

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

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

# MEMOIRE DE FIN DE CYCLE

En vue de l'obtention du Diplôme Master  
En Biologie  
Option : Biochimie Appliquée

## *Thème*

**Activité anti-NADH oxydase des  
extraits de *Fraxinus angustifolia* et  
*Pistacia lentiscus* : Caractérisation  
chromatographique.**

Présenté par :

**OUADFEL Souria  
OUHROUCHE Lina**

Devant le jury :

**Président: M.GHIDOUCHE A. (MCB)  
Promoteur : M.ATMANI Dj. (Prof)  
Examineur : M. HAMOUM M. (MAA)  
Examinatrice : M<sup>elle</sup> CHERAFT N. (MAA)  
Invitée : M<sup>elle</sup> AHMANE N.**

*Promotion : 2013/2014*

# *Remerciements*

*Louange à dieu, le miséricordieux, sans lui rien de tout cela n'aurait pu être.*

*Au terme de ce travail, il nous est agréable d'adresser nos remerciements à tous ceux qui nous ont octroyé main vigoureuse pour sa*

*Réalisation à :*

*Monsieur D.J. Atmani*

*Pour le temps et l'intention qu'il a bien voulu consacrer au bon déroulement de ce travail.*

*Monsieur A.GhIDOUCHE*

*De nous avoir fait l'honneur de juger le travail et présider le jury.*

*Monsieur M.Hamoum et M<sup>lle</sup> N. Cheraft*

*Pour avoir accepté de donner de leur temps pour évaluer ce travail.*

*Madame D. Atmani*

*Pour avoir accepté de nous accueillir pour mener à terme nos travaux.*

*M<sup>lle</sup> N. Ahman*

*Pour sa présence et son aide précieuse.*

*A toute l'équipe du laboratoire Génétique*

*Nous tenons également à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

# *D*édicaces

*Louange à dieu, le tout puissant.*

*En guise de remerciement je dédie ce travail*

*A ceux qui m'ont soutenu nuits et jours, et durant tout mon parcours.*

*A vous très chers parents, je vous dis merci.*

*A mes sœurs Radia, Hafida et Katia, à mon frère Tahar, à ma belle-sœur  
naima et toute sa famille.*

*A tous mes amis djidjette, Nadjia, tania, ouarda, lyli, lillih, saddek, riad, abdou,  
cicci et djidji et foudil.*

*A toutes les mains qui m'ont été tendu...*

*A toute la promotion Biochimie Appliquée.*

*Lina.*

# *D*édicaces

*Je dédie ce travail*

*A mes très chers et précieux parents qui m'ont toujours soutenu, et à l'intérêt qu'ils m'ont toujours porté pour mes études, je ne les remercierai jamais assez,*

*Pour tout ce qu'ils m'ont fait.*

*Que dieu nous les protèges.*

*A mes frères et sœurs qui n'ont jamais cessés de m'encourager dans la poursuite de mes études en m'apportant soutien moral, et financier*

*A toutes personnes qui m'ont soutenu durant mes études et à ma binôme Lina et sa famille et à tous mes amis : Louanes, Nadjia, Abdou, Riad, Saddek, Abbas, Djamel , Ciccie et Djahida.*

*A toute la promotion biochimie appliquée 2014.*

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

*Souria.*

## Liste des abréviations

**Aac:** Acide acétique.

**Af :** Acide formique.

**ADN:** Acide désoxyribonucleique.

**Bicine :** Bis Hydroxyméthyle glycine.

**CCM :** Chromatographie sur couche mince.

**DTT :** Dithiothreitol.

**Ea:** Ethylacetate.

**F :** Fraction.

**FAD:** Flavine Adénine Dinucléotide.

**FA :** *Fraxinus angustifolia*.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peroxyde d'hydrogène.

**Mo : Molybdène**

**NAD<sup>+</sup> :** Nicotinamide Adénine Dinucléotide (oxydé).

**NADH:** Nicotinamide Adénine Dinucléotide (réduit).

**NADH oxydase :** Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydase.

**PL:** *Pistacia lentiscus*.

**RNS:** Reactive nitrogenspecies.

**ROS:** Reactive oxygen species.

**XOR:** Xanthine oxydoréductase.

**XDH :** Xanthine déshydrogénase

**XO:** Xanthine oxydase.

## Liste des figures

<b>Figure (1)</b> la biosynthèse des composés phénoliques par la voie de shikimate.....	6
<b>Figure (2)</b> La biosynthèse des composés phénoliques par la voie de phénylalanine .....	8
<b>Figure (3)</b> la voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	9
<b>Figure (4)</b> représente l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	11
<b>Figure (5)</b> arbuste de <i>Pistacia lentiscus</i> . .....	12
<b>Figure (6)</b> Evaluation de l'activité anti-NADH oxydase par les extraits de l'écorce de FA...	19
<b>Figure (7)</b> Observation sous UV des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> . .....	20
<b>Figure (8)</b> Pulvérisation de la vanilline sulfurique des plaques chromatographiques de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	21
<b>Figure (9)</b> Evaluation de l'activité Anti NADH oxydase des fractions de l'extrait aqueux d'éthyle acétate .....	23
<b>Figure (10)</b> Inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> . .....	26
<b>Figure (11)</b> Chromatogramme des fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de PL observé sous une lampe UV. ....	27
<b>Figure (12)</b> Observation des fractions après révélation par la vanilline sulfurique .....	27
<b>Figure (13)</b> Inhibition de l'activité NADH oxydase par les fractions de l'extrait éthanolique de Pl .....	30

## Liste des Tableaux

<b>Tableau (1)</b> classification des polyphénols .....	10
<b>Tableau (2)</b> Classifications des plantes. ....	12
<b>Tableau (3)</b> Taux d'extractions des différents extraits de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> et feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> .....	18
<b>Tableau (4)</b> calcul des Rfs des taches de l'écorce de FA dans le système (Ea : Aac : Af : Eau). ....	22
<b>Tableau (5)</b> Résultats des Rf des Fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de Pl. ....	28

## Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction .....	1

### Synthèse bibliographique

I. La xanthine oxydoréductase .....	2
I.1. Rôle de la XOR .....	3
I.2. Les inhibiteurs de la xanthine Oxydoréductase.....	4
I.2.1. Les Inhibiteurs synthétiques.....	4
I.2.2. Les inhibiteurs naturels de la XOR .....	4
II. Les composés phénoliques.....	5
II.1. La biosynthèse des polyphénols.....	5
II.1.1. Voie de shikimate.....	5
II.1.2. La voie de polyacétate.....	7
II.1.3. La voie de phénylpropanoïde .....	7
II.1.4. La voie de biosynthèse des flavonoïdes .....	7
I.1. Classification des polyphénols .....	10
I.2. Rôle biologiques.....	10

### Partie expérimentale

I. Matériels et Méthodes.....	11
I.1. Matériel végétal .....	11
I.1.1. <i>Fraxinus angustifolia</i> .....	11
I.1.2. <i>Pistacia lentiscus</i> .....	11
I.1.3. Classification des deux plantes.....	12
I.2. Méthodes .....	13
I.2.1. Extraction .....	13
I.2.2. Préparation de la forme déshydrogénase de la xanthine oxydoréductase .....	14
I.2.3. Etude de l'activité inhibitrice de l'activité NADH oxydase.....	14



I.2.4. Etude de l'activité inhibitrice de la XOR par les extraits .....	14
I.2.5. Chromatographie sur colonne de gel de sephadex LH 20 .....	15
I.2.6. Chromatographie sur couche mince .....	16
II. Résultats et discussions .....	18
II.1. Extraction .....	18
II.2. Essais d'inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits de l'écorce de <i>FA</i> .....	19
II.2.1. Évaluation de l'activité anti-NADH oxydase.....	19
II.2.2. Observation sous UV. ....	20
II.2.3. Révélation par la vanilline sulfurique. ....	21
II.2.4. Caractéristiques et résultats des chromatogrammes.....	22
II.2.5. Evaluation de l'activité Anti NADH.....	23
II.2.6. Discussion des résultats des CCMs.....	24
II.3. Essais d'inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits de PL.....	26
II.3.1. Observation sous UV .....	27
II.3.2. Révélation par la vanilline sulfurique .....	27
II.3.3. Caractéristiques et résultats des chromatogrammes.....	28
II.3.4. Évaluation de l'activité anti-NADH oxydase.....	29
Conclusion et perspectives .....	31

Références bibliographiques

Résumé

---

# **Introduction**

---

## Introduction

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Après plusieurs études, on a su qu'elles étaient pour la majorité attribuées aux composés secondaires dont les alcaloïdes, les terpènes et les composés phénoliques. Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et agroalimentaires : ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique, expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation.

Actuellement, le développement des méthodes d'extraction et des techniques d'analyses physico-chimiques et biologiques a permis une meilleure connaissance de la composition des plantes. La recherche des extraits végétaux riches en molécules à fort pouvoir antioxydant et la mesure de l'activité antioxydant dans différents milieux restent des domaines de recherche importants.

A l'heure où l'efficacité est devenue une des caractéristiques principales d'une bonne technique d'extraction, l'extraction des polyphénols assistée constitue une alternative très intéressante qui peut permettre des durées d'extraction courtes tout en maintenant des rendements élevés.

C'est dans ce contexte de l'étude de l'extraction et de la stabilité des polyphénols que notre travail a pris naissance. Le programme de recherche s'articule autour des axes principaux :

Tester l'effet inhibiteur de *Fraxinu sangustifolia* et *Pistacia lentiscus* sur l'activité NADH oxydase et fractionner l'extrait ayant exhibé une meilleure inhibition.

Tester l'effet inhibiteur des fractions sur l'activité NADH oxydase.

---

# **Synthèse bibliographique**

---

---

# Chapitre I

---

## I. La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe métalloflavo-protéique, qui a été découverte la première fois dans le lait bovin par **Schardinger (1902)**. Elle existe sous deux formes inter-convertibles : la xanthine déshydrogénase qui est la forme la plus dominante et la xanthine oxydase. Chez les mammifères, la XOR existe originalement sous la forme déshydrogénase (XDH), mais elle peut être convertie en forme oxydase (XO) durant le processus de l'extraction de la purification par des modifications qui sont :

-Soit réversibles par oxydation des résidus sulfhydryle (SH) en utilisant des solvants organiques ou par incubation anaérobique. Cette conversion est accomplie par modification de cystéine : Cys 535 et Cys 992 (**Enorth et al., 2000**).

-Soit irréversibles par protéolyse en utilisant des enzymes protéolytiques comme la trypsine, la chymotrypsine et la pancréatine (**Della Corte et al., 1969**). La trypsine clive la XDH après la lysine (Lys 551) et la pancréatine clive après Leu 219 et Lys 569. Par contre, les formes déshydrogénase de la poule et la drosophile ne sont pas converties en forme oxydase (XO) (**Nishino et al., 1997**).

La XOR peut réagir avec plusieurs substrats dont les purines, les pyrimidines et les ptéridines (**Krenitsky et al., 1974**). La propriété catalytique principale la plus connue est le catabolisme des purines où elle convertit l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique qui est le produit final du catabolisme des purines chez l'homme. En outre, cette réaction est accompagnée de la production du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (**Parks et al., 1986**), d'où le rôle attribué à la XOR dans le stress oxydatif.

La XOR intervient aussi sur un autre aspect en utilisant le NADH comme substrat. En effet, la XOR catalyse la transformation du NADH en NAD<sup>+</sup> tout en produisant des radicaux libres (**Atmani et al., 2005**). L'avantage de cette deuxième voie est qu'elle peut être mise en place sans conversion de la XDH en XO, puisque la XDH dégrade le NADH aussi bien que la XO.

La XOR existe chez les mammifères sous forme déshydrogénase, mais peut être convertie sous forme oxydase soit d'une manière irréversible ou réversible. Les réactions des deux enzymes impliquent des substrats analogues avec des accepteurs d'électrons différents (**Engerson et al., 1987**).

La différence est observé au niveau du cofacteur flavine et ses accepteurs d'électrons ; la XO accepte l' $O_2$  comme substrat réducteur tandis que la XDH utilise le  $NAD^+$ . Le site de liaison NAD situé à côté de la flavine est instable chez la XO ; en revanche il est stable chez la XDH (Mc Manaman *et al.*, 1996).

### I.1. Rôle de la XOR

- **Rôles physiologiques**

La (XOR) est une enzyme qui a une propriété catalytique très importante dans le catabolisme des purines en urate. La XOR a des propriétés antimicrobiennes par sa capacité d'inhiber la croissance bactérienne. Une activité anti-oxydante est attribuée à l'enzyme par le biais de la production de l'urate. La XOR est suggérée d'avoir un rôle dans d'autres processus physiologiques tel que les mécanismes de transduction du signal (Meneshian and Bulkley, 2002).

- **Rôles physiopathologiques**

La XOR est également une source importante de radicaux libres (superoxyde) ; elle produit l' $O_2^-$  et le  $H_2O_2$ . Ces deux espèces oxygénées peuvent être par la suite des précurseurs des autres espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou du nitrogène (RNS) qui sont impliquées dans les grands dommages cellulaires et tissulaires. Ces espèces réactives peuvent induire un changement structural des molécules biologiques; les lipides, les protéines et l'ADN. La XOR joue un rôle important dans différentes formes de pathologies humaines telles que les maladies inflammatoires, les lésions post-ischémiques, les dommages tissulaires et vasculaires et les maladies cardiaques chroniques (Pacher *et al.*, 2006).

Le système enzymatique xanthine /xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique. La production d'espèces réactives de l'oxygène par la xanthine oxydase est faible en condition basale, mais jouera un rôle important lors de l'ischémie-réperfusion (Ling, 2001).

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande en ATP et déficit en oxygène, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Pendant cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^-$  (Garait, 2006).

## I.2. Les inhibiteurs de la xanthine Oxydoréductase

### I.2.1. Les Inhibiteurs synthétiques

- **L'allopurinol**

L'allopurinol est un analogue de l'hypoxanthine, dans lequel les atomes N et C en position 7 et 8 sont interchangeés (**Iwata *et al.*, 1998**), considéré comme inhibiteur compétitif de la Xanthine oxidase (**Chang *et al.*, 1994**).

- **Salicylate**

Le salicylate est un inhibiteur compétitif de la XO, et interagit avec plusieurs acides aminés du site actif (Arg 880, Phe914, Thr 1010, et Glu 1261) (**Danny *et al.*, 2002**).

- **Arsénite et le cyanure**

L'arsénite agit en bloquant le transfert des électrons du centre molybdène vers les centres Fe<sub>2</sub>/S<sub>2</sub> et FAD. Le cyanure à son tour agit en libérant le soufre du site Mo (**Ellis *et al.*, 2000**).

- **Le diphényliodonium**

C'est l'inhibiteur spécifique de l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase ; il agit préférentiellement au niveau du site FAD, contrairement aux inhibiteurs de l'activité xanthine oxydase qui agissent au niveau du site molybdène. (**Lin *et al.*, 2002**).

### I.2.2. Les inhibiteurs naturels de la XOR

- **L'acide urique**

L'acide urique est un inhibiteur compétitif de la XOR grâce à son analogie au substrat. Il favorise la réoxydation de la XOR (**Radi *et al.*, 1992**).

- Les composés phénoliques dont on cite :

Acide Gallique, et l'acide ellagique (**Rebereau, 1992**).

Flavonoïdes : les flavonols (le kaempferols, la quercétine (**Aucomp *et al.*, 1997**)). Coumarines : Esculetine (**Chang *et al.*, 1994**).

Quinones : L'alizarine (**Sheu *et al.*, 1997**).



---

# Chapitre II

---

## II. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux qui ne sont pas essentiels à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal. Cependant, ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (**Desjardin, 2008**). Les polyphénols sont subdivisée en plusieurs catégories qui sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins issus de la polymérisation des flavonoïdes, les lignanes qui, avec les isoflavones, sont nommés aussi des phyto-œstrogènes (**Martin et al., 2002**).

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarettes, polluants, infections,...) qui favorisent le vieillissement cellulaire. Ingérés avec nos aliments, ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromolécules) contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les diverses maladies chroniques associées, telle que le cancer, les maladies cardio-vasculaires ou l'ostéoporose. Ils peuvent aussi interagir de manière spécifique avec des récepteurs cellulaires tels que les récepteurs des œstrogènes et induire ainsi des effets plus spécifiques sur l'organisme (**Scalbert et al., 2004**).

### II.1.La biosynthèse des polyphénols

#### II.1.1. Voie de shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques (la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane) (figure 1). Ces acides aminés aromatiques sont, quant à eux, synthétisés à partir du phosphoenolpyruvate et de l'érythrose-4-phosphate au cours d'une succession de réactions appelées voie de l'acide shikimique (**Hopkins, 2003**).

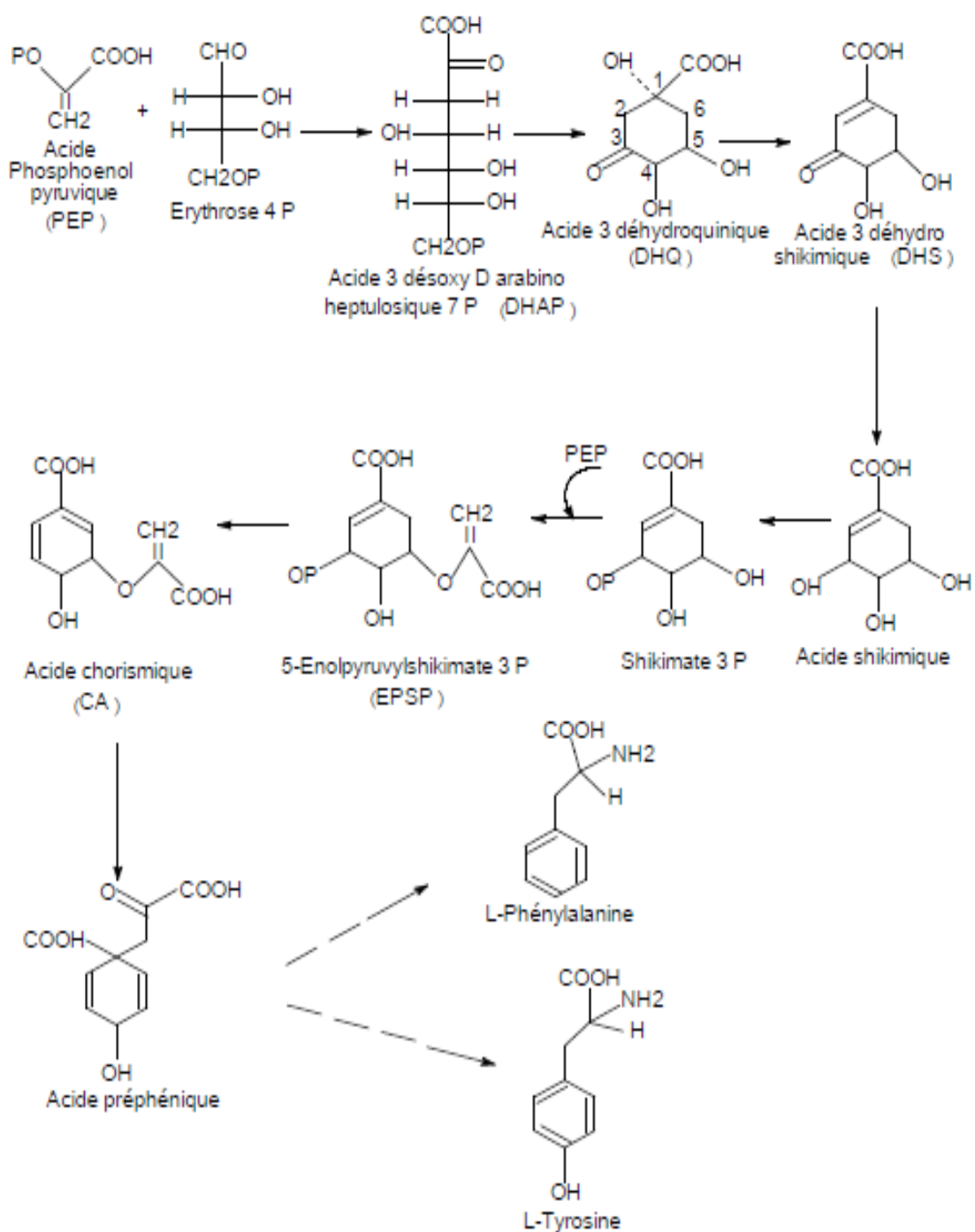


Figure (1) la biosynthèse des composés phénoliques par la voie de shikimate (Floss, 1997)

### **II.1.2. La voie de polyacétate**

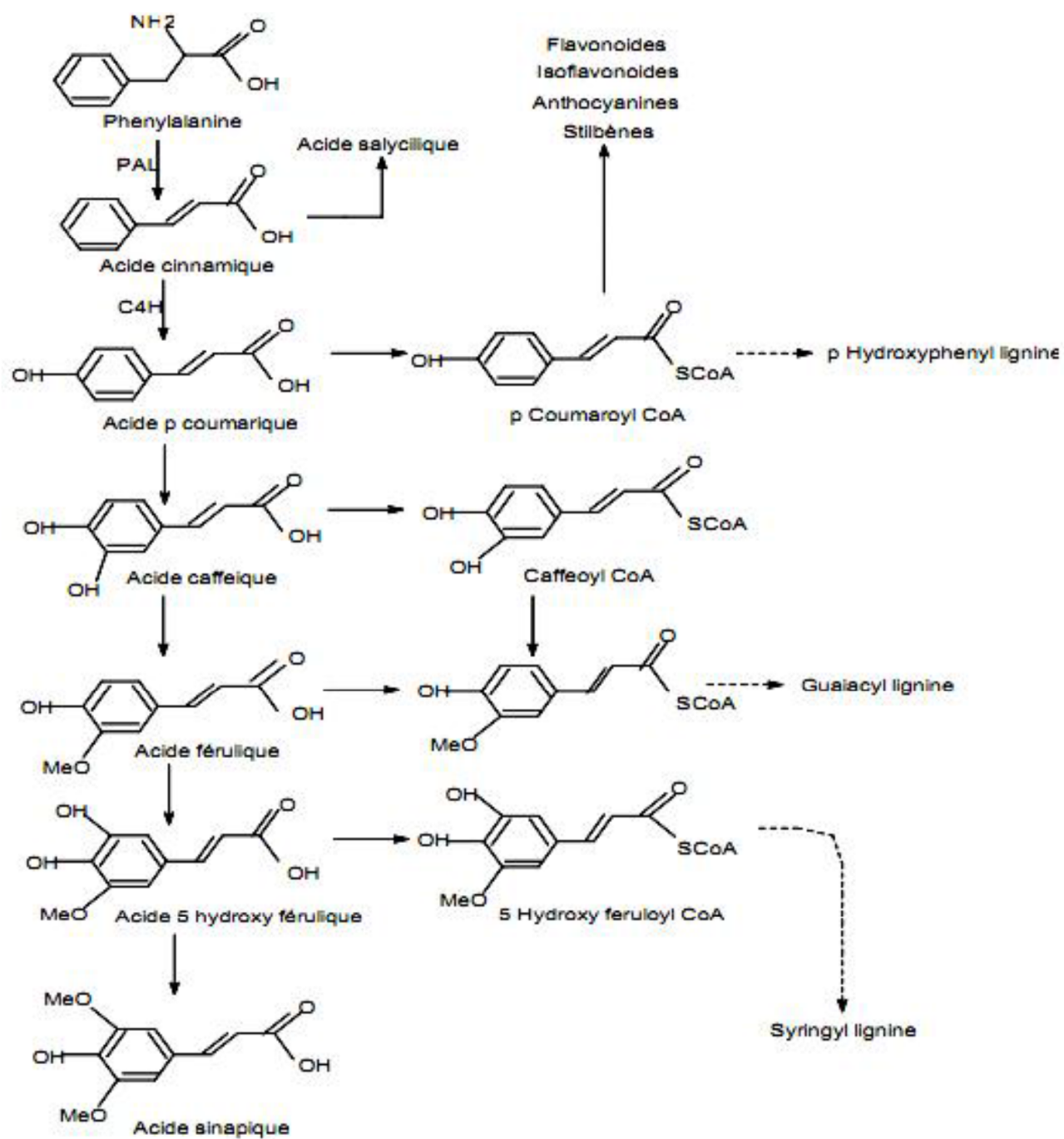
C'est la deuxième voie de biosynthèse, la plus fréquente chez les bactéries, champignons et plantes inférieures. Elle consiste à réaliser non plus un seul noyau benzénique, mais un ensemble de noyaux aromatiques par cyclisation d'une chaîne polycétonique, elle-même obtenue par condensation de groupement acétate (**Buchanan *et al.*, 2000**).

### **II.1.3. La voie de phénylpropanoïde**

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Figure 2) (**Portes, 2008**).

### **II.1.4. La voie de biosynthèse des flavonoïdes**

Les flavonoïdes se trouvent d'une manière systématique dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Ils possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune (Figure 3) (**Maamri, 2008**).



**Figure (2)** La biosynthèse des composés phénoliques par la voie de phénylalanine (Mouffok, 2011).

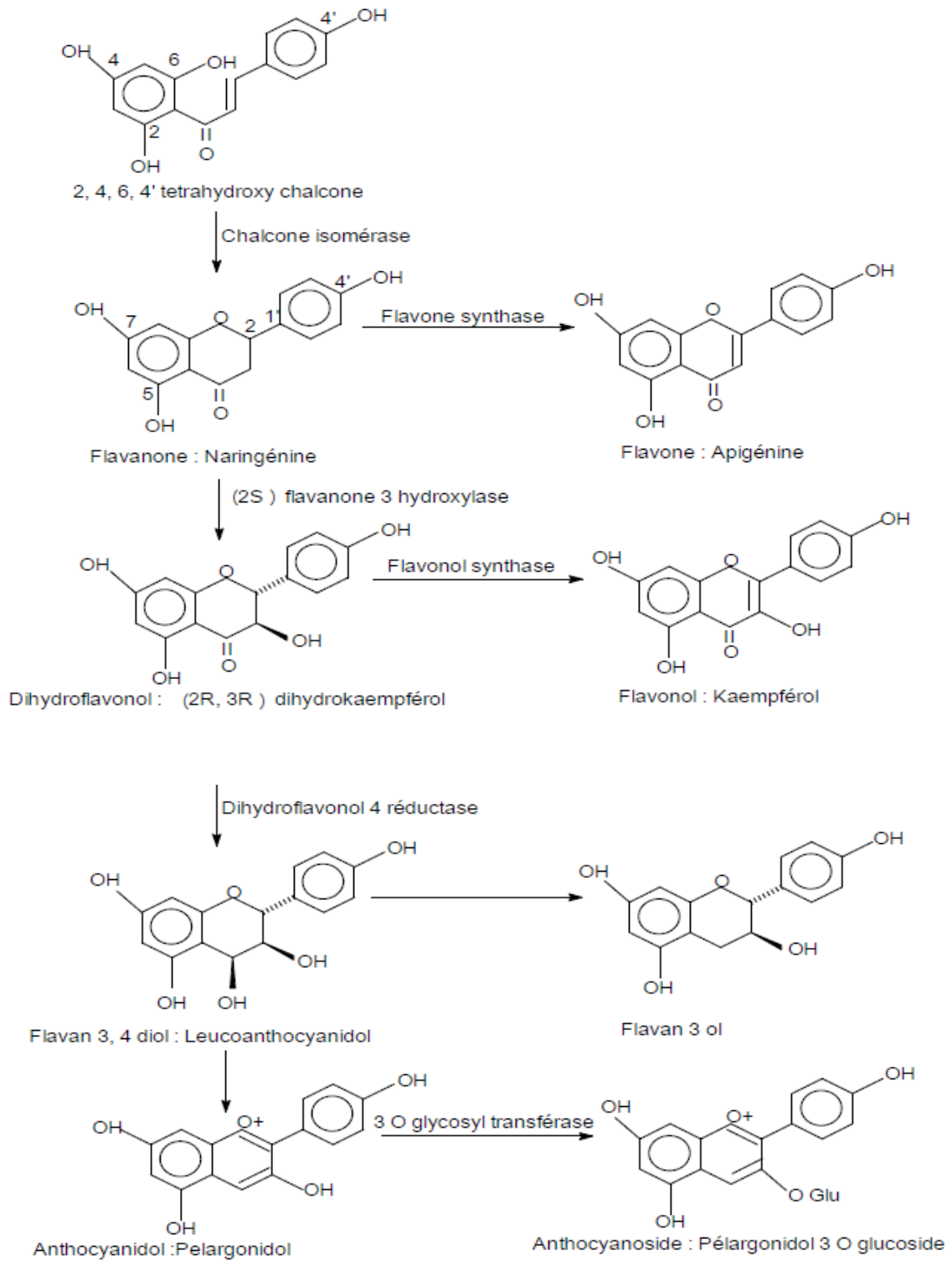


Figure (3) la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Subsamanian *et al.*, 2007).

## II.2.Classification des polyphénols

On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base. La classification ci-dessous est basée sur le nombre de carbones dans le squelette de la molécule (Tableau 1) (Pravo, 1998).

**Tableau (1)** classification des polyphénols (Pravo, 1998).

Classe	Formule
Phénol simple	C6
Acidehydroxybenzoïque	C6-C1
Acidehydroxycinnamique	C6-C3
Coumarines	C6-C3
Stilbenes	C6-C2-C6
Flavonoïdes	C6-C3-C6
Lignines	(C6-C3) n
Tannins	(C6-C3-C6) n

## II.3.Rôle biologiques

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et, de ce fait, sont des éléments faisant partie de l'alimentation. A titre d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 10g de ces composés par jour. Ces substances sont largement utilisées en thérapeutique comme anti-inflammatoires, antiallergiques, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, antiulcéreux, anti-tumoraux, antimicrobiens et anti-radicalaires (Bahorun, 1997).

C'est ainsi que notre étude a porté sur l'effet des extraits de deux plantes médicinales : *Fraxinus angustifolia* et *Pistacia lentiscus*, largement utilisées en médecine traditionnelle, sur l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase, enzyme d'une grande importance en physiopathologie humaine.

---

# **Partie expérimentale**

---



---

# Chapitre I

---

## I. Matériels et Méthodes

### I.1. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* et d'écorces de *Fraxinus angustifolia*.

#### I.1.1. *Fraxinus angustifolia*

Le frêne oxyphyle est un arbre à taille modéré, à tronc court, à écorce gris et à feuilles caduques, composés pennés, elle est d'une distribution variée, en régions méditerranéenne, dans le sud de l'Europe, l'Ouest de l'Asie (jusqu'à l'ouest de l'Iran) ; le nord de l'Afrique (nord de l'Algérie et du Maroc) (**Mahmoudi, 1990**).

L'écorce de *Fraxinus angustifolia* (Figure 04) a été utilisées par nos ancêtres, depuis des années, pour traiter les hémorragies passives, la goutte chronique, la lithiase biliaire et surtout contre les fièvres intermittentes (**Beloued, 1998**).



**Figure (1)** représente l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

#### I.1.2. *Pistacia lentiscus*

Le lentisque (*pistacia lentiscus*) est un arbuste poussant dans les garrigues et les maquis des climats méditerranéens, (cette plante contient plusieurs familles de composés huiles essentielles, polyphénols...etc), auxquels reviennent ses propriétés thérapeutiques et son utilisation dans divers domaines, notamment en médecine traditionnelle (**Derbel et Ghedira 2005; Abdelwahed et al., 2007**). *Pistacia lentiscus* est utilisé contre les affections bronchiques, les irritations, les diarrhées, les ulcères de l'estomac et les inflammations.

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* sont riches en composés phénolique tel que les tannins, les flavonoïdes glycosides, elles renferment aussi des huiles essentielles comme le pinène et le terpinen-4-ol (Messaoudi, 2005).



**Figure (2)** arbuste de *Pistacia lentiscus*.

### I.1.3. Classification des deux plantes

**Tableau (1)** Classifications des plantes.

<b>Classification</b>	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>
Règne	Végétal	Végétal
Division	Angiosperme	Magnoliophyta
Classe	Dicotylédones	Magnolipsida
Ordre	Oléales	Sapindales
Famille	Oleaceae	Anacardiaceae
Genre	Fraxinus	Pistacia
Espèce	<i>Fraxinus angustifolia</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>
Nom commun	Frene oxyphyle	Lentiseque Pistacia
Nom local	Aslen, « dardar »	Thidekth, Amadhagh

## Récolte

Les échantillons (écorce pour *Fraxinus angustifolia* et feuilles pour *Pistacia lentiscus*) ont été récoltés au niveau de la région d'Azru n Bechar à Amizour wilaya de Bejaia (juillet 2013).

## Séchage

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* et les écorces de *Fraxinus angustifolia* ont été séchées à l'aire libre et à température ambiante.

## Broyage

Le broyage de l'écorce et des feuilles a été réalisé avec un Broyeur électrique, pour obtenir une poudre fine.

## Tamisage

La poudre obtenue a été tamisée dans un premier tamiseur de 125 µm de diamètre puis par un deuxième tamiseur de 63 µm de diamètre afin d'obtenir une poudre très fine.

## I.2. Méthodes

### I.2.1. Extraction

Dans le but d'extraire le maximum de composés nous avons utilisé une extraction sélective avec plusieurs solvants (**Atmani et al., 2009**), avec quelques modifications. 500g de poudre des deux parties de plantes ont été macérés dans de l'éthanol avec un rapport de 1 :4 (p/v). Le mélange a été laissé sous agitation pendant 24h. L'extrait éthanolique obtenu a été remis dans un mélange eau/acétate d'éthyle avec un rapport de 1 :3 : 1 (p/v/v). Après séparation et séchage, la phase organique d'acétate d'éthyle subit une extraction avec un mélange chloroforme /eau avec un rapport de 1 :3 : 1 (v/v/v) (**Atmani et al., 2009**).

Les taux d'extraction ont été calculés pour chaque extrait comme suit :

$$T_E (\%) = \left( \frac{P_1 - P_0}{P_t} \right) \times 100$$

$P_1$  : poids de la boîte de pétri après évaporation.

$P_0$  : poids de la boîte de pétri à vide.

$P_t$  : poids total de l'extrait.

### **I.2.2. Préparation de la forme déshydrogénase de la xanthine oxydoréductase**

La XOR purifiée a été incubée avec le dithiothreitol (DTT) (10mM), pendant 1H à 37°C avant chaque expérience, puis passée à travers une colonne de sephadex G-25, préalablement lavée avec un tampon bicine (50mM), pH 8,3 pour enlever le DTT.

### **I.2.3. Etude de l'activité inhibitrice de l'activité NADH oxydase**

- **Préparation des solutions tests**

La solution d'extrait est préparée comme suit : 10mg d'extrait brut dissous dans 1 ml de méthanol. Plusieurs molécules de référence ont été testées pour leur effet inhibiteur sur la xanthine déshydrogénase. Les solutions ont été préparées de la même façon que les solutions d'extraits.

- **Préparation de la solution tampon**

Tampon Bicine (50 mM, pH : 8.3).

- **Préparation de la solution de substrat (xanthine)**

0,0076g de xanthine ont été dissous dans 2 ml de NaOH (0,2M), et le volume a été ajusté jusqu'à 50 ml avec la solution tampon.

### **I.2.4. Etude de l'activité inhibitrice de la XOR par les extraits**

L'activité de la XOR est mesurée par spectrophotométrie par la détermination de l'absorbance à 340nm (caractéristique de la diminution du NADH), consommé par la XOR. L'effet inhibiteur des solutions tests sur l'activité XDH est déterminé par la diminution de l'absorbance comparée au contrôle.

- **Contrôle (sans extrait)**

20 µL de la solution enzymatique sont additionnés à une solution contenant 1760 µL de tampon Bicine (50mM, pH : 8.3), 20 µL de Méthanol et 200 µL de NADH, la concentration de l'acide urique est estimée à 340 nm chaque seconde pendant 3 min, la vitesse caractéristique de chaque substrat est déterminée par le calcul de la moyenne des pentes  $\Delta A$  (nm) / t (sec) des trois essais réalisés. Le blanc est préparé de la même façon sans la solution enzymatique.

- **Echantillon test (avec extrait)**

Un volume de 20 µL de la solution enzymatique est additionné à une solution contenant 1760 µL du tampon Bicine (50 mM, pH : 8.3), 20 µL d'extrait (100µg/ml) et 200µl de solution xanthine. Le blanc est préparé de la même façon mais sans la solution enzymatique.

L'activité inhibitrice (%) de la XOR est déterminée par la mesure de la diminution de l'absorbance à 340nm caractéristique de la diminution de la génération de l'acide urique :

% d'inhibition =  $(1 - \Delta A \text{ test} / \Delta A \text{ contrôle})$ , où :

$\Delta A$  contrôle : est le changement d'absorbance par seconde pour le test contrôle (sans extrait).

$\Delta A$  test : est le changement d'absorbance par seconde pour l'échantillon test (avec extrait).

### **I.2.5. Chromatographie sur colonne de gel de sephadex LH 20**

Préparation de la colonne Sephadex LH 20 : Rinçage de la colonne avec du méthanol 24h avant l'utilisation. Pour la préparation du gel : on a utilisé 30g de sephadex mis 24h avant l'utilisation, dans 120 ml de méthanol, pour être gonfler et prêt à utiliser.

L'introduction du gel de sephadex LH20 dans la colonne a été réalisée avec une micropipette, puis la laisser jusqu'à décantation.

Nous avons introduit ensuite l'extrait de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. (800 mg de l'extrait aqueux d'éthyle acétate dissous dans 1 ml de méthanol), puis récupération des fractions après élution. Le même protocole a été réalisé avec *Pistacia lentiscus*.

### **I.2.6. Chromatographie sur couche mince**

La chromatographie sur couche mince a été déjà utilisé par (**Željan et al., 2013**) afin de réaliser une détermination quantitative de Flavonoïdes et acide chlorogénique utilisant les feuilles de *Arbutus unedo*. C'est la même technique que nous avons utilisée dans le but de caractériser les composés phénoliques de l'écorce de *fraxinus angustifolia* et de feuilles de *pistacia lentiscus*.

- **Préparation des plaques chromatographiques**

Les plaques ont été d'abord nettoyées à l'eau distillée. Le gel est constitué de 60 g de silice mélangés à 100ml d'eau distillé. Puis, le gel a été étalé sur les plaques grâce à un étaleur, formant des plaques de 0.5mm d'épaisseur. Les plaques ont été séchées à l'air libre puis activées dans une étuve à 105C° pendant 30 min. Les plaques sont tracées par deux lignes, limitant la distance de migration des extraits (14cm). Les extraits (800mg d'extrait dilué dans 1ml de méthanol) et les standards (05mg dilué dans 1ml de méthanol) ont été déposés sous forme de spots de 10 µl.

- **Préparation de la cuve chromatographique**

Le système utilisé est composé d'éthyle acétate (67,5 ml), acide acétique (7,43 ml), acide formique (7,43 ml) et eau distillé (17,86 ml). Le mélange de solvants a été introduit dans la cuve chromatographique, à environ 0.5 cm du fond de la cuve ; la cuve a été fermée pour assurer la saturation en vapeur de solvants pendant au moins 02 heures.

- **Dépôt de l'échantillon sur la plaque**

L'échantillon a été déposé à l'aide d'une micropipette, puis les plaques ont été placées dans la cuve en position verticale. Lorsque le front du solvant se trouve à l'extrémité supérieure de la plaque, cette dernière est retirée.

- **Observation sous UV**

Après séchage, les plaques ont été observées sous une lampe UV à 365nm dans le but de révéler les fractions ainsi que leurs aspects.

- **Révélation par la vanilline**

Après la révélation, les plaques ont été pulvérisées par la solution de vanilline, préparée avec 3g de vanilline, 50ml d'éthanol et acide sulfurique. Les plaques sont ensuite dans une étuve à 105C° pendant 15 à 30 mn, jusqu'à l'apparition des taches colorées.



---

# Chapitre II

---

## II. Résultats et discussions

### II.1.Extraction

Afin de récupérer un maximum de substances actives, les feuilles de *Pistacia lentiscus* et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été séchées à l'air libre. Dans le but d'augmenter la surface de contact avec les solvants, le broyage et le tamisage ont été réalisés de manière à récupérer une poudre de diamètre inférieur ou égale à 63 $\mu$ m.

L'extraction est réalisée selon un protocole bien choisi utilisant plusieurs solvants pour isoler les différents composés que contient la poudre et cela en fonction de leur polarité, permettant ainsi leur fractionnement entre les phases polaires et apolaires.

Le taux d'extraction de l'extrait éthanolique a été calculé à partir de la poudre initiale et la suite des taux à partir de l'extrait issu de l'étape précédente. Le tableau ci-dessous présente les pourcentages d'extraction des deux plantes

**Tableau (1)** Taux d'extractions des différents extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et feuilles de *Pistacia lentiscus*.

Solvant	% d'extraction de l'écorce de FA	% d'extraction de feuilles de PL
Ethanol	4.81%	17.07%
Acétate d'éthyle	14.43%	64.05%
Aqueux acétate d'éthyle	57.42%	79.18%
Chloroforme	70.35%	22.08%
Aqueux chloroforme	7.11%	2.063%

Le taux d'extraction le plus élevé est celui du chloroforme et l'aqueux d'acétate d'éthyle pour FA ; en revanche, les taux d'extraction les plus élevés pour PL sont l'aqueux acétate d'éthyle et acétate d'éthyle. Les plus faibles pourcentages obtenus sont ceux des extraits aqueux de chloroforme.

D'après les résultats présentés dans le tableau précédent, on constate que les taux d'extraction des extraits aqueux, mis à part l'aqueux d'acétate d'éthyle, sont faibles par rapport

aux extraits organiques, ce qui nous mène à suggérer que l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est faible en composés polaires.

Les faible taux d'extraction observé chez *Fraxinus angustifolia* (éthanol) et *Pistacia lentiscus* (aqueux chloroforme) ne signifie pas la pauvreté de ces deux plantes en composé phénolique.

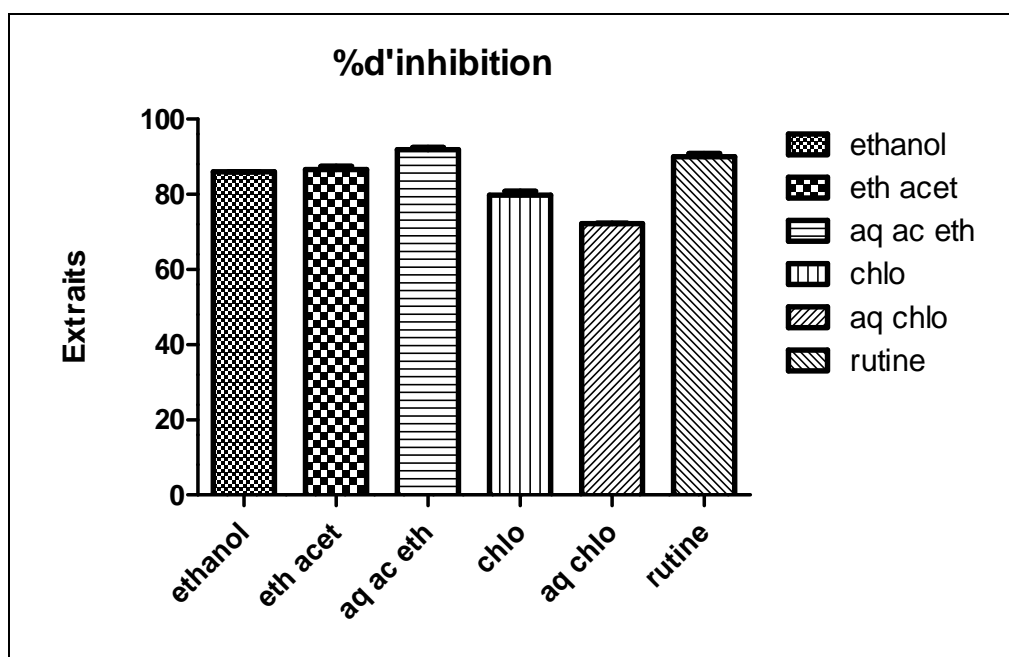
L'extraction des composés phénolique est influencée par leur nature chimique et la méthode d'extraction ainsi que la différence entre les parties du matériel végétal utilisé (feuilles, écorce).

## II.2. Essais d'inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits de l'écorce de FA

L'inhibition de la Xanthine déshydrogénase entrainera à la fois la diminution de la concentration en acide urique et les espèces réactive de l'oxygène, ce qui va prévenir les maladies liées au stress oxydatif et à l'acide urique.

### II.2.1. Évaluation de l'activité anti-NADH oxydase

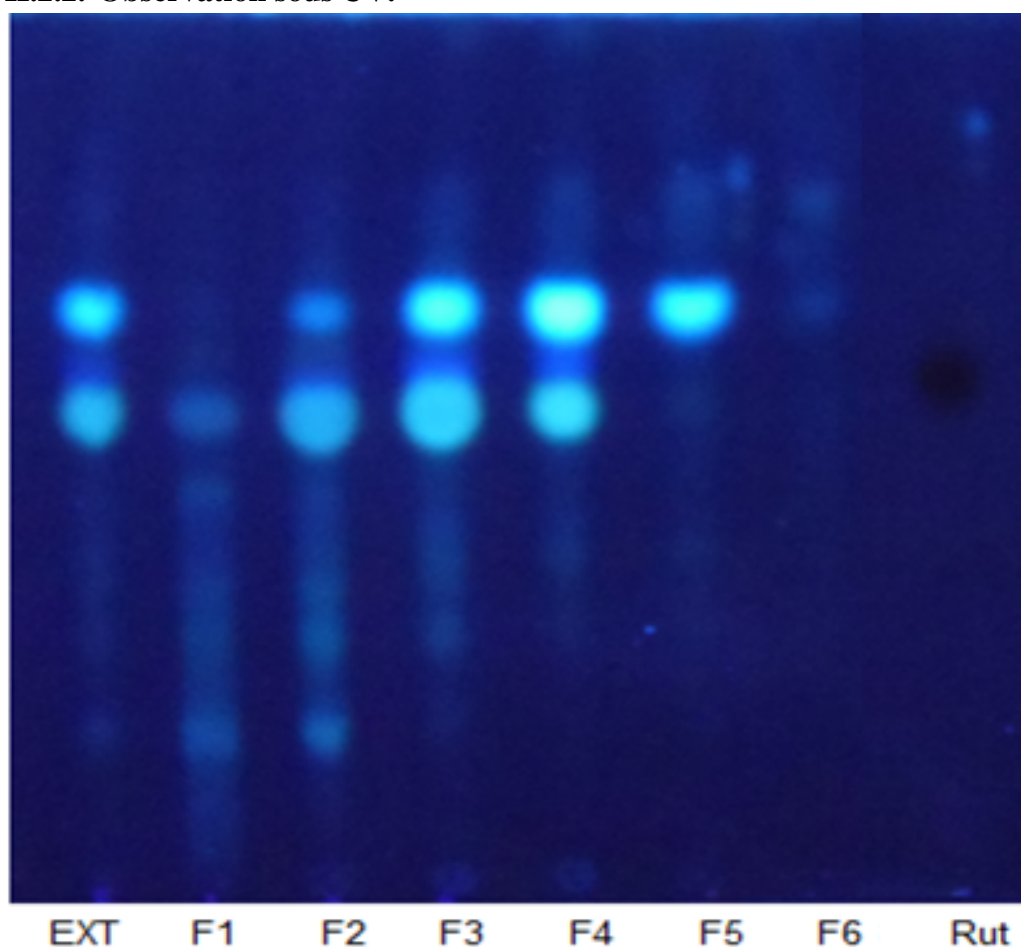
Les résultats obtenus pour l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont présentés dans la figure (06). On remarque que tous les extraits inhibent l'activité NADH oxydase.



**Figure (1)** Evaluation de l'activité anti-NADH oxydase par les extraits de l'écorce de FA (**Eth acet** : acétate d'éthyle, **aq ac eth** : aqueux acétate éthyle, **chlo** : chloroforme, **aq chlo** ; aqueux de chloroforme.)

On remarque que, à l'exception de l'extrait aqueux de chloroforme, tous les extraits présentent une très bonne activité inhibitrice. En effet, l'extrait aqueux d'éthyle acétate a exhibé l'activité la plus élevée avec  $91.65 \pm 0,56\%$ , suivi par l'extrait d'éthyle d'acétate avec un taux de  $86.64 \pm 0,79\%$ , l'extrait éthanolique avec un taux de  $85.92 \pm 0,07\%$  et l'extrait de chloroforme avec un taux d'inhibition de  $79.83 \pm 0,94\%$ . L'extrait aqueux de chloroforme a présenté une activité moyenne de  $72.18 \pm 0,12\%$  alors que le standard possède une très bonne activité ( $89.93 \pm 0,965\%$ ).

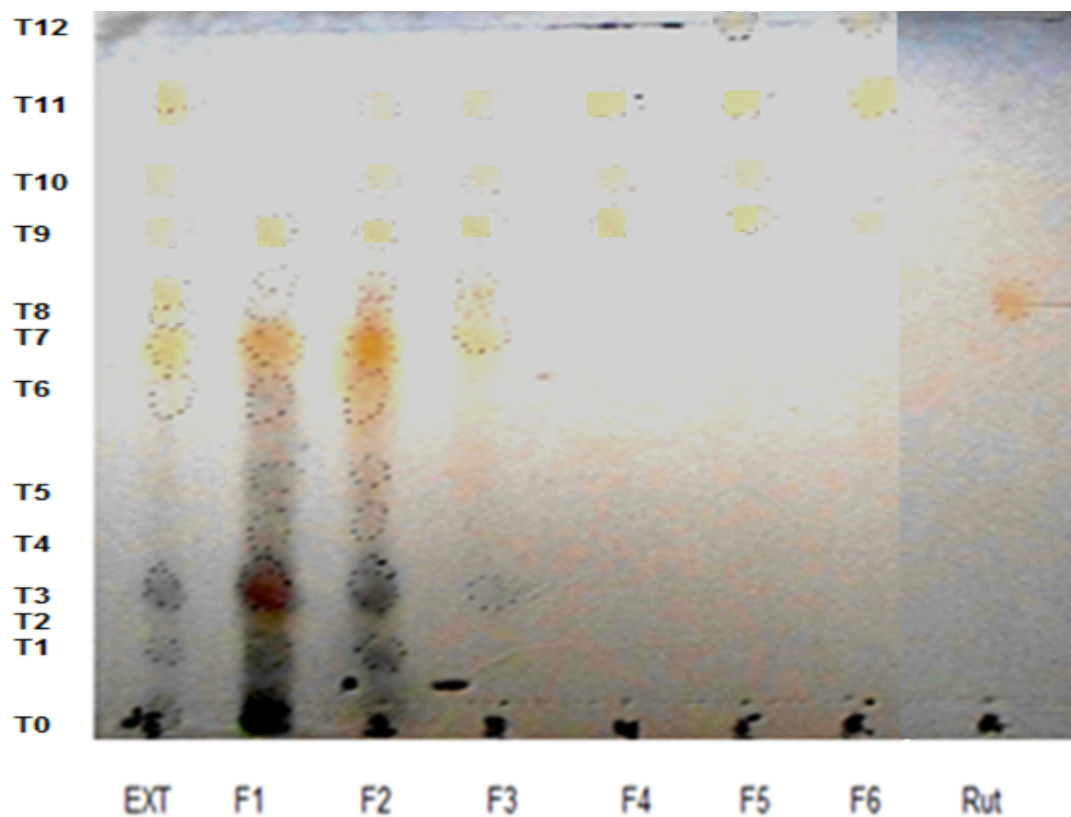
### II.2.2. Observation sous UV.



**Figure (2)** Observation sous UV des fractions de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à 365 nm (**EXT** : extrait, **F** : fraction, **Rut** : rutine.).

### II.2.3. Révélation par la vanilline sulfurique.

Cette révélation permet de mettre en évidence d'autres tâches qui ne sont pas visible à la lumière du jour.



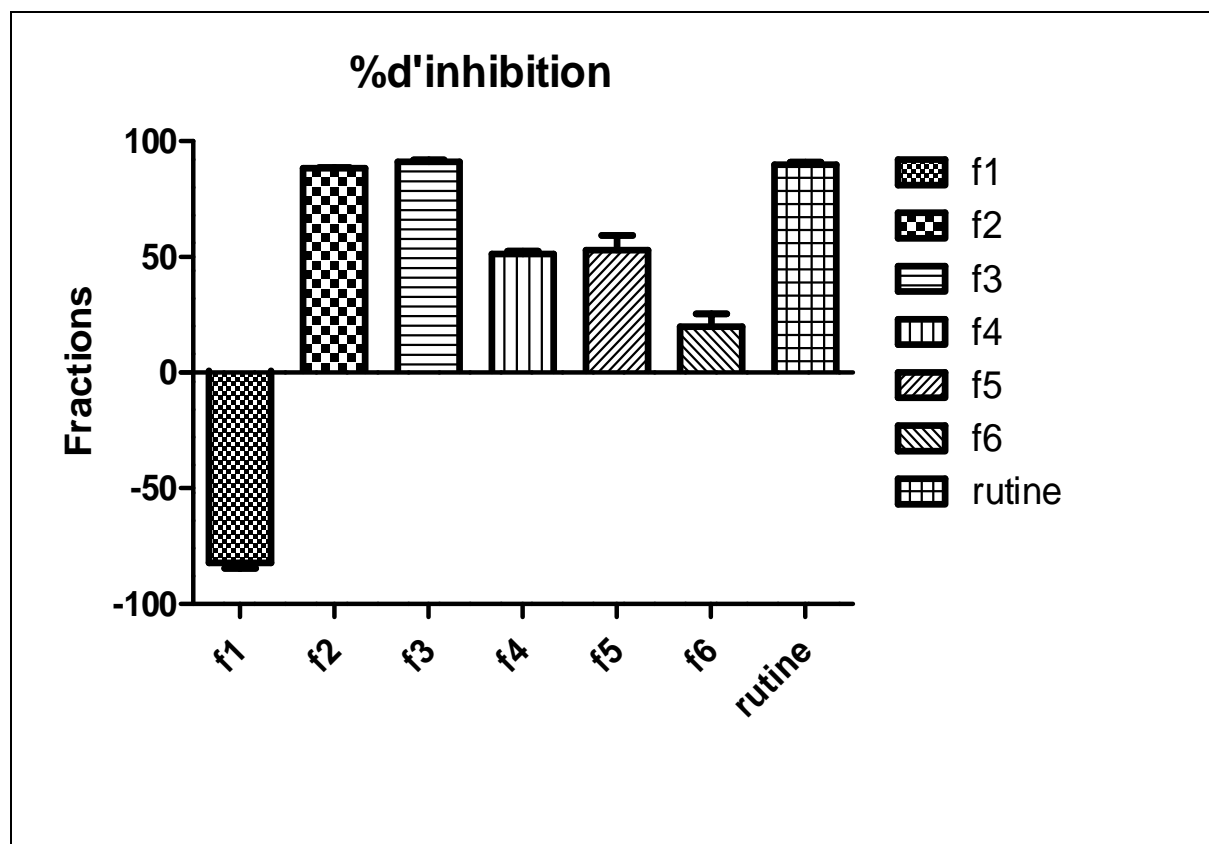
**Figure (3)** Pulvérisation de la vanilline sulfurique des plaques chromatographiques de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* (EXT : extrait, F : fraction, T : tache.).

La figure montre l'apparition de 12 taches ayant des couleurs et Rf similaire avec l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et la F1 avec 10 taches, suivis par la F2 avec 11 taches, la F3 montre une similitude à l'extrait avec 7 taches. Tandis que la F4, F5 et F6 montrent une similitude de 3, 4, 3 taches respectivement.

**II.2.4. Caractéristiques et résultats des chromatogrammes.**

**Tableau (2)** calcul des Rfs des taches de l'écorce de FA dans le système (Ea : Aac : Af : Eau).

													Taches		
T12	T11	T10	T9	T8	T7	T6	T5	T4	T3	T2	T1	T0	Rf	Couleur	Extrait
													Fractions		
/	0,9	0,76	0,69	0,59	0,51	0,44	0,32	0,25	0,16	0,11	0,08	0	Rf	Couleur	Extrait
	Jaune claire	Jaune claire	Jaune	Jaune	Jaune claire	Jaune claire	Jaune claire	Violet	Violet	Violet	Violet	Violet claire			
/	/	/	0,69	0,59	0,51	0,44	0,39	0,25	0,16	0,11	0,08	0	Rf	Couleur	F1
/	/	/	Jaune	Jaune	Orange	Rose	Rose	Gris	Rouge	Jaune	Violet	Bleu			
/	0,9	0,76	0,69	0,59	0,51	0,44	0,32	0,25	0,16	/	0,08	0	Rf	Couleur	F2
/	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Orange	Orange	Rose	Rose	Violet	/	Violet	Violet			
/	0,9	0,76	0,69	0,59	0,51	/	0,32	/	0,16	/	/	/	Rf	Couleur	F3
	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune		Rose		Violet						
/	0,9	0,76	0,69	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Rf	Couleur	F4
	Jaune	Jaune	Jaune												
/	1	0,9	0,76	0,69	/	/	/	/	/	/	//	/	Rf	Couleur	F5
	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune											
1	0,9	/	0,69	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Rf	Couleur	F6
	Jaune		Jaune												
/	/	/	/	0,59	/	/	/	/	/	/	/	/	Rf	Couleur	Rutine
				Jaune foncé											

**II.2.5. Evaluation de l'activité Anti NADH oxydase.**

**Figure (4)** Evaluation de l'activité Anti NADH oxydase des fractions de l'extrait aqueux d'éthyle acétate (**f1** : fraction1, **f2** : fraction 2, **f3** : fraction 3, **f4** : fraction 4, **f5** : fraction 5, **f6** : fraction6.).

### II.2.6. Discussion des résultats des CCMs

Les résultats du fractionnement nous ont permis d'obtenir 6 fractions dont F2, F3, F4, F5 et F6 ont montré des activités inhibitrices tandis que la F1 a montré un effet pro-oxydant en générant des ROS à partir de l'oxygène qui active à leur tour l'enzyme par formation de pont disulfure.

Le système (EA :Aac : Af : Eau)(100,11,11,26) est adéquat pour la séparation des extraits de *F. angustifolia*.

Dans ce système, les extraits de l'écorce de *F. angustifolia* sont fractionnés en douze taches.

La révélation avec la vanilline sulfurique des extraits de cette plante a permis de mettre en évidence des composés qui ne sont pas visible à la lumière de jour.

D'après le tableau et les figures les fractions présentent des couleurs différentes, ce qui signifie la richesse de cette plante en composés différents.

La couleur grise de la tache 4 de la F1, après pulvérisation par la vanilline, indique la présence de composés stéroïdes. L'obtention de cette couleur est due à une hydrolyse acide sur les formes complexes (**Andriambelson, et al.1998**), telle que les saponines qui s'hydrolysent en sucre et en aglycone nommé sapogénine.

Les fractions F1 et F2 des extraits donnent des taches de couleur orange après révélation, donc il s'agit très probablement de flavonoïdes (**Benhamou et al., 2008**).

Les taches T0, T1 et T3 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et la F2 présentent une coloration violette après révélation par la vanilline, donc ces taches correspondent à des terpènes semblables au menthol (**Wichtl et Anton, 2003**).

Nous avons observé que T4 T5 T6 T7 T8 T9 T10 T11 T12 de l'extrait et T8 de F1 F2 F3 ; la tache T9 de F1 F2 F3 F4 F5 F6 et la tache T10 de F2 F3 F4 F5 ; la tache T11 de F6 et la tache T12 de F5 et F6 présentent une coloration jaune. On peut suggérer que ces extraits sont riches en flavonoides de type heptamethoxy flavones (**Stacckle, 1961**).

la tache 8 de l'extrait et les fractions (F1, F2 et F3) ont une couleur jaune et un Rf similaires à la rutine. En effet, **Kostova et ses collaborateurs (2007)** ont isolé la rutine au niveau de l'écorce de cette plante.

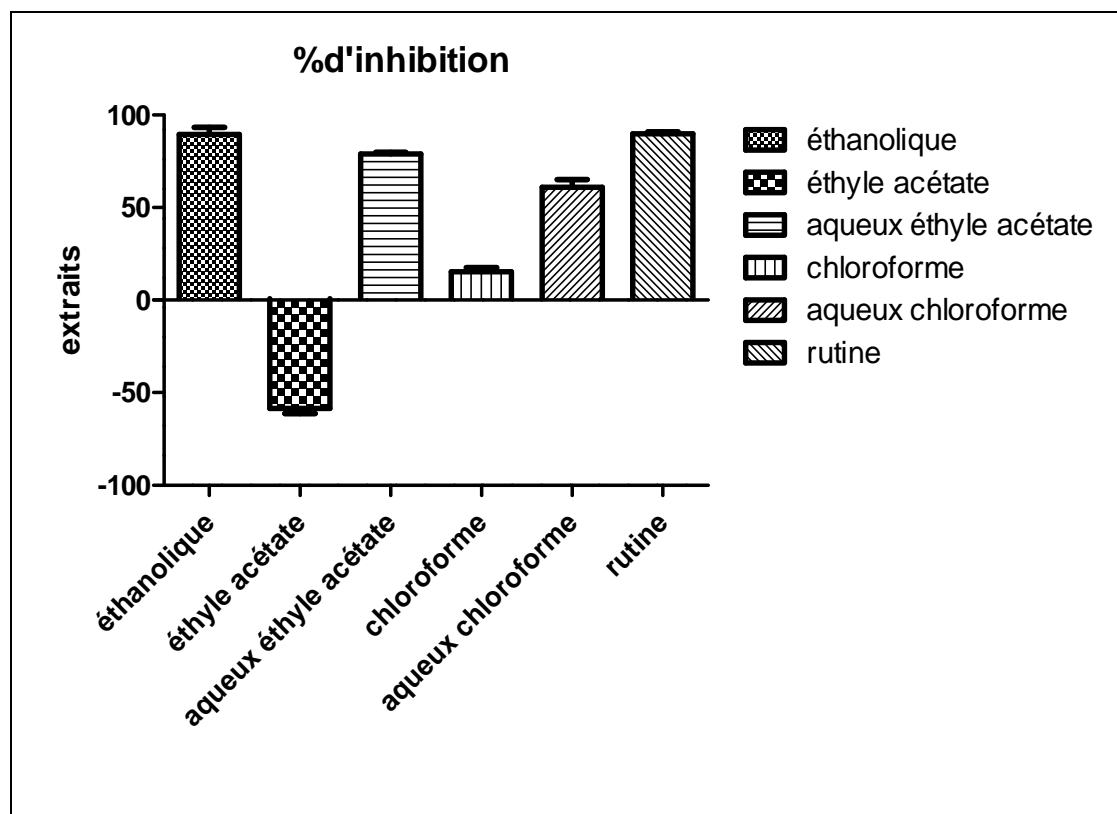


La présence d'une tache T3 rouge en F1 correspondrait à des tannins non hydrolysables (**Andriambelson *et al.*, 1998**). Par ailleurs, les taches roses T5 de F1 F2 et la F3 et T6 de F1 présentent une coloration rose qui correspond probablement à un anthocyane di-glycosylés (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

D'après les résultats on suggère que l'effet pro oxydant de la F1 (-82,24%) est dû à la richesse de cette fraction en tannins non hydrolysables, tannins gallique, et en composés stéroïdes. Tandis que l'effet inhibiteurs des fractions F2 et F3 avec 88,41% et 91% peut être du à la présence des composés tels que les coumarines, flavonoïdes et anthocyane di-glycosylés.

### II.3.Essais d'inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits de PL.

Les résultats obtenus pour les feuilles de PL sont présentés dans la figure (10). On remarque que tous les extraits inhibent l'activité NADH oxydase mis à part l'extrait acétate d'éthyle qui présente un effet activateur sur l'activité NADH oxydase.



**Figure (5)** Inhibition de l'activité NADH oxydase par les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*.

D'après les résultats, on remarque que tous les extraits inhibent l'activité NADH oxydase à part l'extrait d'acétate d'éthyle qui présente un effet activateur sur l'activité NADH oxydase

Les activités inhibitrices les plus élevées sont celles de l'extrait éthanolique avec  $89,65 \pm 3,56$  suivi par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, aqueux de chloroforme et chloroforme avec  $78,95 \pm 0,99$ ,  $60,86 \pm 4,21$  et  $15,41 \pm 2,12$ , respectivement. L'extrait acétate d'éthyle a montré un effet activateur ( $-58,41 \pm 2,81$ ). Cela semblerait être dû d'une part à la présence de polyphénols inhibant l'activité NADH oxydase, et d'autre part à la présence de composés stimulant cette activité.

### II.3.1. Observation sous UV

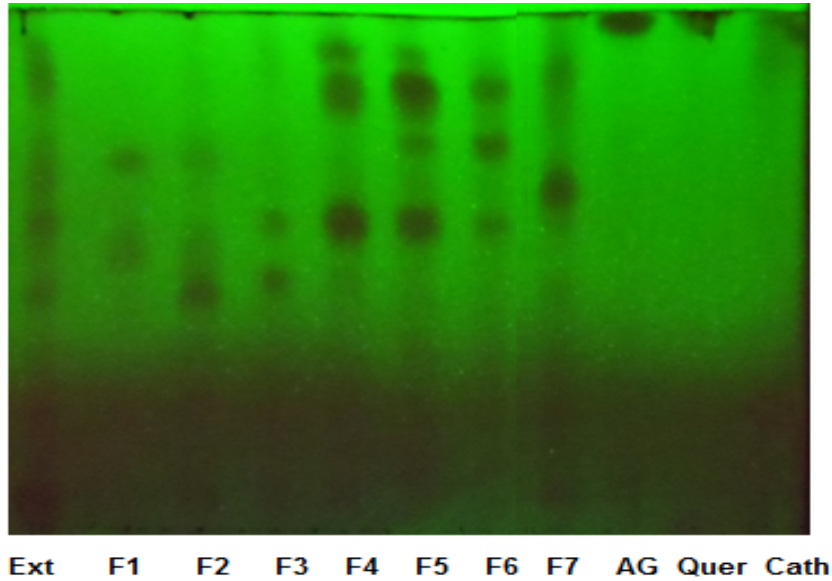
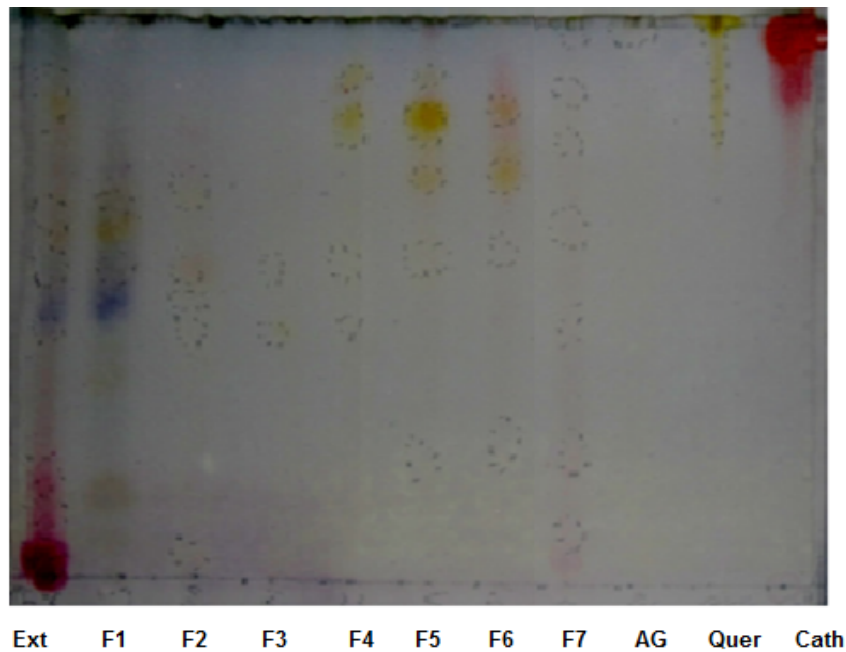


Figure (6) Chromatogramme des fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de PL observé sous une lampe UV à 365 nm. (**F1** : fraction 1, **F2** : fraction 2, **F3** : fraction 3, **F4** : fraction 4, **F5** : fraction 5, **F6** : fraction 6, **F7** : fraction 7, **AG** : Acide gallique, **Quer** : Quercétine, **Cath** : Cathéchine).

### II.3.2. Révélation par la vanilline sulfurique

La révélation par la vanilline sulfurique permet de mettre en évidence d'autres tâches qui ne sont pas visible à la lumière du jour.



**Figure (7)** Observation des fractions après révélation par la vanilline sulfurique (**Ext** : extrait, **F** : fraction, **AG** : acide gallique, **Quer** : Quercétine, **Cath** : catéchine.).

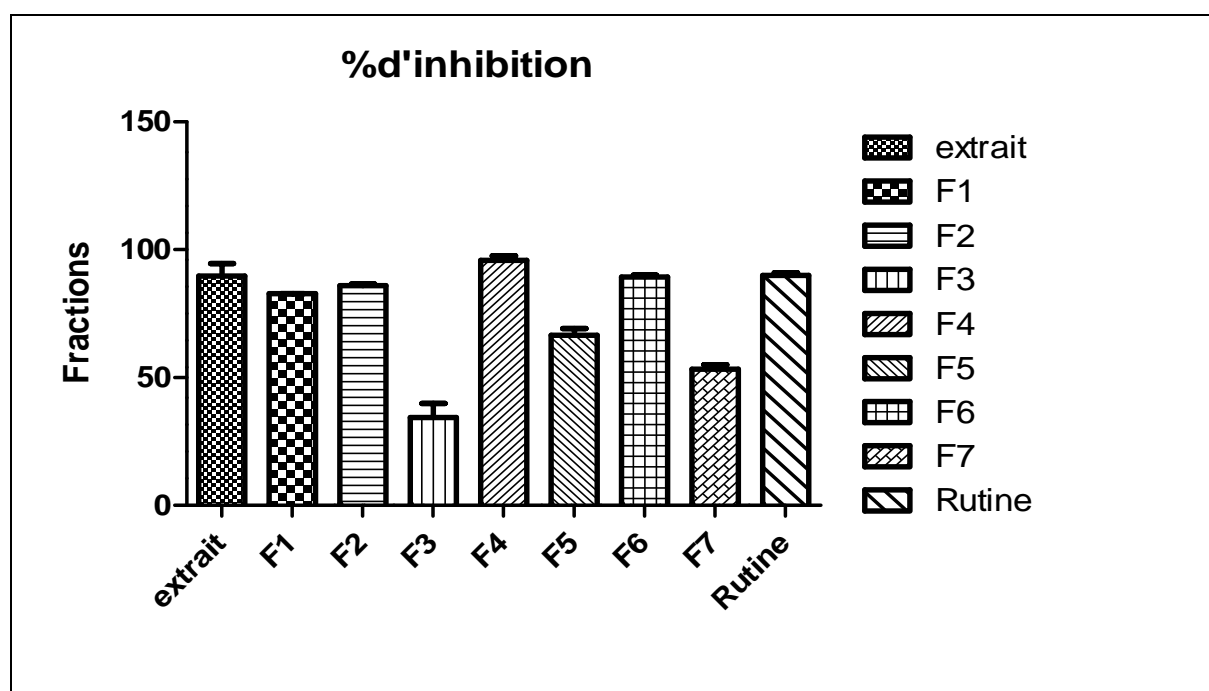
**II.3.3. Caractéristiques et résultats des chromatogrammes**

**Tableau (3)** Résultats des Rf des Fractions de l'extrait éthanolique de feuilles de Pl.

													Taches		
T12	T11	T10	T9	T8	T7	T6	T5	T4	T3	T2	T1	T0	Rf	Fractions	
0,97	0,85	0,81	0,79	0,70	0,65	0,55	0,50	0,44	0,19	0,15	0,12	0,03	Rf	Extrait	
	Jaune		Jaune		Jaune	Bleu	Bleu violacé	Jaune	Rose		Rose foncé Rose		Couleur		
					0,65	0,55	0,50			0,15		0,03	Rf	F1	
						Jaune	Bleu violacé			Jaune		Jaune	Couleur		
							0,55						Rf	F2	
							Jaune						Couleur		
							0,55	0,44					Rf	F3	
							Jaune	Jaune					Couleur		
/	0,85	0,81					0,55	0,44					Rf	F4	
	Jaune	Jaune foncé					Jaune	Jaune					Couleur		
	0,85	0,81		0,70			0,55						Rf	F5	
	Jaune	Jaune foncé		Jaune			Jaune						Couleur		
	0,85	0,81	0,79	0,70									Rf	F6	
	Rose	Jaune	Rose	Jaune									Couleur		
		0,81	0,79			0,55	0,44	0,19		0,12			Rf	F7	
			Rose	Rose		Rose	Rose	Rose	Rose	Rose			Couleur		
0,97													Rf	Quercetine	
Jaune													Couleur		

Les résultats du fractionnement nous ont permis d'obtenir sept fractions dont la fraction F4 qui a montré une forte activité inhibitrice avec  $95,82 \pm 1,74$  qui est supérieur à celle de la rutine. Cependant, les fractions F1, F2, F3, F5 F6 et F7 ont montré des inhibitions avec  $82,76 \pm 0,11$ ,  $85,97 \pm 0,61$ ,  $34,35 \pm 5,48$ ,  $66,59 \pm 2,64$ ,  $89,28 \pm 0,83$  et  $53,27 \pm 1,82$ , respectivement qui sont inférieur à celle exhibé par le standard.

### II.3.4. Évaluation de l'activité anti-NADH oxydase



**Figure (8)** Inhibition de l'activité NADH oxydase par les fractions de l'extrait éthanolique de PI (F1 : fraction 1, F2 : fraction 2, F3 : fraction 3, F4 : fraction 4, F5 : fraction 5, F6 : fraction 6, F7 : fraction 7).

La tache T5 de l'extrait éthanolique et de F1 présentent une coloration bleu violacé qui correspond probablement aux coumarines (Dohou *et al.*, 2007). La T6 de l'extrait et de F1 présentent une couleur bleu, cette dernière révèle des groupements terpéniques (Wichtl et Anton, 2003).

Nous avons observé que T4, T7, T9 et T11 de l'extrait, les taches T0, T2 et T7 de F1, la tache T6 de F2, F3, F5 et la tache T4 de F3 et F4 ; la tache T11 et T10 de F4, F5, F6 et la tache T8 de F5 et F6 présentent une coloration jaune après pulvérisation par la vanilline sulfurique, ceci pourrait supposer que ces taches correspondent à des flavonoïdes (Benhamou *et al.*, 2008).

Ces derniers présentent la même coloration que la quercétine, ceci pourrait supposer que ces taches correspondent à cette dernière.

Par ailleurs les taches T0, T1 et T3 de l'extrait la tache T9 et T11 de la F6 et les taches T1, T3, T4, T6, T9 et T10 de la F7 présentent une coloration rose qui correspond probablement à un anthocyane di-glycosylés (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

D'après les résultats, on remarque que les pouvoirs inhibiteurs les plus élevés ont été observés au niveau des fractions dont la teneur en flavonoïdes est concentrée, suggérant ainsi que l'effet inhibiteur élevé des fractions F4 F6 F2 F1 avec  $95,82 \pm 1,74$   $89,28 \pm 0,83$   $85,97 \pm 0,61$  et  $82,76 \pm 0,11$ , respectivement peut être dû à la présence des flavonoïdes. Le fait que les fractions inhibent l'activité de la xanthine oxydoréductase mieux que les extraits plaide en faveur du fractionnement utilisé.

D'après les résultats on constate que tous les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont exhibés un effet inhibiteur sur l'activité NADH oxydase et après avoir fractionner l'extrait ayant la plus forte activité on a remarqué que toutes les fractions ont présentés une activité inhibitrice de l'enzyme mis à part la F1 qui a montré une activité Pro-oxydant en revanche les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* ont exhibé un effet inhibiteur mis à part l'extrait d'acétate d'éthyle qui a montré un effet Pro-oxydant, tandis que toute les fractions de l'extrait éthanolique ont montré un effet inhibiteur.

---

# **Conclusion & Perspectives**

---

## Conclusion

Plusieurs inhibiteurs synthétiques de la xanthine oxydoréductase ont été mis en évidence afin de traiter les différentes maladies causées par cette dernière, cela dit ces inhibiteurs demeurent des produits chimiques, dont certains sont nocifs pour la santé. Sous cette base, les recherches explorent un maximum de sources naturelles potentiellement dotées de pouvoirs inhibiteurs contre cette enzyme. Dans ce même but nous avons sélectionné deux plantes connues pour leur effet anti-inflammatoire et antirhumatismal: *Pistacia lentiscus* et *Fraxinus angustifolia* en raison de leur utilisation en médecine traditionnelle surtout en Kabylie.

Dans cette étude, nous avons démontré que l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a exhibé la plus forte activité inhibitrice, notamment l'extrait aqueux d'éthyle acétate avec une activité de  $91,65 \pm 0,5\%$ . Le fractionnement de l'extrait aqueux d'éthyle acétate a donné 6 fractions dont la fraction 3 est la plus active avec un taux d'inhibition de 91%. Cette fraction a présenté 7 taches sur la plaque chromatographique, avec une variation de couleurs (violet, rose, jaune) après pulvérisation par la vanilline sulfurique. Ces différentes couleurs peuvent correspondre aux différents composés phénoliques présents dans la fraction.

L'extrait éthanolique de *Pistacia lentiscus* est le plus actif, avec une activité inhibitrice de  $89,65 \pm 3,56\%$ . Le fractionnement de ce dernier nous a permis de récupérer 7 fractions qui ont été soumises à une chromatographie sur couche mince puis à une pulvérisation par la vanilline sulfurique. La fraction 4 a exhibé la plus forte activité inhibitrice de l'enzyme avec  $95,82 \pm 1,74\%$ , avec 4 taches qui ont présenté une couleur jaune qui correspond probablement aux flavonoïdes.

Les résultats obtenus ont confirmé que les extraits des deux plantes constituent une source inestimable en divers composés phénoliques doués d'activité anti-xanthine oxydoréductase, ce qui justifie leur utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement de l'inflammation, la goutte et les maladies liées à l'hyper-uricémie. Cela dit d'autres travaux et techniques (HPLC, RMN) s'imposent afin de confirmer les résultats et d'identifier d'autres composés.



## Références bibliographiques

### *A*

**Abdlwahed A., Bouhel I., Skandrani I., Valent K., Kadri M., Guiraud P., Steiman R., Mariotte A.M., Ghedira K., Laporte F., Dijoux-Franca M.G. et Chekir-Ghedira L. (2006).** Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from pistacia lentiscus confirmation by microarray expression profiling chemico-Biological Interactions, **165** : 1-13.

**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 vasorelaxation in rat thoracic aorta. The Journal of Nutrition.

**ATMANI D., BAGHIANI A., HARISSON R. and BENBOUBETRA M. (2005).** NADH oxidation and superoxide production by caprine milk xanthine oxidoreductase. International Dairy Journal, **15**, 1113-1121.

**Atmani D., Chafer N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., et Atmani D., (2009).** Antioxidant Capacity and Phenol Content of Selected Algerian Medicinal Plants, *J.Elsevier, Food Chemistry 112 / 303–309*.

**Aucomp J; Gospar A; Hara Y; Apostolides, Z. (1997).** Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (*Camellia Sinensis*) Anticancer Research. 17:4381-4386.

### *B*

**Bahorun T. (1997).** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. Food and Agricultural research council, réunit, mauritius.p:83-94.

**Benhamou N., Atik Bekkara F., Panovska T.K. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of *Pistacia Lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African Journal of Pharmacy and Pharmacology **2**. pp.022-028.

**Boloued A. (1998).** Les plantes médicinales d'Algérie. Edition 2.014267. ISBN. 9961.0304.7. P.100.

**Buchanan WB; Gruissem R ; Jones E; Croteau R ;Toni M.,Kutchan N., Lewis G.(2000).** Natural products (Secondary metabolites) Biochemistry and molecular biology of plants, American Society of plant physiologists.

### C

**Chang W., Lee YJ., Lu FJ., Chang HC. (1994).** Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* Vol.14, pp.501-506.

### D

**Della Corte E, Stirpe F. (1972).**The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem J.***126:** 739-745.

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

**Desjardin Y. (2008).** Physiological and ecological functions and biosynthesis of healthpromoting compounds in fruit and vegetables. New York, p: 201-247.

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

**Dohou N., Yamni K., Gmira N., Idrissi H. (2004).** Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique Ibéro Marocaine *Thymelaea lythroides*. *Acta botanica Malacitana*.

### E

**Engerson TD., Mckelvey TG., Rhyne DB., Snyder SJ., Boggie EB., Jones HP. (1987).** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic Rat Tissues. *The Journal of Clinical Investigation.* Vol.79, pp.1564-1570.

**Enroth C., Eger BT., Okamoto K., Nishino T. (2000).** Crystal structure of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**:10723-10728.

**Ellis PJ., Conrads T., Hille R., Kuhn P. (2000).** Crystal structure of the 100 k Da Arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1,64Å and 2,03 Å. *Stanford Synchrotron Radiation Laboratory*, Vol.9, pp. 125-132.

## *F*

**Floss HG. (1997).** Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports* **14**: 433-434.

## *G*

**Garait B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régime alimentaire) ou par voie gazeuse (hypoxie) et effet de la glisodin. Laboratoire Bioénergétique Fondamental et Appliqué. EMI 0221. Vol.192, pp.8-10.

## *H*

**Hopkins WG. (2003).** Molécules et métabolisme : physiologie végétale.

## *I*

**Iwata H., Akamatsu S., Minami N., Yamada M. (1998).** Allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase, improves the development of IVM/ IVF bovine embryos in vitro under certain culture conditions. *Theriogenologie*, Vol. 51, pp.613-622.

## *K*

**Kostova I., Iossifova, T. (2007).** Chemical components of fraxinus species. *Fitoterapia* **78** :85-106.

**Krenitsky TA., Tuttle JV., Cattau EL., Wang P. (1974).** A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthineoxidase and aldehyde oxidase. *Comp.Biochem. Physiol. B.* **49**: 687–703).

## *L*

**Ling L. (2001).** Xanthine oxidase .B180 Medical Laboratories free radical and Radiation Biology Program.

**Maamri S. (2008).** Etude de pistacia atlantica de deux régions de sud algérien: dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire de Magister Université de BOUMERDES. P 10 11 12 35 57.

## *M*

**Mahmoudi y. (1990).** La thérapeutique par les plantes les plus connus en Algérie. Edition palais des livres, Blida.

**Martin S., Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*.

**Meneshian A., Bulkley GB. (2002).** The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirc.***9**: 161–175.

**Messaoudi S. (2005).** Planes médicinales. Edition, Dar Elfikr, Tunis.

**Mouffok. (2011).** Etude des métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* ssp. *Omphalotricha* (Asteraceae) Mémoire de Magister Université de Batna. p 125-134.

## N

**Nishino T., Nakanishi S., Okamoto K., Mizushima J., Hori H., Iwashita T., Ishimori K., Nakazawa H. (1997).** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem. Soc. Trans.***25**:783-786.

## P

**Pacher P., Nivorozhkin A., Szabó C. (2006).** Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev.* **58**: 87-114.

**Parks DA., Granger DN. (1986).** Xanthine oxidase: biochemistry, distribution, and physiology. *Acta. Physiol. Scand.* **548**: 87–99.

**Portes E. (2008).** Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de doctorat Université Bordeaux I. p 44-46.

**Pravo L. (1998).** Polyphenols: Chemistry; dietary sources, metabolism, and nutritional significances. *Nutrition Reviews* **56(11)**: 317-333.

## R

**Radi R., Tan S., Prodanov E., Evan RA., Parks DA. (1992).** Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochemical and Biophysical Acta.* Vol. 1122, pp.178-182.

**Ribereau-Gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod : 5-7 ;12-13 ;58-213.

## S

**Scalbert A. (2004).** Fruits et légumes, polyphénols et santé article rédigé par Augustin Scalbert. Laboratoire des maladies métaboliques et micronutriments, INRA, centre de recherche de Clermont-Ferrand/Theix), relu par Edith Florentin.

**Sheu S; Chiang H. (1997).** Inhibition of xanthine oxidase by hydroxylated anthraquinones and related compounds. *Anticancer Research* **17**:3293-3296.

**Stachle B. (1961).** In Tatum, T.H., Perks, G.L. and Berry, R. E. (1964). Concentrate and foam-mat powders. P 308.

**Subsamanian S., Stacey G., Yu O. (2007).** Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science* **12 (7)**: 282-283.

## T

**Truglio J., Theis K., Leimkuhler S., Rappa R., Rajagopalan KV., Kister, C. (2002).** Crystal structures of the active and alloxanthine-inhibited forms of xanthine dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus*. Department of pharmacological Sciences and biochemistry, New York. Vol. **10**, 115-125.

## W

**Wichtl M., Anton R. (2003).** *Menthae Piperitae folium* in therapeutic plants. Ed Tec et Doc. P: 387-393.

## Z

**Željan M., Darija S., Mirza B. (2013).** Quantitative Determination of Flavonoids and Chlorogenic Acid in the Leaves of *Arbutus unedo* L. Using Thin Layer Chromatography. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Analytical Methods in chemistry*.

## Résumé

*Fraxinus angustifolia* et *Pistacia lentiscus* sont des plantes locales utilisées en médecine traditionnelle afin de traiter certaines maladies telles que la goutte, l'inflammation et les maladies liées à l'hyper-uricémie. Un protocole d'extraction sélectif a été utilisé afin de sélectionner et fractionner différents extraits par des solvants de polarités différentes. Les extraits et leurs fractions respectives ont été testés pour leurs activités anti-NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase (XOR).

L'extrait aqueux d'éthyle acétate de *Fraxinus angustifolia* ainsi que l'extrait éthanolique de *Pistacia lentiscus* ont montré une forte activité anti-NADH oxydase de la XOR avec des pourcentages d'inhibition de  $91.65 \pm 0,56\%$  et  $89,65 \pm 3,56$ , respectivement. L'étude chromatographique sur couche mince des fractions des extraits de *Fraxinus angustifolia* et *Pistacia lentiscus* suivie de la pulvérisation par la vanilline sulfurique a montré des taches de couleurs diverses, indiquant la présence de divers composés phénoliques et suggère leur richesse en flavonoïde et en tannins.

En conclusion, *Pistacia lentiscus* et *Fraxinus angustifolia* constituent une source potentielle de diverses molécules douées d'activités anti-NADH oxydase, ce qui leur confère une place très importante dans la phytothérapie.

**Mots clé :** *Pistacia lentiscus*, *Fraxinus angustifolia*, activité anti-NADH oxydase, extraits, composés phénoliques, Chromatographie sur couche mince, vanilline sulfurique.

## Abstract

*Fraxinus angustifolia* and *Pistacia lentiscus* are local plants used in traditional medicine to treat certain diseases such as gout, inflammation and diseases related to hyperuricemia. A selective extraction protocol was used to select and fractionate extract using solvents of different polarities. The extracts and their fractions were tested for anti-NADH oxidase activity of xanthine oxidoreductase (XOR).

The aqueous extract of ethyl acetate *Fraxinus angustifolia* and the ethanolic extract of *Pistacia lentiscus* showed strong anti-NADH oxidase activity of XOR with percentage inhibition of  $91.65\% \pm 0.56$  and  $89.65 \pm 3.56$ , respectively. Thin layer chromatography study of fractions of *Fraxinus angustifolia* and *Pistacia lentiscus* extracts sprayed by vanillin showed spots of different colors, indicating the presence of various phenolic compounds and suggests their high content in tannins and flavonoids.

In conclusion, *Pistacia lentiscus* and *Fraxinus angustifolia* are a potential source of various anti-NADH oxidase activities, which gives them a very important place in herbal medicine.

**Keywords:** *Pistacia lentiscus*, *Fraxinus angustifolia*, anti-NADH oxidase activity, extracts, phenolic compounds, TLC, vanillin sulfuric.