Invisible	Pourpre	-/-
F ₂	0,25	Invisible	Invisible	Pourpre	-/-
F ₃	0,35	Jaune	Invisible	Bleue foncée	++++
F ₄	0,50	Invisible	Invisible	Violette claire	-/-
F ₅	0,62	Grise	Bleue claire	violette	+
F ₆	0,70	Grise	Bleue claire	Bleue foncée	++++
F ₇	0,86	Grise	Bleue claire	Bleue	+

-(²). Système de séparation (EA-AF-AAc-H₂O).

- Le nombre des signes (+) est proportionnel à l'intensité de la décoloration et à l'effet anti-DPPH.

-/- : pas d'effet anti-radicalaire contre DPPH.

III-7- Etude chromatographique sur colonne des extraits des plantes

Cette dernière étude est portée sur les extraits éthanoliques des deux plantes dans le but de déterminer l'effet anti-radicalaire en solution des fractions mises en évidence sur CCM. Après utilisation de plusieurs systèmes d'élution, nous sommes parvenu à séparer seulement l'extrait éthanolique de feuilles de *F. angustifolia*. Le traitement de cet extrait a permis la récupération de quatre fractions avec le chloroforme suivi par chloroforme/acétate d'éthyle (1/1), l'acétate d'éthyle, et enfin l'eau et l'acide formique (1/0,1).

La figure 46 montre l'effet anti-radicalaire contre le DPPH des quatre fractions récupérées sur colonne à la concentration de 100µg/ml. Les trois premières fractions F₁, F₂ et F₃ ont exhibé de faibles activités, significativement proches (P<0,05), tandis que la fraction F₄ a exprimé un pourcentage d'activité d'environ 69 %. L'analyse de Cette dernière (F₄) sur CCM à la lumière du jour, avec le système de séparation (EA-AF-AAc-H₂O), révèle la présence majoritaire de la rutine (figure 47); ce composé, comme nous l'avons cité précédemment, est déjà mis en évidence par Kostova et Iossifova (2006) au niveau des feuilles de *F. angustifolia*. D'autre part, la pulvérisation de la solution de DPPH sur la plaque indique que l'activité anti-radicalaire de F₄ est en grande partie due à la présence de la rutine.

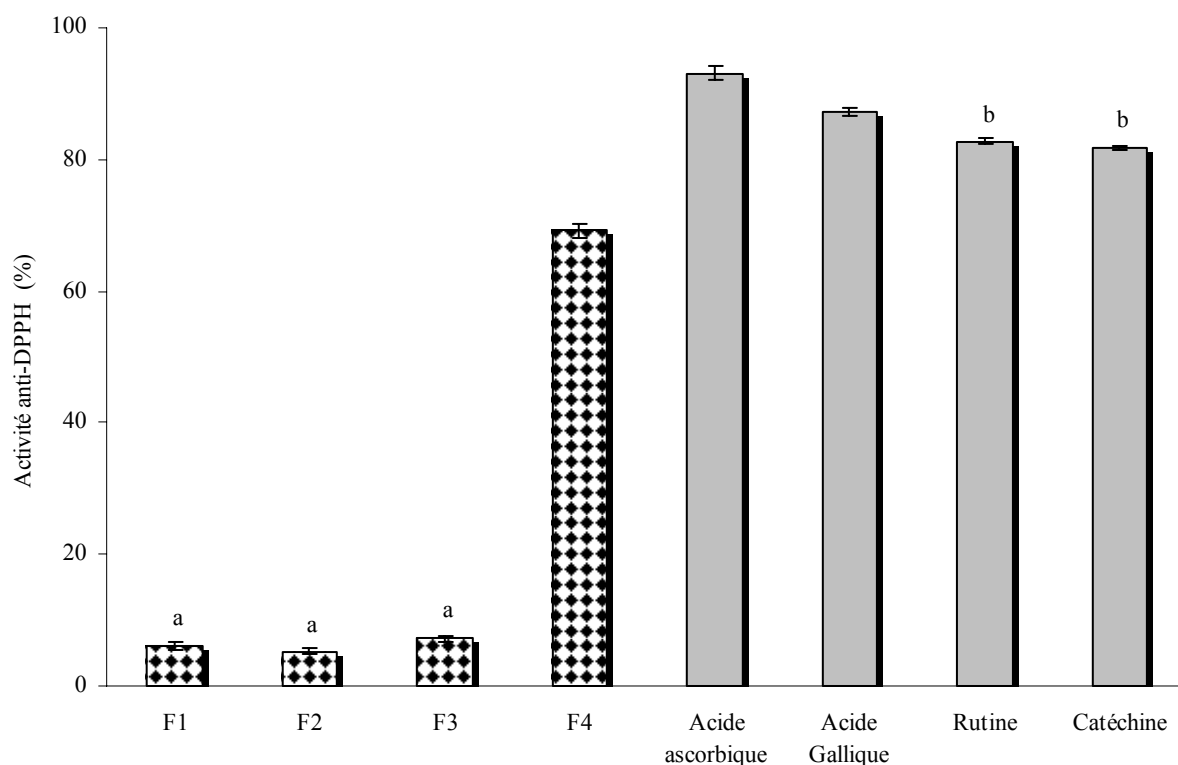


Figure 46. Effet scavenger contre le radical DPPH des fractions F₁, F₂, F₃, et F₄ de l'extrait éthanolique des feuilles de *F. angustifolia* et certains standards.

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

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

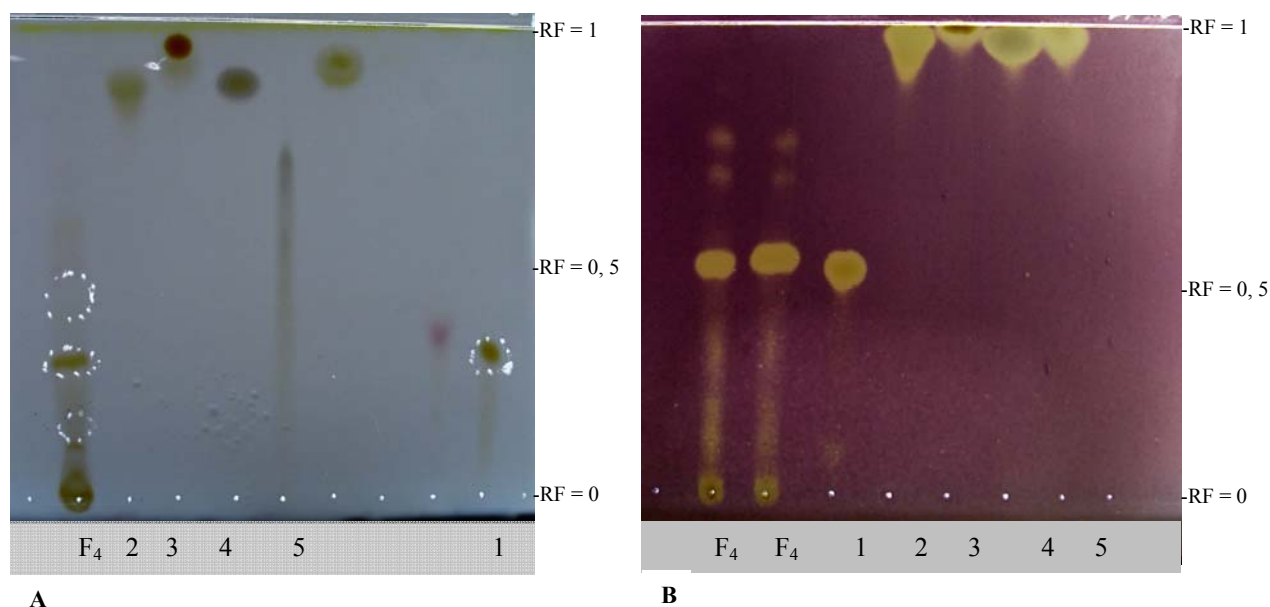


Figure 47. Chromatogramme de la fraction F₄ des feuilles de *F. angustifolia* avec le système de séparation (EA- AF- AAc- Eau). **A)** observation à la lumière du jour. **1)** Rutine. **2)** Quercétine. **3)** Catéchine. **4)** Acide gallique. **5)** Acide tannique. **B)** observation après pulvérisation de la solution DPPH. **1)** Rutine. **2)** Quercétine. **3)** Catéchine. **4)** Acide gallique. **5)** Acide caféïque.

IV- Conclusion et perspectives

V- Conclusion et perspectives

Dans le but de rechercher de nouveaux composés antioxydants naturels à intérêt thérapeutique, les extraits de deux plantes médicinales, *F. angustifolia* et *P. lentiscus*, ont fait l'objet d'une étude détaillée, commençant par l'extraction et le dosage des composés phénoliques, l'évaluation de leur effet anti-radicalaire et, enfin, la caractérisation de cet effet en faisant appel à la chromatographie sur couche mince.

Le procédé d'extraction que nous avons employé a permis de retenir 7 extraits à partir des feuilles de *P. lentiscus* et 5 extraits pour l'écorce et les feuilles de *F. angustifolia*. Les résultats d'évaluation des phénols totaux, des tannins et des flavonoides montrent que ces extraits en sont riches selon leur solubilité dans les solvants utilisés lors de leur extraction. L'analyse de ces résultats révèle que les extraits polaires des feuilles de *P. lentiscus*, dont les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane, sont marqués par les teneurs les plus élevées en phénols totaux, tandis que les extraits apolaires, en particulier, ceux des feuilles de *F. angustifolia* en sont les plus pauvres. Les résultats des teneurs des extraits en tannins confirment que les feuilles de *P. lentiscus* sont une source importante en ces composés, notamment les extraits d'éthanol et aqueux d'acétate d'éthyle qui renferment les teneurs les plus élevées, 1239,11mg EAT/g et 1279,88mg EAT/g, respectivement, suivi par les deux derniers extraits d'hexane et du chloroforme de feuilles de *F. angustifolia*. Les extraits de l'écorce marquent les teneurs les plus faibles. Quant aux flavonoides, les résultats de dosage varient des teneurs les plus élevées des extraits aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* jusqu'aux teneurs les plus faibles enregistrées au niveau de l'extrait d'hexane des deux plantes. Quant aux flavonoides, les résultats de dosage varient des teneurs les plus élevées des extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* avec des taux de 61,59, 61,44 mg ER/g d'extrait respectivement jusqu'aux teneurs les plus faibles enregistrées dans l'extrait d'hexane des deux plantes. Il en ressort à partir de cette analyse que les feuilles de *P. lentiscus* sont les plus riches en terme de composés phénoliques, en comparaisant aux feuilles et à l'écorce de *F. angustifolia*.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical DPPH des deux plantes à une concentration de 100µg/ml a prouvé que l'effet des extraits de *P. lentiscus* est le plus fort avec une moyenne qui dépasse 90%, une valeur supérieure même à celle des standards (acide gallique, rutine, acide tannique) ($P < 0,05$). D'autre part, l'écorce et les feuilles de *F. angustifolia* ont manifesté aussi des effets relativement importants, notamment au niveau des trois premiers extraits (éthanol, acétate d'éthyle et aqueux d'acétate d'éthyle), tandis que les deux derniers extraits (chloroforme et hexane) ont exprimé des effets faibles.

Les extraits ayant manifesté un effet scavenger supérieur à 50% ont été testés selon leur capacité à réduire le radical DPPH en fonction de leur concentration en parallèle avec les standards. La majorité de ces extraits a atteint des activités basses à 10µg/ml ; par contre, l'extrait éthanolique et les extraits aqueux de feuilles de *P. lentiscus* ont maintenu leur effet stable à cette concentration. Par conséquent, les IC₅₀ qui expriment le potentiel anti-radicalaire le plus important sont celles des extraits aqueux d'hexane et chloroforme des feuilles de *P. lentiscus* avec des valeurs de 2,89 et 3,08µg/ml, respectivement. Ces valeurs sont comparables (P<0.05) à celles de molécules connues pour leur effet anti-radicalaire, comme l'acide gallique, la catéchine et la rutine, suivis par celles de l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle (6µg/ml) de la même plante. Pour le reste des extraits, leurs IC₅₀ varient de 28µg/ml pour l'extrait éthanolique de l'écorce aux IC₅₀ les plus élevées (>100µg/ml) des feuilles et l'écorce de *F. angustifolia*. Ces résultats pourraient se justifier par les teneurs variables et la diversité des molécules contenues dans les extraits.

A partir des différentes corrélations, il s'est avéré que l'activité anti-radicalaire contre le DPPH des extraits des deux plantes étudiées est étroitement liée à leurs teneurs en phénols totaux en exprimant des facteurs de corrélation positifs (0,91, 0,95 et 0,89, respectivement pour les feuilles de *P. lentiscus*, les feuilles et l'écorce de *F. angustifolia*). Quant aux flavonoides, les coefficients de corrélation des extraits de feuilles de *P. lentiscus* (r=0,91) et *F. angustifolia* (r=0,92) sont significativement proportionnels à leurs teneurs en flavonoides. Ce n'est pas le même cas pour les extraits de l'écorce qui affichent un coefficient de corrélation insignifiant (r=0,043).

La corrélation entre l'effet anti-DPPH des extraits de feuilles de *P. lentiscus* et leurs teneurs en tannins est de 0,59. D'autre part, les corrélations négatives (r=-0,81 et r=-0,90) établies pour les extraits des feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* montrent que l'effet anti-radicalaire contre le DPPH est inversement proportionnel aux teneurs en tannins.

Les résultats de l'étude chromatographique sur couche mince ont confirmé la richesse des extraits des deux plantes en divers composés doués d'effet anti-radicalaire, ce qui met en valeur leurs applications thérapeutiques en médecine traditionnelle. En effet, l'effet anti-radicalaire des extraits de feuilles de *P. lentiscus* serait essentiellement dû aux formes complexes des composés phénoliques, notamment les tannins hydrolysables et leurs dérivés (dérivés galloyles). Les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane qui ont exprimé des potentiels anti-radicalaires intéressants apparaissent les plus riches en ces composés qui restent à identifier et à exploiter dans d'autres études.

Des résultats obtenus pour les deux analyses chromatographiques des extraits de l'écorce de *F. angustifolia*, il est clair que cette partie de la plante est une source inestimable de molécules à propriété anti-radicalaire. En effet, la première analyse avec le système (Chlor-Méth-H₂O-Aac) a permis de mettre en évidence le contenu en molécules à effet anti-radicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle, alors que la deuxième analyse a mis en valeur les composés de l'extrait éthanolique et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle dont chacun a révélé la présence de cinq composés à propriété anti-radicalaire.

L'analyse chromatographique des extraits de feuilles de *F. angustifolia* à la lumière du jour et avec la vanilline sulfurique a révélé leur richesse en divers composés ; cependant, peu d'entre eux sont doués d'effet anti-radicalaire par rapport à l'écorce de cette plante. La chromatographie sur colonne de l'extrait éthanolique des feuilles de *F. angustifolia* a permis de récolter quatre fractions dont F₄ est la seule à avoir exhibé un effet anti-DPPH assez significatif (69%). L'analyse de cette fraction sur CCM a montré que l'effet anti-radicalaire serait probablement dû à la présence de la rutine dans cet extrait.

Nous concluons à partir de cette étude que les extraits des deux plantes constituent une source inestimable en divers composés phénoliques doués d'activité antioxydante, ce qui témoigne et justifie leur utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement de maladies à caractère inflammatoire. Cependant et malgré leur importance, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur ces plantes s'imposent aux niveaux pharmacologiques et chimiques, car les approches sont restées globales en ne prenant en compte que l'ensemble des composés présents dans les extraits. Il serait essentiel, à l'avenir de préciser la nature des composés phénoliques, en utilisant des méthodes plus avancées telles que l'HPLC, la GC-MS et la RMN. Aussi, il serait intéressant de tester les composés identifiés individuellement en faisant appel à des tests pharmacologiques *in vivo*. Finalement, il est impératif de vérifier également l'absence d'effets cytotoxiques des composés.

V- Références bibliographiques

V- Références bibliographiques

- Abdelghafour, M. (2003) .Radiolyse gamma des flavonoides, étude de leurs réactivités avec les radicaux libres issus des alcools. Formation des depsides. *Thèse doctorat, université de Limoges*, p : 40-43.
- Abdelwheb, A.; Bouhlel, I.; Skamdrani, I.; Valenti, K.; Kadri, M.; Guirand, P.; Steiman, R.; Mariotte, A. M.; Gherdia, K.; Laporte, F.; Dijoux, F.; Ranca, M. G.; and Chekir-Ghedira, L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia Lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chem. Biol. Inter*, 165:1-13.
- Alyson, A.; Grant, R.; and Christophes, G. (2006). Novel isoformes of NADPH-oxydase in cerebral vascular control. *Pharmacology & Therapeutics*, 111: 928-948.
- Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; and Hagen, T. M. (1993).Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7915-7922.
- Ammar, H.; Lopez, S.; and Gonzalez, J. S. (2006). Assessment of the digestibility of some Mediterranean shrubs by in vitro techniques. *Animal Feed Science and Technology*, 119: 323-331.
- Andriambelson, E.; Magnier, C.; Hann-Archipoff, G.; Lebostien, A.; Anton, R.; Bertz, A.; Stoclet, J. C.; and Andriansitohaina, R. (1998) .Natural dietary polyphenolic compound cause endothelium-dependent vasorelaxtion in rat thoracic aorta. *The Journal of Nutrition*, 128:2324-2333.
- Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; Mcdonald, S.; and Robards, K. (2001). Metsu for testicule antioxydant activité. *Theo Analyste*, 127 : 183-198.
- Assimopoulou, A.N.; Zlatanov, S.N.; and Papageorgiou, V.P. (2005). Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates. *Food Chemistry*, 92: 721-727.

- Aurousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leur produit. *INRA Prod. Anim*, 15 (1): 67-82.
- Azzi, A.; Davies, K. J. A.; and Kelly, F. (2004). Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lettres*, 558 : 3-6.
- Bahorun, T. (1997). Substance naturelle active : la flore mauricienne, une source d'approchement visionnement potentielle. *Food and Agricultural Research Council, Reedit, Mauritius*, 83-94.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; and Samman, S. (2005). Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 46: 752-761.
- Beaudeau, J-L.; Delattre, J.; Therond, P.; Bonnefont-Rousselot, D.; Legrand, A. and Peynet, J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie specialise*, 21: 144-150.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Croit. Revy. Oral.Biol. Med*, 184-196.
- Bérard, E. (1997). Métabolisme et régulation du monoxyde d'azote : un médiateur de contrôle difficile. *Archives de Pédiatrie*, 4 :1004-1011.
- Berger, M. M. (2006). Manipulation nutritionnelle du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 48-53.
- Bonnefont-Rousselot, D. ; Peynet, J. ; Beaudeau, J. L. ; Terond ; P. ; Legrand, A.; and Delattre, J. (2002) .Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16 :260-267.
- Bors, W.; Michel, C.; and Stettmaier, K. (1997). Antioxidant effects of flavonoids. *British Library*, 6 : 399-402.

- Bossokpi, I.P.L. (2003). Etude des activités biologiques de *fagara zanthoxyloides Lam* (Rutaceae). *Thèse doctorat, université de Bamako*, p : 8-10.
- Brasseur, T. (1989). Propriétés anti-inflammatoires de flavonoïdes. *Journal de Pharmacologie*, 44(3) : 235-241.
- Bruneton, J. (1993). Composés : Shikimate-acétates In Pharmacogénosie « Phytochimie, Plantes médicinales ». *Technique et documentation Lavoisier*, 3 :199-383.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacogénosie. Phytochimie. Plantes médicinales. *Technique et documentation Lavoisier*, 3 : 286-347.
- Buelga, S.; and Wiliamson. (2003). Methods in polyphenol analysis. *Royal society of chemistry*, p: 339-345.
- Cacace, J. E. et Mazza, G. (2001). Extraction à l'eau sulfurée des anthocyanines et d'autres composés phénoliques du cassis. *Agriculture et Agroalimentaire Canada*, 12 : 1-15.
- Cai, Y.; Luob, O.; Sunc, M.; and Corkea, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74: 2157–2184.
- Cai, Y. Z.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q.; and Corke, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78 : 2872-2888.
- Cao, G.; and Priorl, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44 (6):1309–1315.
- Chaing, H.S.; Juilo, Y.; and Lu, F. J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors form the leaves of *Alsophila Spinulosa* (hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition*, 8(1): 61-71.

- Cheeseman, K.; and Slater, H. (1993). An introduction to free radicals biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49: 481-493.
- Cheynier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal Clinical Nutrition*, 81: 223–229.
- Chryssavgi, G.; Vassiliki, P.; Athanasios, M.; Kibouris, T.; and Michael, K. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107:1120-1130.
- Cotelle, N. ; Bernier, J-L. ; Catteau, J-P. ; Gaydou E. ; and Wallet, J.C. (1994). Activité biologique de 24 flavones : inhibition de la xantine oxydase et capture de radicaux libres. *Edition INRA*, p : 395-396.
- Coulon, L. (2004). Effet d'un hydroperoxyde lipidique et des LDL oxydées sur les enzymes impliquées dans la libération de l'acide arachidonique des phospholipides plaquettaires. *Thèse doctorat, université de Lyon*, p : 60-64.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; and Lewis, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *American Society of Plant Physiologists*, (24): 1251-1254.
- Cuvelier, C.; Dotreppe, O.; and Istasse, L. (2003). Chimie, Sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 147 (5) : 315-324
- Dawidowicz, A. L.; Wianowska, D.; Baranika, B. (2006). The antioxidant proprieties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. *LWT*, 39: 308-315.
- De Brune. T.; Pieters. L.; Deelstra. H.; and Vlietinck. A. (1999). Condensed tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematical and Ecology*, 27: 445-459.
- De Leiris, J. (2003). Biochemistry of free radicals. *Heart Metabolism*, 19:40–44.

- De Lima, M. R. F.; de Souza Luna, J.; Dos Santos, A. F.; Cano de Andrade, M. C.; Antonio Santana, A. E. G.; Genet, J. P.; Marquez, B.; Neuville, L.; and Moreau, N. (2006). Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 137–147.
- De moffarts, B.; Kirschvink, N.; Pincemail, J.; and Lekeux, P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 149: 1-9.
- De-Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W. M. A. Ariese, F. Gooijer, C.; Brinkman, U. A. T. b. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112: 31- 63.
- Dean, R. T.; Fu, S.; Stocker, R.; and Davies, R. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemistry Journal*, 324 : 1-18.
- Dedoussis, G. V. Z.; Kaliora, A. C.; Psarras, S.; Chiou, A.; Mylonaa, A.; Papadopoulos, N. G.; and Andrikopoulos, N. K. (2004). Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174: 293–303.
- Derbel, S.; et Ghedira, K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 1 : 28-34.
- Dohou, N.; Yamni, k.; Tahrouch, S.; Idrissi hassani, L. M.; Badoc, A.; and Gmira, N. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelaea lythroides*, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 142: 61-78.
- Droge, W. (2002). Free radicals in physiological control of cell function. *The American Physiological Society*, 82:47-97.
- Dutta, D.; Chaudhuri, U.R.; and Chakraborty, R. (2005). Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Biotechnology*, 4 (13): 1510-1520,

- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106: 119-133.
- Eloff, J. N.; Famakin, J. O.; and Katerere, D. R. P. (2005). *Combretum woodii* (Combretaceae) leaf extracts have high activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 4 (10) : 1161-1166.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanisme des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108-115.
- Flourie, F.; Arab, K.; Rossary, A.; and Steghens.; J. P. (2006). Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation *in vitro* initiée par le radical °OH. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 21 : 229-233.
- Fukagawa, N.K. (1999). Aging: is oxidative stress a marker or is it a causal?. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 222: 293-298.
- Garait, B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique ou par voie gazeuse et effet de la GliSODin. *Thèse doctorat, université Joseph Fourier*, p : 22-23.
- Gardès-Albert, A. M.; Bonnefont, D. R.; Abedinzadeh, Z. et Jore. D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'actualité Chimique*, 91-95.
- Gasmi-Boubaker, A.; Kayouli, C.; Buldgen, A.; Boukary, A.; Ammarc, H.; and Lopez, S. (2006). Effect of feed block supply on the ruminal ecosystem of goats grazing shrub land in Tunisia. *Animal Feed Science and Technology*, 127: 1-12.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
- Girotti A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 29:1529-1542.

- Goli, A. H.; Barzegar, M.; and Sahari, M, A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92: 521-525.
- Goudable, J. et Favier. A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique Métabolisme*, 11 :115-20.
- Gramza, A.; and Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis L.*) as antioxidants in lipid systems. *Food Science and Technology*, 16: 351-358.
- Griendling, K. K.; and Fitzgerald, G. A. (2006). Oxidative stress and cardiovascular injury part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *American Heart Association*, 108 :1912-1916.
- Guignard, J. L. (1996). Les composés phénoliques. Biochimie végétale. *Edition Masson, Paris*, p : 167-231.
- Gutteridge. J, M, C. (1995). Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12) : 1819-1 828.
- Guy, L.; Remesy, C.; Demigne, C.; et Boiteux, J. P. (2000). Nutrition et cancer de prostate. *Progres en urologie*, 10: 505-512.
- Ha, S, K.; Lee, P.; Park, J, A .; Oh, R, H.; Lee, S, Y.; Park, J, H.; Lee, E, H.; Ryu, J, H.; Lee, R, K.; and Kim, S, Y. (2008). Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochemistry International*, 52: 878-886.
- Hagerman, A.E.; and Butler, L.G. (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26: 809-812.
- Halliwell, B.; and Cross, C. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*, 102: 1-15.
- Halliwell, B.; and Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*, 219: 1-14.

- Halliwell, B.; Clement, M.V. and Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *Federation of European Biochemical Societies*, 486: 10-13.
- Han, S. S.; Lo, S. H.; Choi, Y. W.; Kim, J, H.; and Baek, S. H. (2004). Antioxidant Activity of Crude Extract and Pure Compounds of *Acer ginnala* Max. *Bull Korean Chem Soc*, 25 (3): 389-391.
- Handique, J. G.; and Baruah, J. B. (2002). Polyphenolic compounds an overview. *Reactive & Functional Polymers*, 52: 163-188.
- Harrison, R. (2006). Milk xanthine oxidase: properties and physiologique roles. *International Dairy Journal*, 16: 246-254.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology&Therapeutics*, 96: 97-202.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 : 572-584.
- Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; et Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1 : 3-6.
- Huang, H. Y.; Appel, L. J.; Croft. K. D.; Miller, E. R.; Mori, T. A. and Puddey, I. B. (2001) Effects of vitamin C and vitamin E on *in vivo* lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *American Journal Clinical Nutrition*, 76: 549–55.
- Hwang, E. S.; and Kimb, G. H. (2007). Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins *in vitro* and *in vivo* cancer research. *Toxicology*, 229: 1–10.
- Iossifova, T.; Vogler, B.; Klaiber, I.; Kostova, I.; and Kraus, W. (1999). Caffeic acid esters of phenylethanoid glycosides from *Fraxinus ornus* bark. *Phytochemistry*, 50: 297-301.

- Kaliora, G.; Dedoussis, G. V. Z.; Schmidt, H.(2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, 187: 1-17.
- Kaneko, T.; Baba, N.; and Matsuo, M. (2003). Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 142: 239-254.
- 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 Agriculture Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- Kevin, R.; Paul, D.; Prenzel, G.; and Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436.
- Khan, A. U.; and Kashat, M. (1994). Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Pro Nat Acad Sci USA*, 91: 12365-12367.
- Khanbabaee, K. and Ree, T. V. (2001). Tannins : Classification and definition. *Natural Product*, 18 : 641-649.
- Kivcak, B.; and Akay, S. (2005). Quantitative determination of a-tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 76: 62-66.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 165-177.
- Kordali, S.; Cakir, A.; Zengen, H.; and Duru, M. E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74:164-167.
- Kostova, I.; and Iossifova, T. (2007). Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia*, 78: 85-106.

- Kumaran, A.; and karunakaran, R. J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97: 109-114.
- Lamotte, O.; Courtois, C.; Besson, A.; and Pugin, A. (2006). Mechanism of nitric-oxide included increase of free cytosolic Ca⁺⁺ concentration in nicotiana plumbaginifolia cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 1-8.
- Leverve, X. (2004). Stress oxydant en réanimation : quelle place pour les antioxydants ?. *Conférences d'actualisation*, 295-302.
- Li, H. B.; Wong, C. C.; Cheng, K.W.; and Chen, F. (2008). Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT*, 41: 385-390.
- Lim, Y. Y.; and Murtijaya. J. (2007). Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. *LWT*, 40: 1664-1669.
- Lin, C.; Chen, C.; Liang, Y. and Lin, J. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294:167-172.
- Longo, L.; Scardino, A.; and Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8 : 360-364.
- Lugasi, A.; Hovari, J.; Sagi, K. V.; and Biro, L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47 (4):119-125.
- Macheix, J. J.; Fleuriet, A.; et Jay- Allemand, C.H. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, p : 1 -31.
- Maisuthisakul, P.; Pongaswatmanit, R. and Gordon, M. H (2007). Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer). *Food Chemistry*, 100:1620-1629.

- Males, Z.; Plazibat, M.; Vundac, V.; and Zuntar I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree-*Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm*, 56: 245-250.
- Maksimović, Z.; Malenčić, N.D.; and Kovacević, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96 (8): 873-877.
- Manthey, J. A.; Guthrie, N.; and Grohmann, K. (2001). Biological Properties of Citrus Flavonoids Pertaining to Cancer and Inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 135-153.
- Martin, S.; and Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et D'angéiologie*, 51 : 304-315.
- Masella, R.; Di Benedetto, R.; Vari, R.; Filesi, C.; and Giovannini.C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 577-586.
- Mattie, M. D.; and Freedman, J. H. (2004). Copper-inducible transcription: regulation by metal- and oxidative stress responsive pathways. *The American Physiological Society*, 286: 293-301.
- Mccarty, M. F. (2008). Scavenging of peroxynitrite-derived radicals by flavonoids may support endothelial NO synthase activity, contributing to the vascular protection associated with high fruit and vegetable intakes. *Medical Hypotheses*, 70:170-181.
- Mello, L. D.; and Kubota L. T. (2007). Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. *Talanta*, 72: 335-348.
- Middleton, E.; Kandaswami, C.; and Theoharides, T.C.; (2000). The effect of flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology Review*, 52 (4): 651-674.
- Miliauskas, G.; Venskutonis, P. R.; Beek, V. Y. A. (2004). Screening of some medicinal and aromatic plants extracts. *Food chemistry*, 85 : 231-237.

- Min, D. B.; and Boff, J. M. (2002). Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 58-72.
- Moldovan, L.; Mythreye, K.; Goldschmidt-Clermont, P. J.; and Satterwhite, L. L. (2006). Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. *Cardiovascular Research*, 71: 236-246.
- Moleneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science Technology*, 27 :152-159.
- Misirli, A.; and Ozeker, E. (2001). Characterization of some *Pistacia* spp. through phenolic content, *LWT*, 39: 164-169.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of Hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-21.
- Naczk, M.; and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111.
- Naczk, M.; and Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- Nagao, A.; Seki, M. and Kobayashi, H. (1999). Inhibition of xanthine oxydase by flavonoids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63 (10): 1787-1790.
- Narayana, K. R.; Reddy, M. R.; Chaluvadi, M.R.; and Krishna, D.R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16.
- Nijveldt, R.; Robert, J.; Nood, E.; Danny, E.C.; Van Hoorn, P.; Boetens, G.; Klaske, V.N.; and Paul, F. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential application. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418-25.

- Niki, E.; Yoshida, Y.; Saito, Y.; Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338: 668–676.
- Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, 66: 2012-203.
- Owen, P. L and Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of Northeastern North America plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64 :149-160.
- Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des laboratoires*, (276) : 87-96.
- Phillis, J. W. (1994). A radical view of cerebral ischemic injury. *Progress in Neurobiology*, 42: 441-448.
- Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxydants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- Pincemail, J Defraigne, J. O.; Meurisse, M. and Limet, R. (1998). Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaire 2eme partie : la vitamine E. *Medi – Sphère*, 1-5.
- Pincemail, J.; and Defraigne, J. O. (2003). Le CoEnzyme Q10 ou ubiquinone : un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 8 (2) : 55-60.
- Pincemail, J.; and Defraigne, J. O. (2004). Les antioxydants : Un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l’oxygène, *Symposium «Antioxydant et alimentation » institut Danone*, 1-2.
- Pinnell, S. R.; Durham, M.D.; and Carolina, N. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal American Academic Dermatology*, 48 (1): 1-22.

- Porat, Y.; Abramowitz, A.; and Gazit, E. (2006). Inhibition of Amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des*, 67: 27-37.
- Prior, R. I.; Wu, X.; and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *American Chemical Society*, 14:1-13.
- Rahman, I.; Biswas, S. K.; and Kirkham, P. A. (A. 2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 72: 1439- 1452.
- Rahman, I.; Biswas, S.K.; and Kode, A. (B. 2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*, 533 : 222-239.
- Rakic, S.; Petrovic, S.; Kukic, J.; Jadranin, M.; Tesevic, V.; Povrenovic, D.; and Siler-Marinkovic, S. (2007) Influence of thermal treatment on phenolic compounds and antioxidant properties of oak acorns from Serbia. *Food Chemistry*, 104: 830-834.
- Ré, D.B.; Nafia, I.; Nieoullon, A.; Le Goff, L.K.; et Had-Aissouni, L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 : 502-509.
- Reed, J. D. (1995). Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. *Journal Animal Science*, 73:1516-1528.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). Notions générales sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod*, p : 12-27.
- Richter, G. (1993). Les composés phénoliques métabolisme des végétaux, (physiologie et biochimie), *Edition Dunod*, p : 331-337.
- Rietjens, I. M. C. M.; Boersma, M, G.; de Haan, L.; Spenkeliink, B.; Awad, H. M.; Cnubben, N. H. P. Van Zanden, J. J.; Woude, H. D. V.; Alink, G. M.; and Koeman, J. H. (2002). The pro-

oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11: 321-333.

-Robards, K.; Prenzeler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; and Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436.

-Roginsky, V.; and Lissi, E. A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92 : 235-254.

-Romani, A.; Pinelli, P.; Galardi, C.; Mulinacci, N.; and Tattini, M. (2002). Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, 13:79-86.

-Samarth, R. M.; and Krishna, V. (2007). Evaluation of radical scavenging activity of certain plant extracts using cell free assays. *Pharmacologyonline*, 1: 125-137.

-Schmeda-Hirschmann, G.; Rodriguez, J. A.; Theoduloz, C.; Astodillo, S. L.; Feresin, G. E.; and Tapia, A. (2003). Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus*. *Free Radical Research*, 37 (4): 447-452.

-Sennequier, N.; et Valon-le Goff, S. (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Médecines sciences*, 14 :1185-1195.

-Babior, B.M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med.* 109, 33-44.

-Servais, S. (2004). Altération mitochondriale et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone Effet de l'age et d'une supplémentation en Omiga-3. *Thèse doctorat, université Claude Bernard-Lyon1*, p : 12-14.

-Siddhuraju, P. (2006). Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *LWT*, 40: 982-990.

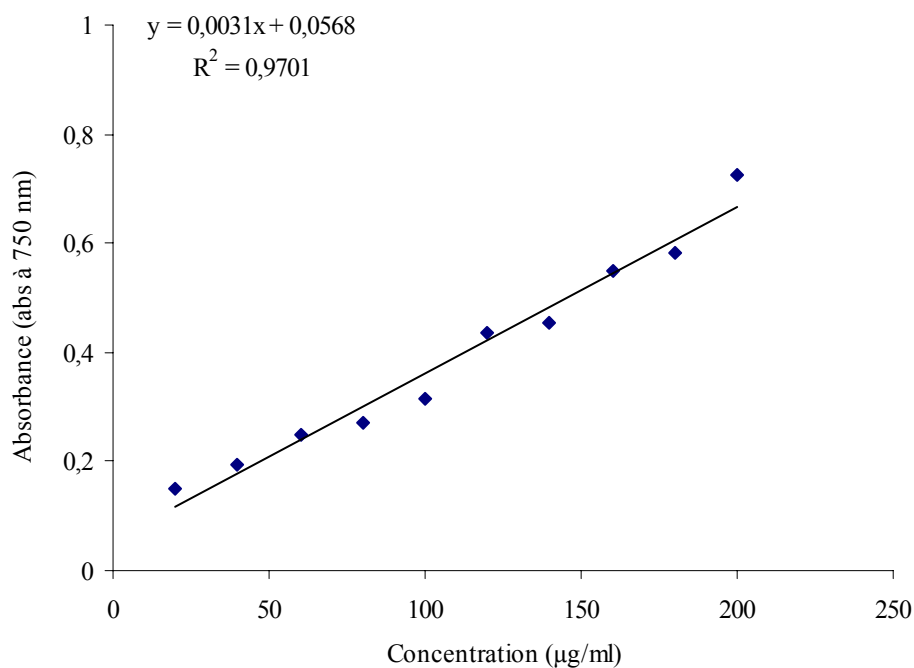
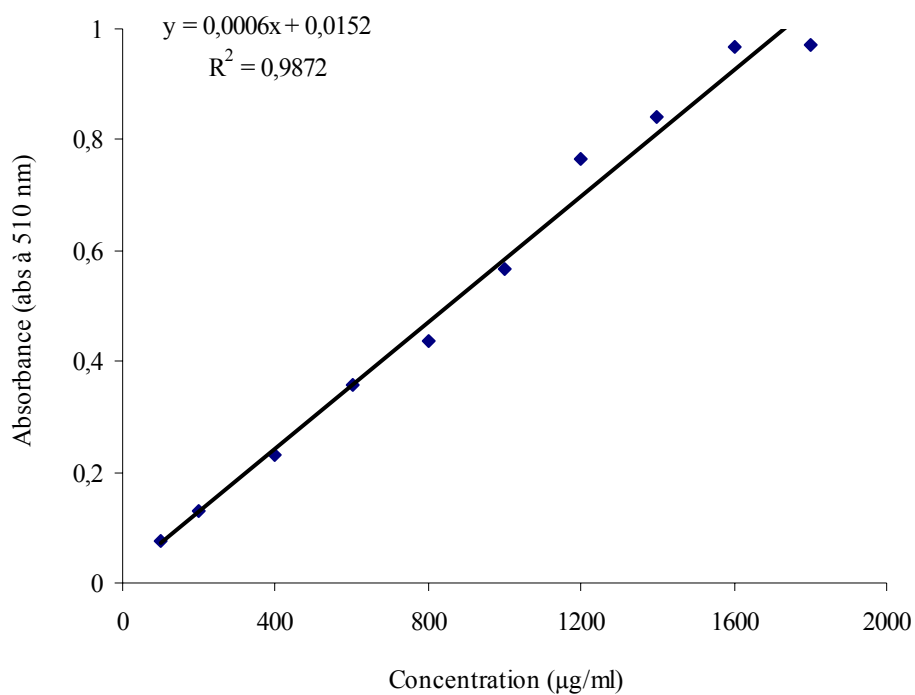
-Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Europe Journal Biochemistry*, 215: 213-219.

- Sievers, A.; Oshinowo, L.; Schultze, W.; Koch, A.; and Richter, R. (2002). Simple thin-layer chromatographic test for antioxydative compounds using DPPH assay. *Camag Bibliography Service*, 88: 14-15.
- Soobrattee, M. A.; Neergheen, V. S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma. O. I.; and Bahorn, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agent: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579: 200-213.
- Topçu, G.; Ay.; M.; Bilici, A.; Sarikurkcu, C.; Ozoturk, M.; and Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103: 816-822.
- Tsoa, R.; and Dengb, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography*, 812: 85-99.
- Umamaheswari, M.; Asokkumar, K.; Rathidevi, R.; Sivashanmugam, A, T.; Subhadradevi, V.; and Ravi, T.K. (2007). Antiulcer and *in vitro* antioxidant activities of *Jasminum grandiflorum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 110:464-470.
- Uriu-Adams, J. Y.; and Keen, C. L. (2005). Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26: 268-298.
- Valko, M.; Labfriz, D.; Moncol, J. Cronin.; Mark T.D.M.; and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biologie*, 39: 44-84.
- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncola, J.; Izakovic. M.; and Mazura, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.
- Valk-Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; and Hras, A. R. (2004). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89: 191-198.

- Vamecq, J.; Vallée, L.; Storme, L.; Gelé, P.; et Bordet, R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*, 18 (1) :16-23.
- Vercauteren. J.; Cheze, C.; Triaud. J. (1998). Polyphénols 96, 18th international conference on polyphenols. *INRA*, p: 32-33.
- Vergely, C. et Rochette L. (2002). Le point sur les NO synthases au niveau cardiovasculaire périphérique. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 51 : 109-116.
- Villano, D.; Fernandez-pachon, M, S.; Moya, M, L.; Traoncoso, A, M.; Garcia-parrilla, M, C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230-235.
- Wei, T.; Sunb, H.; Zhaoa, X.; Houa, J.; Houb, A.; Zhaob, Q.; and Xina, W. (2002). Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallotannin, Pistafolia A. *Life Sciences*, 70: 1889-899.
- William, R. J.; Spencer, J. P. E.; and Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Apsorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (7): 838-849.
- Wong, C. C.; Li.; H. B.; Cheng, K. W.; and Chen, F. (2004). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97: 705-711.
- Xie, D, Y.; and Dixon, R.A. (2005). Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?. *Phytochemistry*, 66: 2127-2144.



Annexes

Annexe 1. Courbes d'étalonnage.**Figure 1:** Coube d'etalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.**Figure 2:** Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tannins.

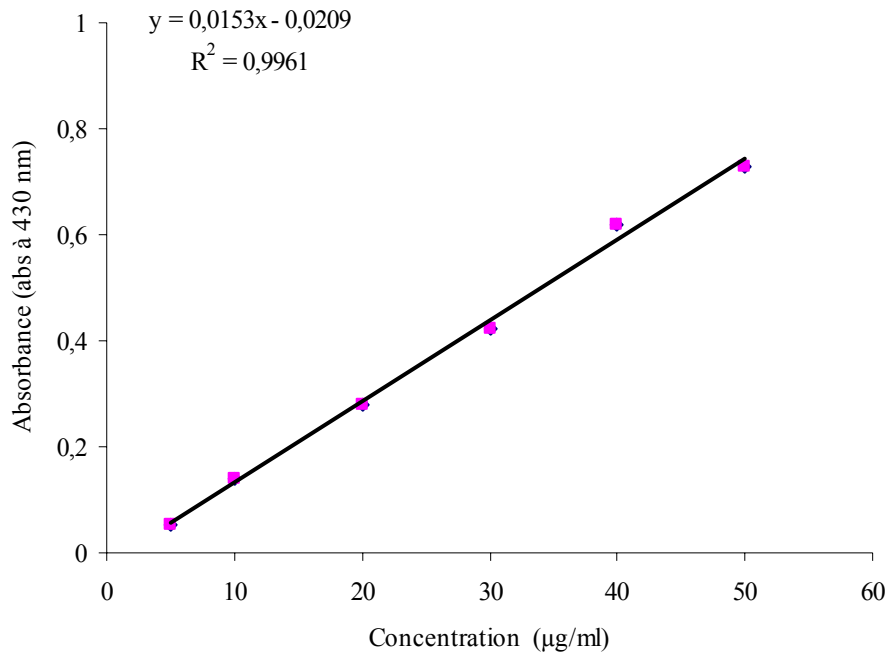


Figure 3: Courge d'étalonnage avec la rutine pour le dosage des flavonoides.

Annexe 2. Courbes de corrélation.

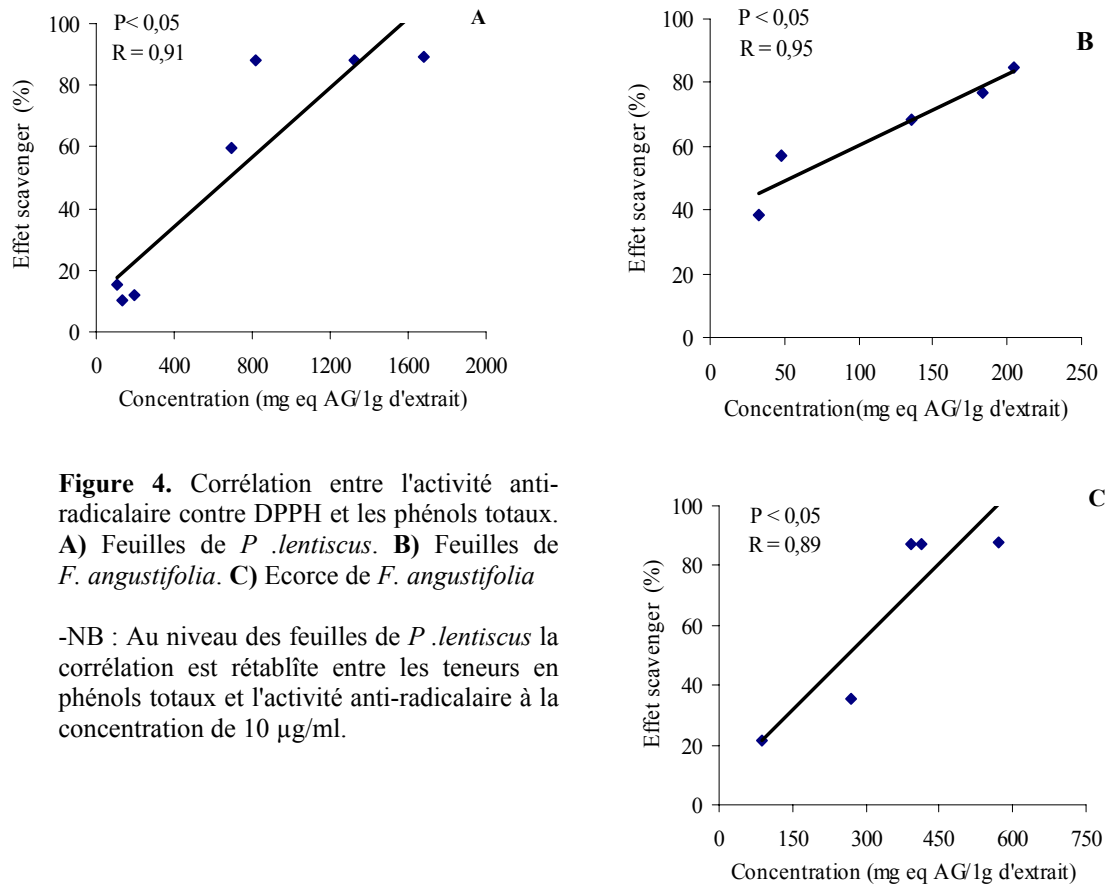


Figure 4. Corrélation entre l'activité anti-radicalaire contre DPPH et les phénols totaux. **A)** Feuilles de *P. lentiscus*. **B)** Feuilles de *F. angustifolia*. **C)** Ecorce de *F. angustifolia*

-NB : Au niveau des feuilles de *P. lentiscus* la corrélation est rétablite entre les teneurs en phénols totaux et l'activité anti-radicalaire à la concentration de 10 µg/ml.

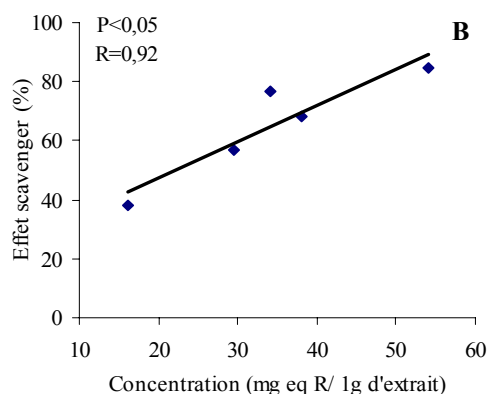
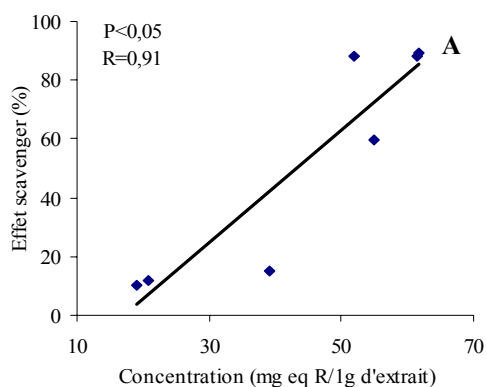


Figure 5. Corrélation entre l'activité anti-radicalaire contre DPPH et les flavonoides. **A)** Feuilles de *P. lentiscus*. **B)** Feuilles de *F. angustifolia*. **C)** Ecorce de *F. angustifolia*

-NB : Au niveau des feuilles de *P. lentiscus* la corrélation est rétablie entre les teneurs en flavonoïde et l'activité anti-radicalaire à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$.

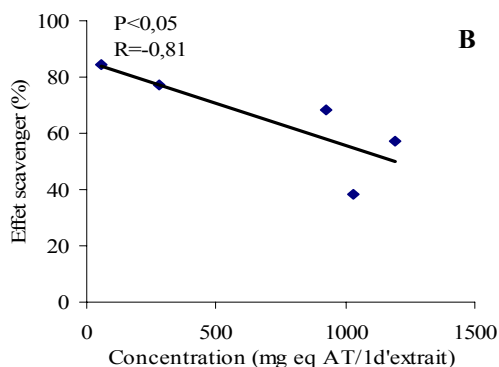
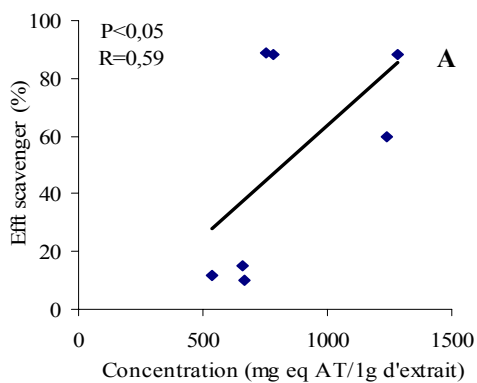
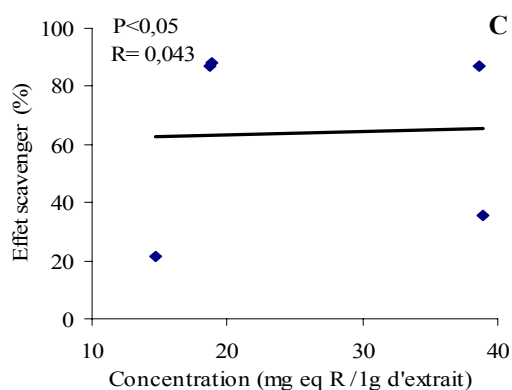
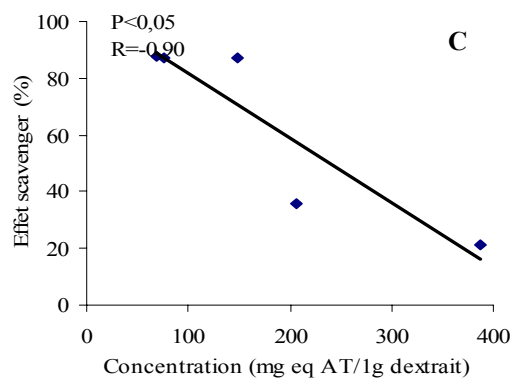


Figure 6. Corrélation entre l'activité anti-radicalaire contre DPPH et les tannins. **A)** Feuilles de *P. lentiscus*. **B)** Feuilles de *F. angustifolia*. **C)** Ecorce de *F. angustifolia*

-NB : Au niveau des feuilles de *P. lentiscus* la corrélation est rétablie entre les teneurs en tanins et l'activité anti-radicalaire à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$.



Résumé

Dans cette étude, les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* ainsi que ceux des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été évalués pour leur activité anti-radicalaire contre le radical stable 1,1 diphénylpicrylhydrazil (DPPH). Nos résultats indiquent que les extraits de feuilles de *P. lentiscus* ont exprimé des effets anti-radicalaires supérieurs à 90% à une concentration de 100µg/ml, dépassant même l'effet des molécules de référence utilisées tels que l'acide gallique, la catéchine et la rutine. D'autre part, l'écorce et les feuilles de *F. angustifolia* ont exprimé aussi des effets relativement importants, notamment au niveau des trois premiers extraits (éthanol, acétate d'éthyle et aqueux d'acétate d'éthyle), tandis que les deux derniers extraits (chloroforme et hexane) ont exprimé des effets faibles.

L'analyse de l'activité anti-radicalaire à différentes concentrations a révélé que les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles de *P. lentiscus* sont doués d'un potentiel anti-radicalaire très intéressant, exprimant des IC₅₀ de 2,89 et 3,08µg/ml, respectivement, similaires à celles de la rutine et de l'acide gallique, suivis par les extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle avec une IC₅₀ de 6µg/ml. Quant aux extraits de *F. angustifolia*, la meilleur IC₅₀ obtenue est celle de l'extrait éthanolique de l'écorce (28µg/ml) alors que les extraits apolaires (chloroforme et hexane) ont exhibé des IC₅₀ trop élevées (>100µg/ml).

La chromatographie sur couche mince appliquée aux différents extraits de *P. lentiscus* et *F. angustifolia* nous a révélé leur richesse en composés phénoliques et nous a permis d'isoler les fractions responsables de l'activité anti-radicalaire.

Ces résultats mettent en valeur les différentes applications thérapeutiques de ces plantes dans la médecine traditionnelle et encouragent la recherche de nouvelles molécules naturelles à caractère anti-oxydant dans le domaine thérapeutique.

Mots clés : Caractérisation, *F. angustifolia*, *P. lentiscus*, 2, 2 diphénylpicrylhydrazil (DPPH), activité anti-radicalaire, chromatographie sur couche mince.

Abstract

Extracts of the leaves of *P. lentiscus* and the leaves and bark of *F. angustifolia* have been evaluated for their free radical scavenging activity against the stable radical 2,2 diphénylpicrylhydrazil (DPPH). Our results indicate that the *Pistacia lentiscus* leaf extracts exhibited high scavenging activity superior to 90% at a concentration of 100µg/ml, even higher than that of gallic acid, catechin and rutin. On the other side, *Fraxinus angustifolia* leaf and bark extracts showed also relatively high activity, especially ethanol, ethyl acetate and aqueous ethyl acetate extracts, whereas the last two extracts (chloroform and hexane) showed rather weak activities.

Analysis of scavenging activity using varying concentrations revealed that aqueous fractions from hexane and chloroform of *P. lentiscus* leaf extracts showed an interesting anti-radical capacity, with IC₅₀ values of 2.89 and 3.08µg/ml, respectively, similar to those of rutin and gallic acid, followed by ethanolic and aqueous fraction of ethyl acetate extracts with IC₅₀ of 6µg/ml. In the case of *F. angustifolia*, the best IC₅₀ is that of bark ethanolic extract (28µg/ml) whereas chloroform and hexane extracts exhibited high IC₅₀ values (>100µg/ml).

Thin layer chromatography analysis of *P. lentiscus* and *F. angustifolia* extracts revealed the richness in phenol compounds and allowed the isolation of fractions responsible for scavenging activity.

These results highlight the different therapeutic applications of these plants in traditional medicine and stimulate research of novel natural molecules with antioxidant potential for therapy.

Keywords: Characterization, *F. angustifolia*, *P. lentiscus*, 2, 2 diphénylpicrylhydrazil (DPPH), anti-radical activity, thin layer chromatography.

الخلاصة:

قد قيمت فيما يخض *Fraxinus angustifolia* و كذلك أوراق و قشرة *Pistacia lentiscus* في هذه الدراسة. مستخلصات أوراق *P. lentiscus* عند التركيز 100 90 % قد أصهرت فعولات ضد جذرية تفوق *P. lentiscus*. نتائجا تبين أن مستخلصات أوراق DPPH فعاليتهم ضد الجذر *F. angustifolia* الكتشن و الروتين و من جهة أخرى أوراق و قشرة هذه النسبة تجتاز حتى مفعول الجزيئات المرجعية المستعملة كحمض الغليك. مل قد أبدت أيضا فعولات معتبرة نسبيا. خصتا على مستوى المستخلصات الثلاثة الأولى (الاثانول . ائيل الاسيتات و ميه ائيل *angustifolia* دراسة هذه المفعولا عند تركيز مختلف قد بينت أن الاسيتات) بينما المستخلصين الآخرين (الكوروفورم و الهكسان) قد اطهرت مفعولات ضعيفة. و 3.08 بقدرة ضد جذرية هامة باء عطاءها تراكيز كبح ب 50% تعادل 2.68 *P. lentiscus* لمستخلات ميه الكوروفورم و الهكسان أوراق لممتازة قد سجلت فتركيز الكبح *F. angustifolia* مماثلة لتلك التي وجدت لدى حمض الغاليك اما مستخلصات أوراق و قشرة هذه تركيزات. مل / غ 28 مل بينما مستخلصا الكوروفورم و الهكسان قد عبرت على تركيزات الكبح الكبرى / غ على مستوى مستخلص الاثانول للقشر بقدر 100) مل / غ (.

بينت لنا غناهم بجزيئات متعددة *F. angustifolia* و *P. lentiscus* لدراسة الكرومطوغرافية على قطع لمساء المستعملة على مختلف المستخلصات الفول و مكنت لنا عزل الجزيئات المسؤولة على هذه القدرة ضد جذري.

هذه النتائج قد قيمت استعمال هذه النباتات في معالجة الكثير من الأمراض في الطب التقليدي وتسجع البحث على جزيئات جديدة متميزة بقدرة ضد التأكسد في المجال العلاجي

فمفعولات ضد جذرية, الكرومطوغرافية, 2, 2 diphénylpicrylhydrazil, (DPPH) 2, *P. lentiscus*, *F. angustifolia*, تعيين كلمات المفتاح: على قطع لمساء