

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira Bejaia
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire de fin de cycle
en vue d'obtention du diplôme de :
Master en Biochimie Appliquée

Thème

*Activité anti-acide hypochloreux des extraits de
l'écorce de *Fraxinus angustifolia**

Présenté par :

Mr: HAMMOUCHE Bilal

Mr: SAIDANE AISSA

Membre de Jury :

Président: M^{lle} AYOUNI K.

Examinatrice : M^{lle} MOULAOUÏ K.

Promotrice : M^{lle} CHAHER N.

Copromotrice : M^{lle} SEBAÏHI S.

Promotion 2010/2011



Remerciements

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

J'adresse mes plus sincères remerciements à notre promotrice M^{elle} Chaher. N et Co-promotrice M^{elle} Sebaihi. S pour nous avoir guidés durant cette année de pratique, pour leurs conseils, leurs disponibilités et surtout leurs sérieux dans le travail. Qu'elles trouvent ici l'expression de notre reconnaissance.

Nos sincères considérations et remerciements sont également exprimés aux membres du jury: qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de président de jury et qui a accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements sont également exprimés à tous le personnel du laboratoire de génétique.

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

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

CAT : Catalase

Cu: Cuivre

°C : Degré Celsius

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

Eq : Equivalent

e⁻ : Electron

Fe : Fer

FeCl₃ : trichlorure ferrique

Fe⁺² : Ions ferreux

GST : Glutathion S-transférase

GSH: Glutathion réduit

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

LDL: Low density lipoprotein

mg: Milligramme

ml : Millilitre

Mn : Manganèse

Min : Minute

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

Ni : Nickel

NO[•] : l'oxyde nitrique

•OH: Radical hydroxyl

OHCl : Oxydants chlorés

O₂^{•-} : Le radical anion superoxyde

O₂^{-•} : Oxygene singuliet

O₃ : L'ozone

ONOO⁻ : Le peroxyinitrite

P450 : Le cytochrome P450

RC : Radicaux libres à carbone centré

ROOH : Hydroperoxydes

RO : Radicaux libres à oxygène centré

RS : Radicaux libres à soufre centré

SOD : Le superoxyde dismutase

TEA : Triéthanolamine

UV: Ultraviolet

vit. : Vitamine

% : Pourcentage

μ : Micro

Liste des figures

Numéro	Description	page
01	Formation d'un radical libre.	02
02	Voie métabolique de l'oxygène et des ERO (espèces réactives de l'oxygène) .	03
03	Origines et actions des ERO.	04
04	Chimie des espèces activées de l'oxygène et du chlore dans la fente phagocytaire séparant le phagocyte d'une bactérie.	08
05	Les trois types de la SOD.	11
06	Régénération du tocophérol (vit. E) par l'acide ascorbique (vit. C).	14
07	Structure des caroténoïdes.	15
08	Structure des acides hydroxybenzoïques.	18
09	Squelette des acides hydroxycinnamiques « phénylpropanoïdes ».	19
10	Squelette moléculaire de base des Flavonoïdes avec la numérotation classique.	19
11	Structure des chalcones: butéine.	20
12	Squelette des flavonones: naringénine (R=H) Eriodictyol (R=OH).	21
13	Structure des flavones: apigénine (R=H) lutéoline (R=OH).	21
14	Structure des flavonols: kaempférol (R=H) quercétine (R=OH).	22
15	Squelette des isoflavones: génistéine.	22
16	Structure des anthocyanidines: pélagonidine (R=H) cyanidine (R=OH).	23
17	Structure de la catéchine, de l'épicatéchine et d'un tanin condensé (proanthocyanidol).	24
18	Structure de l'acide gallinique, de l'acide hexahydroxydiphénique et d'un tanin gallique.	25

19	Photographie de L'écorce de <i>fraxinus angustifolia</i> .	27
20	Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction	30
21	La teneur en phénols totaux des extraits de l'écorce de <i>fraxinus angustifolia</i> .	36
22	La teneur en flavanoides des extraits de l'écorce de <i>fraxinus angustifolia</i> .	37
23	la teneur en tannin des extrait de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	38
24	Représentation graphique du pourcentage d'inhibition du radical HOCL des différents extraits de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> et un standard à 500µg/ml.	39
25	Pourcentage d'inhibition du radical HOCL en fonction de la concentration	40
26	corrélacion entre l'activité scavenging du HOCL et les phénols totaux des extraits de l'écorce de <i>fraxinus angustifolia</i>	41
27	Corrélation entre l'activité scavenging du HOCL et flavanoides des extraits de l'écorce de <i>fraxinus angustifolia</i>	42
28	Corrélation entre l'activité scavenging du HOCL et les tanins des extraits de l'écorce de <i>fraxinus angustifolia</i> .	43

Liste des tableaux

Numéro	Description	Page
I	Les principales classes de composés phénoliques.	17
II	Quelques caractéristiques de la plante.	27
III	Taux d'extraction de différents extraits de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	34

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Les Radicaux libres

I.1. Radical libre	2
I.1.1.Définition.....	2
I.1.2.Classification des des radicaux libres	2
I.1.3.Origine des especes réactives de l'oxygene.....	3
I.1.4.Les differents radicaux libres oxygénés.....	5
I.2.Le stresse oxydant	9
I.2.1.Conséquences moléculaires du stresse oxydant	9
I.2.3.Pathologie liées au stresse oxydant.....	9

Chapitre II :Les systèmes antioxydant

II. Systèmes de défense antioxydante.....	11
II.1.Les antioxydants enzymatiques.....	11
II.1.1.Superoxyde dismutase.....	11
II.1.2.Catalase.....	12
II.1.3.Glutathionne-S-transférase.....	12
II.2.Les antioxydants non enzymatiques.....	13
II.2.1.Viatamine E.....	13
II.2.2.Viatamine C.....	14
II.2.3.Glutathion.....	14
II.2.4.Oligoéléments	14
II.2.5.Caroténoïdes.....	14
II.2.5.1.Les propriétés biologiques des caroténoïdes.....	15
II.2.6.Composé phénoliques.....	16
II.2.6.1.Les principales classes de composés phénoliques.....	16

II.2.6.2. Les acides phénols.....	17
II.2.6.3. Les flavanoides de structures C6-C3-C6.....	19
II.2.6.3.1. Le concept photochimique des flavonoïdes.....	20
II.2.6.3.2. Les différentes classes de flavanoides.....	20
II.2.6.4. Les tanins	23

Partie Pratique

Chapitre I :Materiels et Méthodes

I.1. Matériels.....	27
I.1.1. Equipements de laboratoire utilisés.....	27
I.1.2. Produits chimiques.....	27
I.1.3. Matériel végétal.....	27
I.2. Méthodes.....	29
I.2.1. Séchage.....	29
I.2.2. Broyage et tamisage.....	29
I.2.3. Extraction des polyphénols.....	29
I.2.4. Les dosages.....	32
I.3. Activité scavenging de l'acide hypochloreux.....	33

Chapitre II :Résultats et Discussions

II.1. Extraction.....	35
II.2. Dosage des composés phénoliques.....	36
II.2.1. Dosage des phénols totaux.....	36
II.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	37
II.2.3. Dosage des tanins.....	39
II.3. Activité inhibitrice de l'HOCL.....	40
II.4. Corrélation.....	41

II.4.1.Corrélation entre les phénols totaux et l'activité anti-HOCL.....	42
II.4.2.Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité anti-HOCL.....	42
II.4.3.Corrélation entre les teneurs en tanins et les activités anti-radicalaires HOCL.....	43
Conclusion et perspectives.....	45
Références bibliographique.....	46
Annex	

Introduction

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

En Algérie, les plantes occupent une place importante dans la médecine traditionnelle, qu'elle même est largement employée pour le traitement de diverses pathologies. Les remèdes utilisant les plantes ont tendance à être plus employés dans les maladies chroniques tels que l'asthme, les rhumatismes, les cancers, le diabète...etc.

Fraxinus angustifolia est un exemple parmi les innombrables plantes utilisées en médecine traditionnelle algérienne. Les extraits de cette plante possèdent des propriétés calmantes dans les cas d'irritations, d'inflammations, et soulagent les rhumatismes...etc. (**Calis et al., 1993 ; Lepoittevin, 2004**).

En effet diverses propriétés biologiques essentiellement antioxydantes ont été attribué a une large gamme de métabolites secondaires de plantes médicinales utilisées traditionnellement, parmi lesquels les composés phénoliques : phénols, flavonoïdes et tanins dont l'intérêt porté est accentué actuellement en raison de leurs implications dans le domaine thérapeutique et pharmaceutique. Ces substances sont issues soit des plantes fraîches ou sèches, soit de la plante entière ou le plus souvent des parties de plante (racine, écorce, feuilles, fleurs et graine) (**Bourgard, 2000**).

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'activité antioxydant. Notamment l'activité scaveinging du radical (HOCl) des extraits de l'écorce d'une plante médicinale *Fraxinus angustifolia* de la famille des Oléacées utilisé localement comme remède contre de nombreuses pathologies.

I.1. Les radicaux libres :

I.1.1. Définition :

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radicalaire (Figure 1). En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

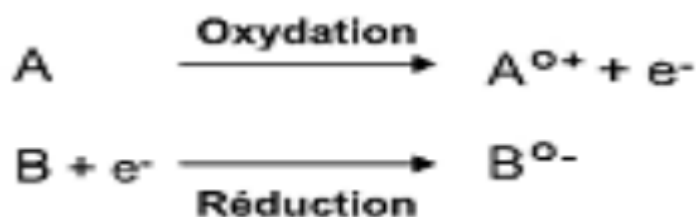


Figure N°1 : Formation d'un radical libre (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I.1.2. Classification des radicaux libres :

Les radicaux libres et leurs dérivés ont été classés suivant l'élément qui porte l'électron célibataire : les radicaux libres à carbone centré (RC), les radicaux libres à soufre centré (RS), les radicaux libres à oxygène centré (RO) appelé communément espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces dernières représentent la plus importante classe d'espèces radicalaire générée dans les organismes vivants (Valko *et al.*, 2007).

Les ERO comprennent non seulement les radicaux libres à oxygènes, mais aussi des espèces non radicalaires dérivant de l'oxygène (le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, le peroxynitrite (ONOO⁻), l'ozone (O₃)...etc.) (Moussard, 2007).

I.1.3. Origine des espèces réactives de l'oxygène :

La molécule de dioxygène est en réalité bi-radicalaire. Elle possède, en effet deux électrons célibataires sur des orbitales différentes. Le dioxygène est susceptible de récupérer quatre électrons. En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzymes (**Figure N°2**), il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde O_2^\bullet . Qui est un radical modérément réactif (**Ji, 1998**).

Ce radical est le substrat d'enzymes essentielles, les superoxydes dismutases (SOD), qui le transforment en eau oxygénée H_2O_2 . L'eau oxygénée peut avoir plusieurs destinées. En présence de métaux, en particulier de fer Fe^{+2} , elle est transformée en radical hydroxyl $\bullet OH$ par la réaction de Fenton. Ce dernier métaux est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres (**Morel et Barouki, 1999 ; Vergely et al., 2003**).

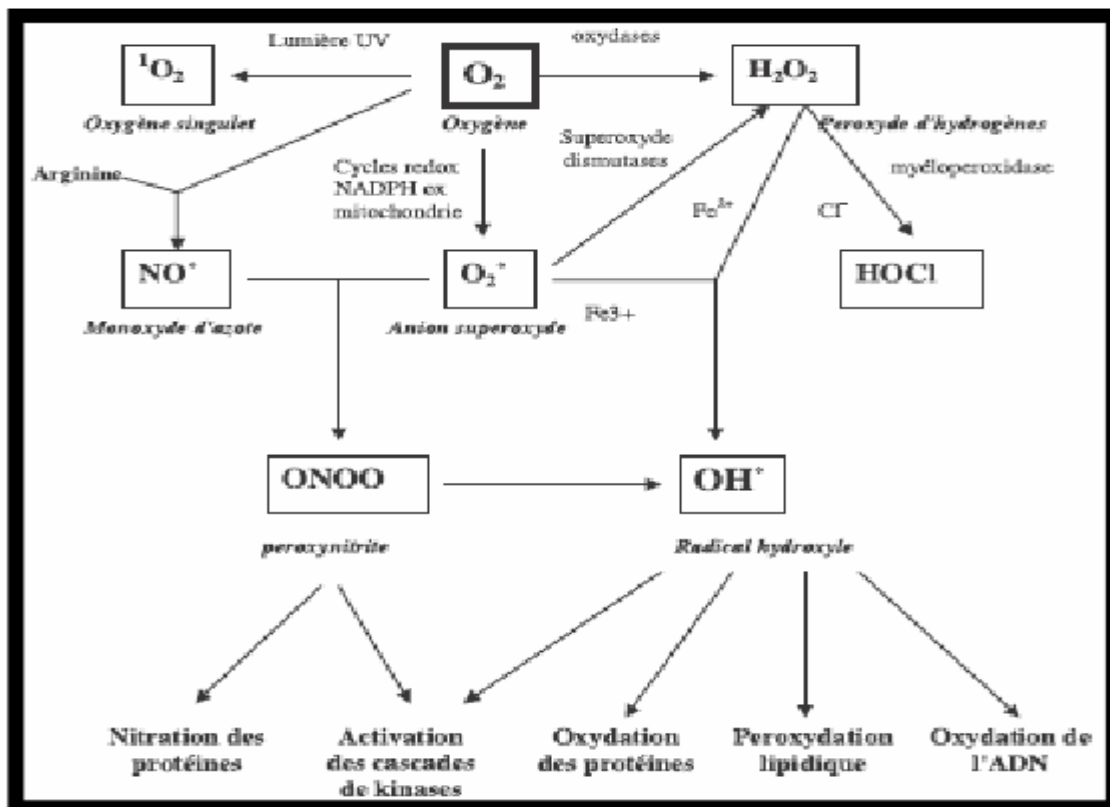


Figure N°2 : Voie métabolique de l'oxygène et des ERO (espèces réactives de l'oxygène)

(Favie, 2003).

Les ERO peuvent être produites par des agents physiques comme les rayonnements, des réactions chimiques et surtout enzymatiques. En effet, toute réaction impliquant l'O₂ est un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ERO. C'est ainsi que la chaîne respiratoire provoque une libération importante d'ERO, mais dont l'intensité demeure controversée (**Favier, 2003**).

D'autres activités enzymatiques fournissent aussi des ERO, notamment les NADPH oxydases au cours de l'inflammation et les cytochromes P450 au cours de la détoxification des xénobiotiques. Ainsi, la mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération d'ERO (**Figure N°3**) (**Barouki et Morel, 2001**).

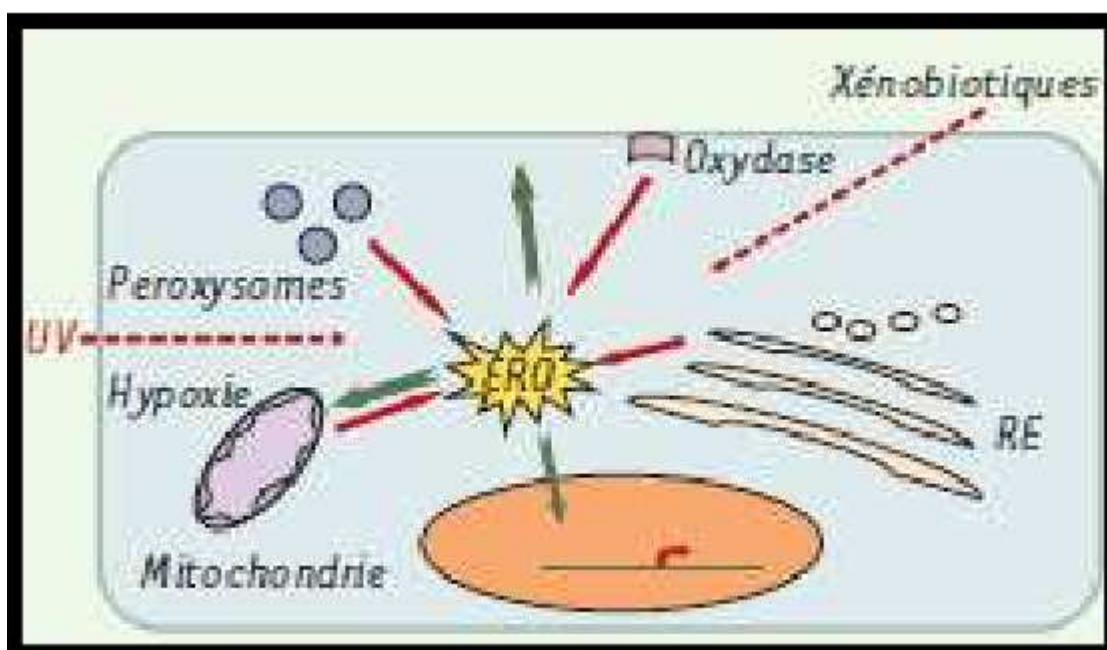


Figure N°3 : Origines et actions des ERO (Barouki, R.2006).

Il existe dans la cellule d'autres oxydants très puissants, qu'ils soient des radicaux libres ou non. Par exemple, des oxydants chlorés (HOCl) sont libérés par les macrophages et ont une activité bactéricide importante. Par ailleurs, le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre qui est surtout connu pour ses propriétés physiologiques (**Beaudeau et Vasson, 2001**).

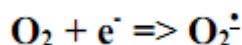
Le monoxyde d'azote et peroxynitrite interagissent avec des protéines et peuvent altérer leurs propriétés.

D'autres molécules comme les hydroquinones se retrouvent sous forme de radicaux libres après leur réaction avec le radical $\bullet\text{OH}$. Elles sont ainsi susceptibles de diffuser dans la cellule et d'oxyder d'autres molécules à distance, propageant ainsi une chaîne de réactions radicalaires (**Beaudeau et Vasson, 2001**).

I.1.4. Les différents radicaux libres oxygénés :

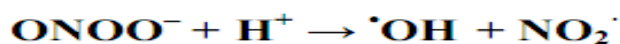
a) Le radical anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet -}$:

C'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire (**Harman, 2000**). La principale source est l'explosion oxydative des cellules phagocytaires entrées en contact avec des antigènes ou des immun-complexes (**Harman, 2000**).



L'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet -}$ joue un rôle très important dans la génération de d'autres radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle $\bullet\text{OH}$, et l'oxygène singulet O_2^{\bullet} (**Stief, 2003**).

L'anion superoxyde capable de réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxynitrite (ONOO^-) qui est capable de donner par la suite des composés très toxiques comme le radical hydroxyl et le dioxyde nitrique (**Halliwell, 1997**).

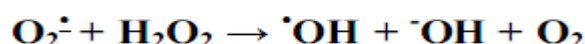


b) Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :

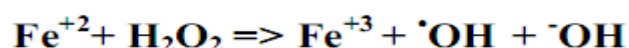
Le peroxyde d'hydrogène est un produit plus stable que les produits qui le génèrent, ainsi sa réactivité est moins importante. La nature non ionique de cette molécule lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires (**Halliwell, 1997**).

c) Le radical hydroxyl $\cdot\text{OH}$:

Le radical hydroxyl est le plus dangereux dans l'organisme, il est formé de la réaction de l'anion superoxyde avec le peroxyde d'hydrogène.



Ainsi la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène donne deux radicaux hydroxyl (**Halliwell et al., 1984**). Cette fission peut être causée par la chaleur ou par des radiations ionisantes. Cependant, une solution de peroxyde d'hydrogène avec des ions ferreux suffit à fournir des radicaux hydroxyl. Cette réaction fut observée pour la première fois par Fenton en 1894 (**Halliwell et al., 1984 ; Vergely et al., 2003**).



Le radical Hydroxyl réagit avec les lipides, polypeptides, protéines, et ADN, spécifiquement la thiamine et la guanosine (**Ashok et Ali, 1999**).

d) Le monoxyde d'azote :

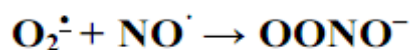
Le monoxyde d'azote possède un électron non apparié, il est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine (**Fang et al., 2002**).

e) Le dioxyde d'azote $\text{NO}_2\cdot$:

Le dioxyde d'azote est formé à partir de la réaction du radical pyroxyl avec $\text{NO}\cdot$. Le dioxyde d'azote est un puissant déclencheur de peroxydation lipidique par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés (**Wiernsperger, 2003**).

f) Peroxynitrite :

La réaction du NO avec l'anion superoxyde donne naissance au peroxynitrite (**Wiernsperger, 2003**).



Le peroxynitrite est un dérivé d'oxygène très toxique provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL. Le Peroxynitrite apparait comme l'espèce la plus toxique pour les tissus au niveau des sites d'inflammation (**Halliwell, 1997**).

Le peroxynitrite (OONO⁻) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité d'oxydation par le radical hydroxyl (**Knight, 1999**).

- **Les espèces réactives du chlore :**

La production d'espèces réactives du chlore entre principalement en ligne de compte avec les cellules contenant la myéloperoxydase, c'est-à-dire celles impliquées dans la phagocytose (monocytes et granulocytes) (**Vamecq et al., 2004**).

Les événements biologiques survenant dans le phagosome sont illustrés dans la figure N°4. La myéloperoxydase sécrétée par le phagocyte est chargée positivement, elle adhère ainsi à la surface de la bactérie phagocytée, laquelle est négativement chargée. La NADPH oxydase du phagocyte forme et relargue une grande quantité d'anions superoxydes dans la fente du phagosome séparant bactérie et phagocyte, qui contient l'ion chlorure à haute concentration (140 mM). Le peroxyde d'hydrogène est formé par dismutation de l'anion superoxyde. (**Vamecq et al., 2004**).

Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé et l'anion chlorure sont utilisés par la myéloperoxydase (attachée ioniquement à la surface de la bactérie) pour former l'hypochlorite (HOCl). Ce dernier peut réagir localement avec l'anion superoxyde pour générer le radical hydroxyl directement en contact avec la bactérie. (Vamecq *et al.*, 2004).

Cette stratégie, qui consiste à produire le radical hydroxyl directement au voisinage immédiat de la bactérie, augmente l'efficacité de l'attaque oxydante initiée par le phagocyte (Vamecq *et al.*, 2004).

En effet, la distance moyenne séparant la bactérie du phagocyte est d'environ 500 nm et la distance que pourrait parcourir le radical hydroxyl dans cette fente séparant phagocyte et bactérie est estimée à 2 nm (Vamecq *et al.*, 2004). Cette courte distance parcourable par le radical hydroxyl est le résultat direct de sa demi-vie très courte (haute réactivité) et de l'abondance de molécules (protéines notamment) dans la fente phagosomique (Vamecq *et al.*, 2004).

À l'inverse, l'anion superoxyde (ayant une durée de vie plus longue) généré par la NADPH oxydase du phagocyte peut traverser une fente de 500 nm séparant la bactérie du phagocyte (Vamecq *et al.*, 2004).

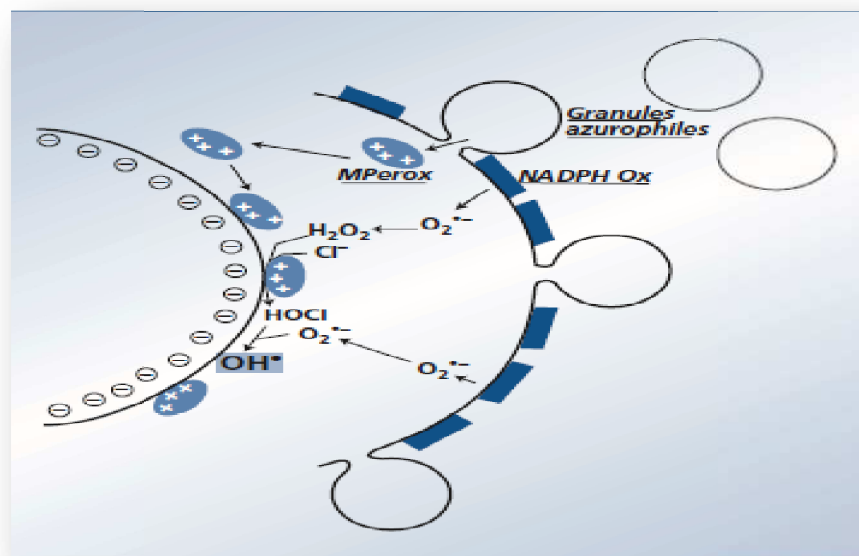


Figure N°4: Chimie des espèces activées de l'oxygène et du chlore dans la fente phagocytaire séparant le phagocyte d'une bactérie.

I-2. Le stress oxydant :

I.2.1. Conséquences moléculaires du stress oxydant :

Le stress oxydatif dû aux radicaux libres entraîne des dégâts tissulaires essentiellement par l'oxydation des protéines de l'ADN ou des lipides (Laight *et al.*, 2000).

➤ Oxydation des protéines:

L'activité des protéines est profondément affectée par n'importe quelle altération de leur structure complexe particulièrement l'oxydation. En général, les protéines oxydées sont inactives et sont rendues particulièrement vulnérables à l'action des protéinases. Dans ces conditions d'augmentation du stress oxydatif, les cellules peuvent être incapables d'éliminer l'accumulation des protéines oxydées par protéolyse, ce qui conduit aux dégâts protéiques observés dans le diabète (Levine , 2002).

➤ Oxydation de l'ADN:

Comme les protéines, l'ADN est vulnérable aux dégâts oxydants, ces derniers peuvent être utilisés comme marqueurs du stress oxydant. Ils peuvent provoquer des cassures de brins, des enchaînements croisés protéines-ADN et des modifications de bases. Chacune de ces réactions est potentiellement mutagène et peut bloquée la réplication de l'ADN (Rehman *et al.*, 1999).

➤ Peroxydation lipidique :

L'oxydation des lipoprotéines est probablement l'un des nombreux indices de stress oxydant. Les LDL oxydées ne sont pas reconnues par le LDL récepteur, ils sont éliminés par les monocytes et le cholestérol. Finalement, ils sont déposés dans la paroi artérielle (Favier, 2003).

I.2.2. Pathologie liées au stress oxydant :

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuse pathologie comme facteur déclenchant ou associé à leurs développements. L'abondance des conséquences médicales de ce stress est due à la différence des espèces radicalaires mises en jeu.

Ce stress sera associé à d'autres facteurs variables qui sont, soit d'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments ou inversement de surcharges en facteurs prooxydants (fer, acides gras), ou bien d'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques prooxydants...etc.), soit d'origine génétique.

Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira aux mécanismes pathogènes (**favier, 2003**).

➤ **L'athérosclérose**

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

➤ **La polyarthrite rhumatoïde**

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique qui touche les tissus cartilagineux de certaines articulations (**Borg et Reber, 2004**). Une grande partie de la connaissance sur le rôle de l' $O_2^{\cdot -}$ en pathologie articulaire a été acquise indirectement par la présence de résidus nitrotyrosine dans le cartilage de patients atteints de polyarthrite NO est délétères pour le cartilage (**Afonso, 2007**).

➤ **Le diabète :**

Dans le cas du diabète, le stress oxydant provoqué par les concentrations anormalement élevées du glucose dans l'organisme joue un rôle très important dans la survenue des complications diabétiques, qu'elles soient macro ou micro-vasculaires (**Raccah, 2004**).

II. Systèmes de défense antioxydant :

Les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non enzymatiques qui suffisent à neutraliser le stress oxydant, résultant du métabolisme aérobie, appelé antioxydant (Wassmann *et al.*, 2004).

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable à concentration relativement faible d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Mates, 1999 ; Comhair et Erzurum ; Droge, 2002).

II.1. Antioxydants enzymatiques :

II.1.1. Le superoxyde dismutase :

Le Superoxyde dismutase (Ec 1, 15, 1, 1) est l'enzyme antioxydante la plus importante dans la défense contre le stress oxydant (Anderson *et al.*, 1997). C'est une metalloenzyme qui dismute l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène (Akihiko *et al.*, 1991; Fridovich, 1995; Frank *et al.*, 2004).

Trois espèces d'enzymes ont été distinguées ; la SOD contenant du cuivre et du zinc (Cu, ZnSOD), avec le cuivre comme catalyseur actif, manganèse (MnSOD) (Figure N° 5), SOD contenant de fer (FeSOD). Une nouvelle superoxyde dismutase contenant du nickel, NiSOD, a été purifiée à partir de plusieurs espèces de *Streptomyces* (Schafer et Kardinah, 2003 ; Wuerges *et al.*, 2004). Cu/Zn-SOD sont très répandues dans le cytosol et périplasma des procaryotes (Steinman, 1992).

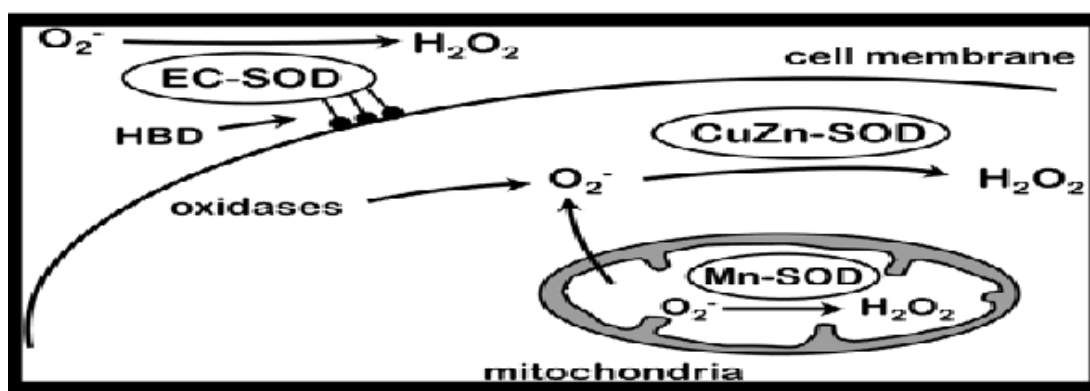
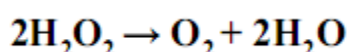


Figure N°5: Les trois types de la SOD (Frank *et al.*, 2004).

II.1.2. La Catalase :

La catalase (Ec 1, 11, 1, 6; H₂O₂ oxydoréductase) est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produite dans des conditions physiologiques (Nancy, 2006 ; Niki *et al.*, 2007).

L'activité catalytique de la catalase est très élevée et estimée comme 200000/sec par site catalyseur-catalase (Ye-Shih *et al.*, 2004) .



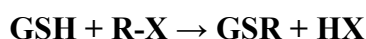
La catalase est omniprésente chez tous les procaryotes et les eucaryotes (Niki *et al.*, 2007). À l'exception des érythrocytes, qui sont des tétramères dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH sur la catalase augmente son efficacité et le protège contre l'inactivation (Kirkman *et al.*, 1999). Elle est principalement située dans les peroxisomes de tous les types cellulaire des mammifères où H₂O₂ est généré par les différentes oxydases (Purdue et Lazarow, 1996).

Toutefois, une certaine quantité de catalase a également été trouvée dans les mitochondries du cœur de rat (Radi *et al.*, 1991). Cette enzyme est présente dans les cellules de tous les organismes vivants (les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux) (Vainshtein *et al.*, 1985).

II.1.3. Le Glutathionne-S-transférase :

Le glutathion S-transférase (GST EC 2.5.1.18) est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (Renuka *et al.*, 2003). Le glutathion-S-transférases (GST) est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Gattás *et al.*, Zhihua *et al.*, 2004).

L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:



II.2. Antioxydants non enzymatiques :

Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Il s'agit des composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme (le glutathion et l'acide ascorbique) ou dans les membranes cellulaires (l' α -tocophérol et les caroténoïdes).

II.2.1. Vitamine E :

Le terme vitamine E est regroupé la famille des tocophérols (α , β , δ , γ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant (**Figure N° 6**). Seuls α et δ tocophérols possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes (**Vertuani *et al.*, 2004**).

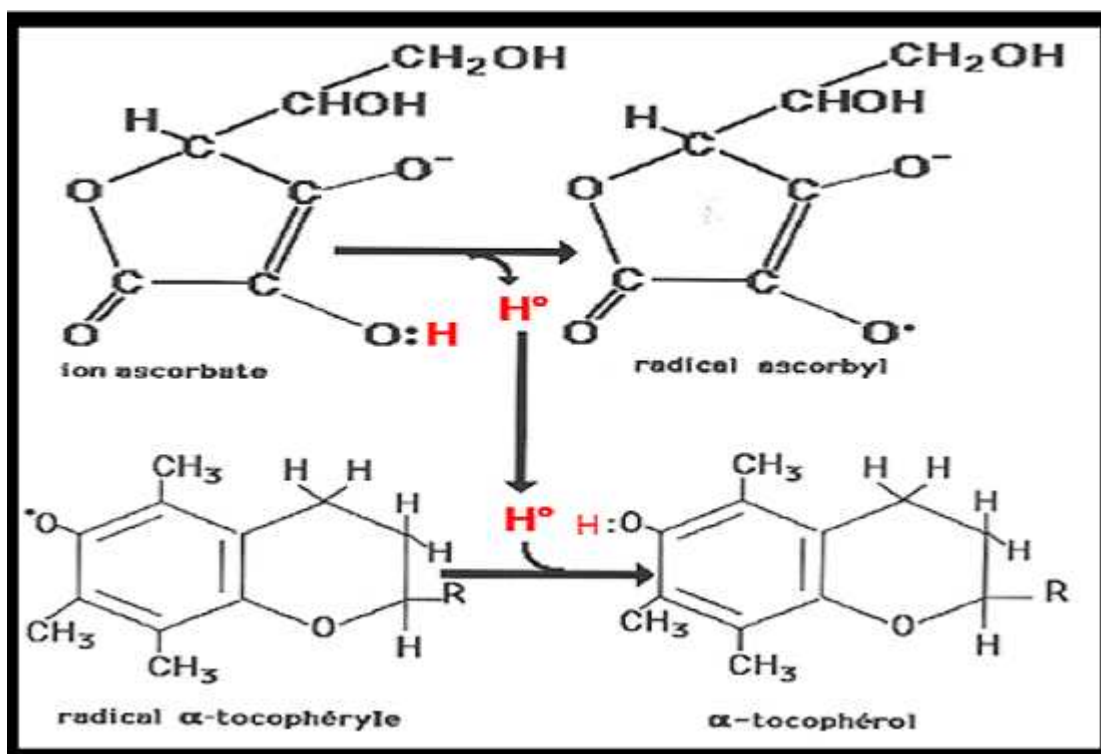


Figure N°6: Régénération du tocophérol (vit. E) par l'acide ascorbique (vit. C) (**May *et al.*, 1997**).

II.2.2. Vitamine C (acide ascorbique) :

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires.

La vitamine C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme HO• ou O₂•. Elle peut recycler l'α-tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides (Vertuani *et al.*, 2004).

II.2.3. Glutathion :

Le glutathion est un tripeptide, dont les propriétés réductrices et nucléophiles qui jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Gerard- Monnier et Chaudiere, 1996).

En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant réside principalement dans sa fonction de co-substrat des glutathion peroxydases. Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vitamine C, la vitamine E et les superoxydes dismutases (Gerard et Chaudiere, 1996).

II.2.4. Les oligoéléments :

Les oligoéléments apportés essentiellement par l'alimentation (le sélénium, le fer, le cuivre, le zinc et le manganèse, ...etc.) participent à la défense antioxydante comme cofacteurs des enzymes antioxydantes (Levesque, 2006).

II.2.5. Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes, dont plus de 500 composés différents ont été identifiés jusqu'à présent, sont de longues molécules à caractère lipophile.

Ces composés naturels possèdent pour la plupart dans leur structure chimique deux cycles aromatiques reliés par une chaîne insaturée possédant de très nombreuses doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de leur activité anti-oxydante (Figure N°6) (Defraigne *et al.*, 2006).

Le groupe des caroténoïdes comprend des molécules tétraterpéniques formées par l'enchaînement de huit unités isopréniques (Drebel *et al.*, 2005).

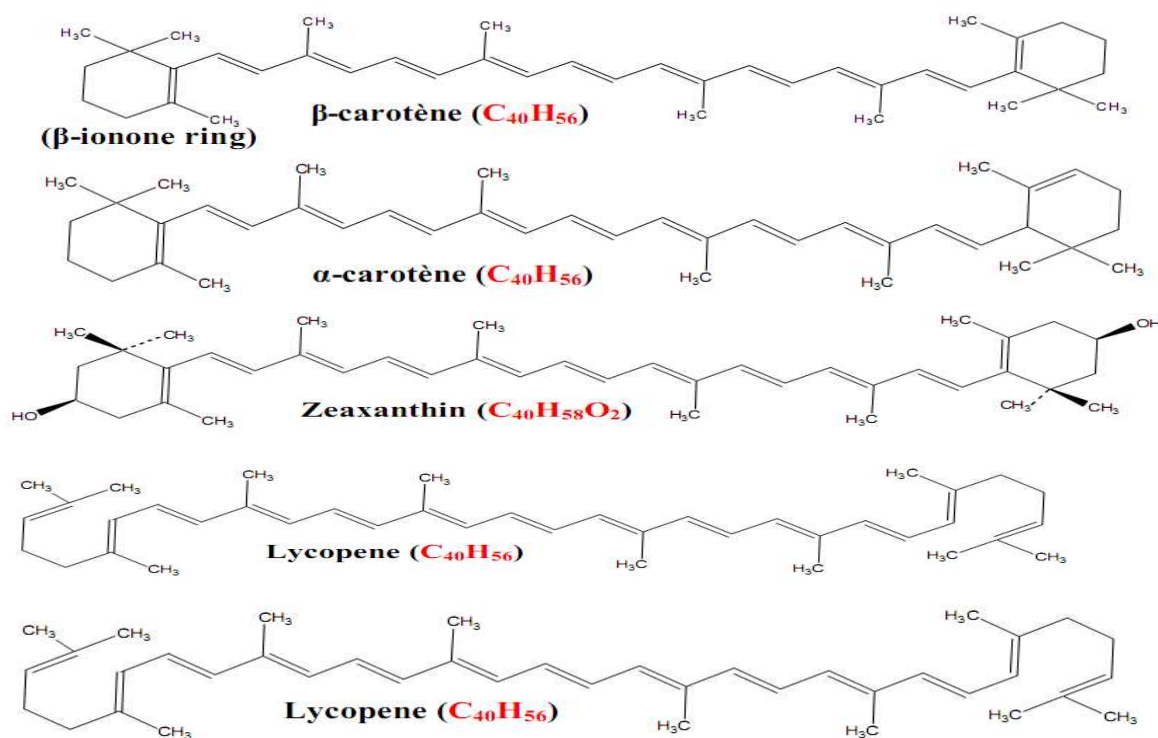


Figure N°7 : Structure des caroténoïdes (Lee *et al.*, 2003).

Tous les caroténoïdes dérivent par cyclisation, déshydrogénation et oxydation de la même molécule (C₄₀H₅₆) : le lycopène (Bruneton, 1999).

II.2.5.1. Propriétés biologiques des caroténoïdes :

Le β-carotène est l'exemple type des caroténoïdes présentant une fonction pro vitaminique. Il subit une conversion enzymatique en vitamine A essentiellement dans l'intestin et le foie (Derbel *et al.*, 2005). Grâce à leur longue chaîne carbonée polyinsaturée, les caroténoïdes présentent une activité anti-radicalaire. Ils sont particulièrement efficaces contre l'oxygène singulet, un état excité de l'oxygène. Cette propriété est démontrée surtout pour le lycopène (Derbel *et al.*, 2005).

Plusieurs fruits et légumes sont riches en caroténoïdes : les carottes, les épinards, les tomates, les navets, les laitues et les brocolis (Derbel *et al.*, 2005).

II.2.6. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques constituent un groupe de substances variées et ubiquistes. En font partie les flavonoïdes, les tanins les stilbènes, les coumarines, les acides hydroxybenzoïques, les xanthones et de nouveaux composés sont identifiés continuellement (Marouf, 2000; Hopkins, 2003; Georgé *et al.*, 2005).

Quoiqu'ils sont très diversifiés, les composés phénoliques ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

Les composés phénoliques sont une classe qui est constituée de 8000 composés. Ils sont divisés en plusieurs catégories:

- les acides phénoliques;
- les flavonoïdes;
- les tanins obtenus par polymérisation des flavonoïdes;
- les lignanes avec les isoflavones.

II.2.6.1. Les principales classes de composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Tableau N°1) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un cycle simple C6 à des formes plus polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) (Herbert, 1989; Beta *et al.*, 2005; Macheix *et al.*, 2005).

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant de simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches.

**Tableau N°1 : Les principales classes de composés phénoliques
(Harborne, 1980; Macheix *et al.*, 1990).**

Squelette carboné	Classe	Exemple	origine
C ₆	Phénols simples	Cathécol	
C ₆ -C ₁	Acides hydrobenzoïques	p- hydrobenzoïque	Epice, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxyciannamiques Coumarines	Acide caféique, férulique Scopolétine, esculétine	Citrus Citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbène	Resvératrol	Vigne
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavanols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavanoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélagonidine Catéchine, épicatechine Naringenine déizéine	Fruit,légume, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C ₁₅) _n			Raisin rouge, Kaki

II.2.6.2. Les acides phénols :

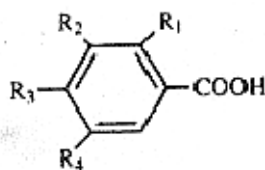
Les acides phénols sont des dérivés de benzoïque et acide cinnamique

❖ Acides hydroxybenzoïques :

Acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et une formule de base de type C₆ - C₁ (**Figure N°8**). Ils sont particulièrement présents chez les gymnospermes et les angiospermes.

Les acides hydroxybenzoïques (p-hydroxybenzoïques, protocatéchine, vanillique, gallique, syringique, salicyclique, gentisique, etc.) (**Guignard, 1974 ; Guignard *et al.*, 1985**).

Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides (**Bruneton, 1993; Macheix *et al.*, 2005**).



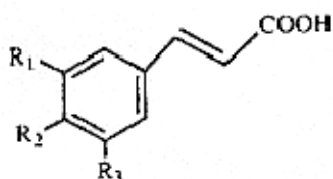
R1=R2=R3=R4=H	acide benzoïque (non phénolique)
R1=R2=R4=H, R3=OH	acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
R1=R4=H, R2=R3=OH	acide protocatéchique
R1=R4=H, R2=OCH ₃ , R3=OH	acide vanillique
R1=H, R2=R3=R4=OH	acide gallique
R1=H, R2=R4=OCH ₃ , R3=OH	acide syringique
R1=OH, R2=R3=R4=H	acide salicylique
R1=R4=OH, R2=R3=H	acide gentisique

Figure N°8 : Structure des acides hydroxybenzoïques.

❖ Acides hydroxycinnamiques :

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆ – C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique grâce à des substitutions au niveau du cycle aromatique (**Figure N° 9**) (**Guignard, 1974; Richeter, 1993 ; Psotova *et al.*, 2003**).

Les molécules de base de la série hydroxycinnamiques sont l'acide *p*-coumarique et ses isomères, l'acide caféique, l'acide férulique et son dérivé 5-hydroxyle et enfin l'acide sinapique (**Macheix *et al.*, 2005**).



R1=R2=R3=H acide cinnamique (non phénolique)

R1=R3=H, R2=OH acide *p*-coumarique

R1=R2=OH, R3=H acide caféique

R1= OCH3, R2=OH, R3=H acide férulique

R1=R3=OCH3, R2=OH acide sinapique

Figure N° 9 : Squelette des acides hydroxycinnamiques « phénylpropanoïdes ».

II.2.6.2. Les flavonoïdes de structure C6 – C3 – C6 :

L'ensemble des flavonoïdes ont une structure générale de C15 (C6-C3-C6) (**Figure N°10**), elle comprend plusieurs molécules regroupées en plus de dix classes (**Harborne, 1980**).

Ces composés existent sous forme d'hétérosides (**Heller *et al.*, 1998**) dont certains ont une très grande importance biologique et technologique: les anthocyanes (pigments rouge ou bleu), les flavones et les flavonols de couleur crème ou jaune clair, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tanins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine (**Medic-saric *et al.*, 2004 ; Macheix *et al.*, 2005**) .

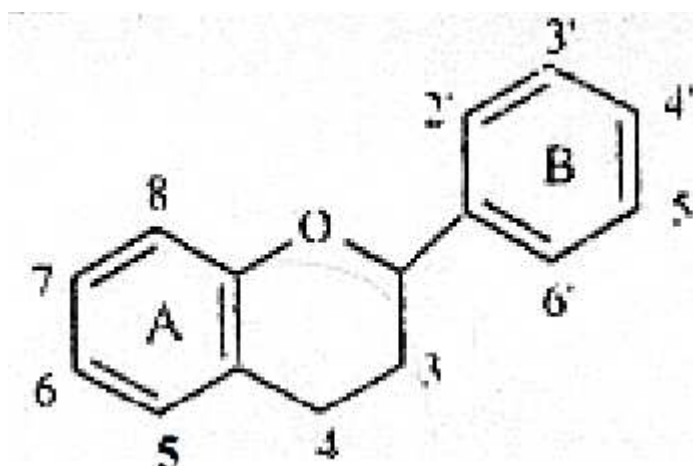


Figure N°10 : Squelette moléculaire de base des Flavonoïdes avec la numérotation classique.

II.2.6.2.1. Le concept photochimique des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des pigments jaunes, généralement polyphénoliques, largement répandus dans le règne végétal avec plus de 4000 composés ayant des propriétés pharmacologiques et la liste s'élargit constamment avec le développement de nouvelles techniques analytiques (Marouf, 2000).

Les flavonoïdes furent leur apparition chez les mousses, chez les fougères et les conifères, leur variété structurale est encore faible, elle est maximale dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, grains, bois. Les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties extrêmes des fruits, fleurs et feuilles (Guignard, 2000).

Les flavonoïdes, en particulier les anthocyanes, sont les seules molécules du règne végétal capable de produire une vaste gamme de couleurs, susceptibles de donner des teintes allant du jaune orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge (Dicko *et al.*, 2006).

Les Chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaune et orangé) (Dicko *et al.*, 2006).

II.2.6.2.2. Les différentes classes de flavonoïdes :

- a) **Les chalcones et aurones:** gardent la structure de la tétra ou trihydroxychalcone, le noyau central de la molécule n'est pas totalement cyclisé ou se présente sous forme d'un cycle qui contient cinq sommets (Heller *et al.*, 1998) (Figure N° 11). Les aurones sont caractérisés par une structure de 2-benzylidène coumarone (Bruneton, 1999; Marfak, 2003).

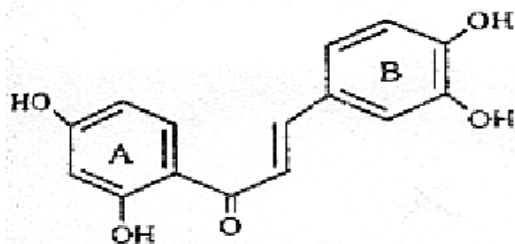


Figure N° 11 : Structure des chalcones: butéine.

- b) **Les flavanones:** dérivent des précédentes par une cyclisation au centre du squelette, d'où un hétérocycle. Ils se caractérisent par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 par la présence des centres d'asymétrie (**Figure N° 12**) (**Bruneton, 1999**).

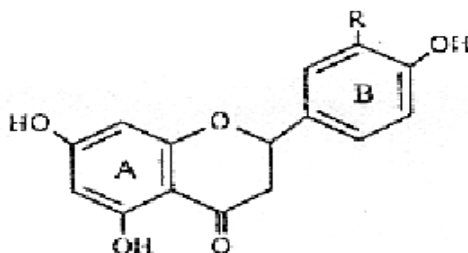


Figure N° 12 : Squelette des flavanones: naringénine (R=H) Eriodictyol (R=OH)

- c) **Les flavones:** dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle (**Figure N°13**) (**Heller et al., 1998**). Dans plus de 90%, le cycle A est substitué par deux hydroxyl phénoliques en C5 et C7 (**Bruneton, 1999**). Par exemple: Glucoside d'apigénine chez le blé (Shahidi et Nacz, 1995) et la tricine chez le blé (**Harborne, 1967; Shahidi et Nacz, 1995; Peterson, 2001**).

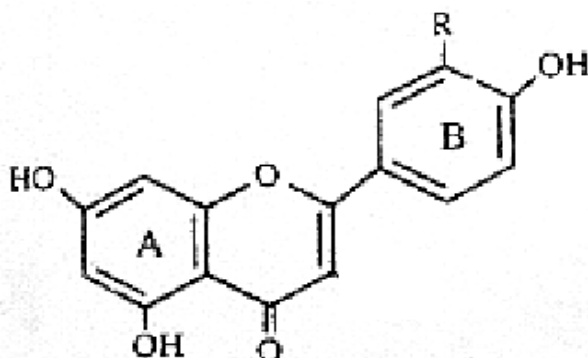


Figure N°13 : Structure des flavones: apigénine (R=H) lutéoline (R=OH)

- d) **Les flavonols:** Se différencient des flavones par la présence d'un OH en C3 (**Figure N°14**) (**Richer, 1993; Heller et al., 1998**). Chez les flavonols la position 3 de l'hétérocycle est toujours glycosylée, fréquemment la position 7 mais jamais la position 5 du cycle A (**Harborne, 1980**). Exemple: chez l'orge Chrysoeriol.

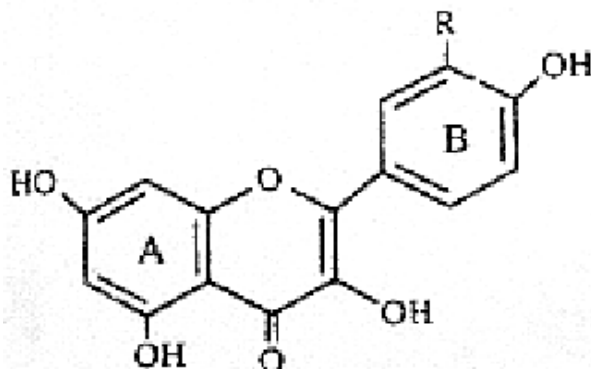


Figure N°14 : Suctutre des Flavonols: kaempférol (R=H) quercétine (R=OH)

- e) **Les isoflavones**: dérivent aussi des flavanones mais outre une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C2 au C4 de l'hétérocycle (Figure N°15) (Heller *et al.*, 1998; Bruneton,1999).

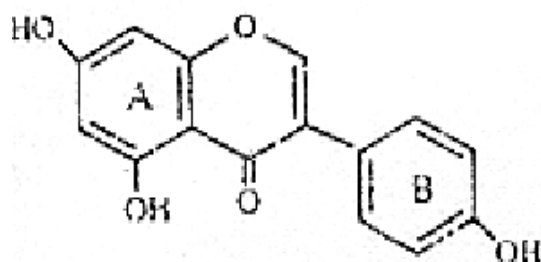


Figure N°15 : structure des isoflavones: génistéine

- f) **Les anthocyanes**: le terme « anthocyanes » a une valeur générale désignant, soit les formes naturelles glycosylées, soit les molécules non glycosylées (Macheix, 2005).

Chez les anthocyanes, en plus de la position 3 qui est toujours glycosylée, il y a aussi préférentiellement la position 5 est glycosylée (Figure N°16).

La partie phénolique est uniquement désignée sous le nom d'anthocyanidine, alors que l'hétéroside (molécule phénolique + sucre associé) est appelée anthocyanine (Bruneton,1999 ; Macheix, 2005).

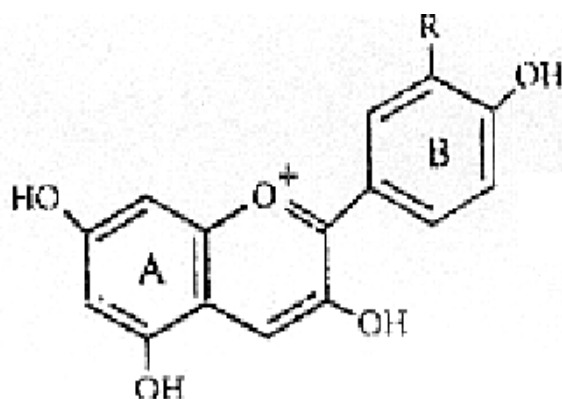


Figure N°16: Squelette anthocyanidines: pélagonidine (R=H)) cyanidine (R=OH)

II.2.6.3. Les tanins :

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins, différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition (**Haslam, 1989**).

- a) **Les tanins hydrolysables:** ce sont des esters de glucose et d'acide gallique (**Guignard, 2000**). Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique (enzymatique). Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide – l'acide éllagique (**figure17**) (**Guignard, 2000**).

- b) **Les tanins condensés:** sont des oligomères ou des polymères de flavane-3 ol dérivés de la (+) catéchine ou de ses nombreux isomères (**Harborne, 1980; Awika et Rooney, 2004**). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (**figure18**) (**Guignard, 2000**).

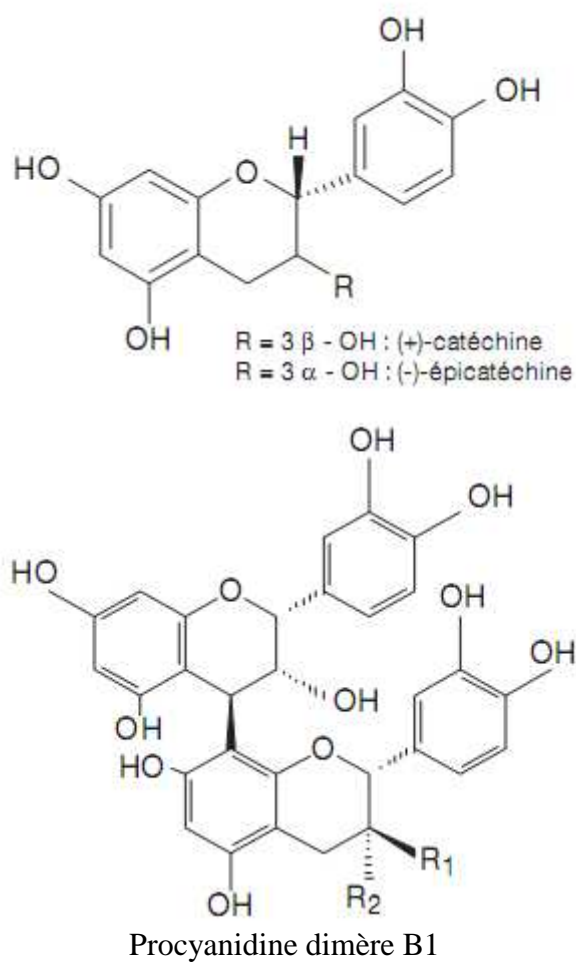


Figure N° 17 : Structure de la catéchine, de l'épicatéchine et d'un tanin condensé (proanthocyanidol) (Derbel *et al.*, 2005).

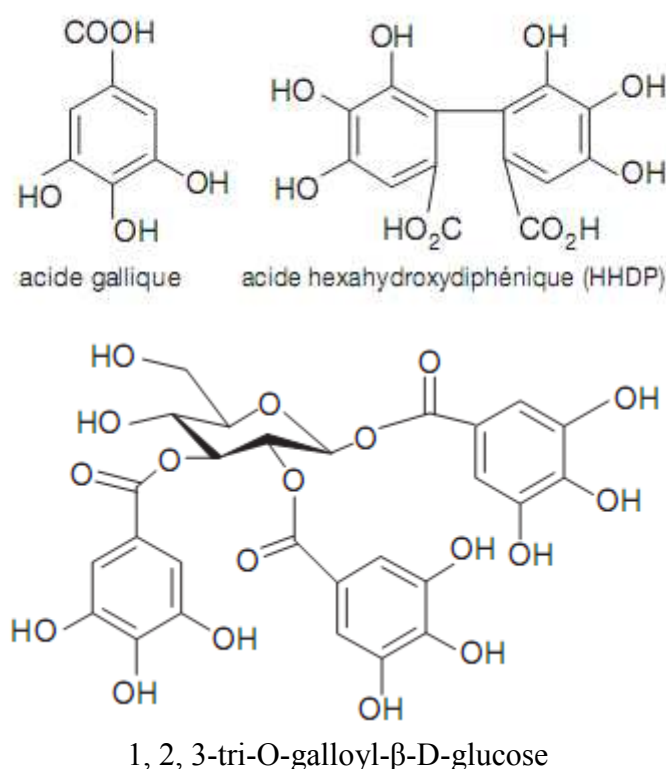


Figure N°18 : Structure de l'acide gallinique, de l'acide hexahydroxydiphénique et d'un tannin gallique (Derbel *et al.*, 2005).

Parmi les antioxydants naturels, les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant. Ce sont des composés naturels, qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation qui favorisent le vieillissement cellulaire en interrompant le passage du stress oxydatif et interceptant le « message » de l'apoptose (mort cellulaire programmé) (Macheix *et al.*, 2005). D'un point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur : il va donc pouvoir réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux libres dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé. Cependant, ce n'est qu'avec l'identification des vitamines A, C et E qu'est apparue l'importance des antioxydants dans la biochimie des organismes vivants.

L'oxydation constitue probablement l'un des paramètres majeurs à l'origine de l'altération des produits alimentaires et cosmétiques.

Les dégradations oxydatives qui en résultent affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des produits et peuvent avoir des répercussions sur la santé humaine. Dans ce contexte, différents moyens de prévention sont disponibles pour limiter ces phénomènes. Parmi eux, la valorisation d'antioxydants d'origine végétale à des fins alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques représente un enjeu majeur pour la recherche et l'industrie.

L'Homme n'est pas capable d'assurer la biosynthèse de la plus part des antioxydants, en particulier ceux de nature phénolique. Il doit les trouver dans la ration journalière est alors un facteur nutritionnel considéré comme positif par les nutritionnistes et bénéfique à notre santé (**Bravo, 1998**).

Les différents constituants végétaux de notre ration alimentaire quotidienne sont généralement riches en polyphénols à forte activité antioxydante et selon les habitudes alimentaires, nous pouvons en ingérer 100 mg par jour. Cela est particulièrement vrai dans les régimes dits « méditerranéens » ou la consommation de fruits, de légumes, céréales et d'huile d'olive est importante (**Besançon, 2000**).

I. Matériels :

I.1. Equipements de laboratoire utilisés :

- Spectrophotomètre automatisé (**SPECORD 50, analytik Jéna**).
- Broyeur électrique (**KIKA Laboratechic M20**).
- Balance de précision (**Sartorius**).
- Agitateur électromagnétique (**Phywe**).
- pH mètre (**phywe**).
- Tamiseur de laboratoire de granulométrie inférieur à 63µm.
- Centrifugeuse (**Sigma**).
- Vortex (**VELP**).
- Micropipettes, éprouvettes, cristallisoirs, tubes à essais, erlenmayer, spatules, pipettes, poires, béchers, flacons, cuves, boites de pétri, ...etc.

I.2. Produits chimiques :

TNB : 5-thio-2-nitrobenzoïque acide hypochloreux (**HOCl**), dithionitrobenzoic (**DTNB**), chlorure de sodium (**NaOCl**), acide sulfurique (**H₂SO₄**), (**NaBH₄**), (tetramethyl murexide (**EDTA**), catéchine (**sigma**), rutine (**sigma**), triethanolamine, solvants de marque PROLABO (Méthanol, Ethanol, chloroforme, Ethyle acétate, et l'eau distillé).

I.3. Matériel végétal :

▪ Description :

Cette étude est réalisée sur l'écorce d'une plante largement utilisée en médecine traditionnelle locale *Fraxinus angustifolia*.

Fraxinus angustifolia est un arbre de grande de taille qui peut atteindre 20 mètres de hauteur, à écorce d'un beau gris cendré (**Baba-Aissa, 1999 ; Emrah, 2010**) et à feuilles étroites. Il est d'une valeur importante en raison de sa capacité de croissance rapide et de bois précieux (**Emrah, 2010**).

Tablau N° 2 : Quelques caractéristiques de la plante (Baba-Aissa, 1999)

Nom scientifique	Nom vernaculaire berbère	Nom vernaculaire arabe	Localisation
<i>Fraxinus angustifolia</i> (Oleaceae)	Aslène	Dardar	Espèce euro-méridionale commune dans les régions humides de l'Algérie



Figure N°19 : Photographie de L'écorce de *fraxinus angustifolia*.

Classification :

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Oleaceae

Genre : Fraxinus

Especies : *Fraxinus angustifolia*

- **Principes actifs de la plante :**

Ce sont essentiellement les tannins, les résines, les glucosides, les coumarines, les flavonoides et la vitamine C.

Les études phytochimiques ont montré que l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est pauvre en flavonoides mais modérément riche en tannins (**Baba-Aissa, 2000 ; Atmani et al., 2009**).

II. Méthodes :

II.1.Séchage :

Après la récolte, le matériel végétal a été débarrassé des débris, lavé à l'eau et séché à l'étuve à 40°C pendant une semaine. Il est, ensuite, conservé dans des flacons à l'abri de la lumière. Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toutes activités enzymatiques responsables de leur dénaturation.

II.2.Broyage et tamisage :

L'écorce séchée a été broyée à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les poudres obtenues ont été tamisées à travers un tamis de 125µm puis de 63µm afin de récupérer une poudre de granulométrie inférieure à 63µm.

II.3.Extraction des polyphénols :

Le protocole d'extraction adopté dans cette étude est celui décrit par **Chiang, (1994)** avec quelques modifications (**figure N°20**).

➤ **Procédure**

La poudre d'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été macéré dans de l'éthanol pure avec un rapport de (1g / 4ml) sous agitation et à l'ombre dans des ballons scellés convenablement pendant 24 heures. Le mélange est ensuite transféré dans des éprouvettes à décantation pendant 24 heures.

Le surnageant a été récupéré, centrifugé à 1500g durant 10min puis séché sous la hôte et à température ambiante jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Une partie de l'extrait éthanolique sec a été reprise dans un mélange d'éthyle acétate et d'eau avec un rapport de 3/1 et laissée macérer pendant 24 heures.

Les deux phases organique et aqueuse ont été séparées puis séchées. Le résidu sec d'éthyle acétate a été pesé puis deux parties égales de cet extrait ont été soumises à une troisième extraction, un mélange chloroforme/eau (3/1). Après une macération de 24 heures, les deux phases organique et aqueuse ont été récupérées séparément, séchées puis pesées.

Le taux d'extraction de chaque étape est calculé comme suit :

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

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

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

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

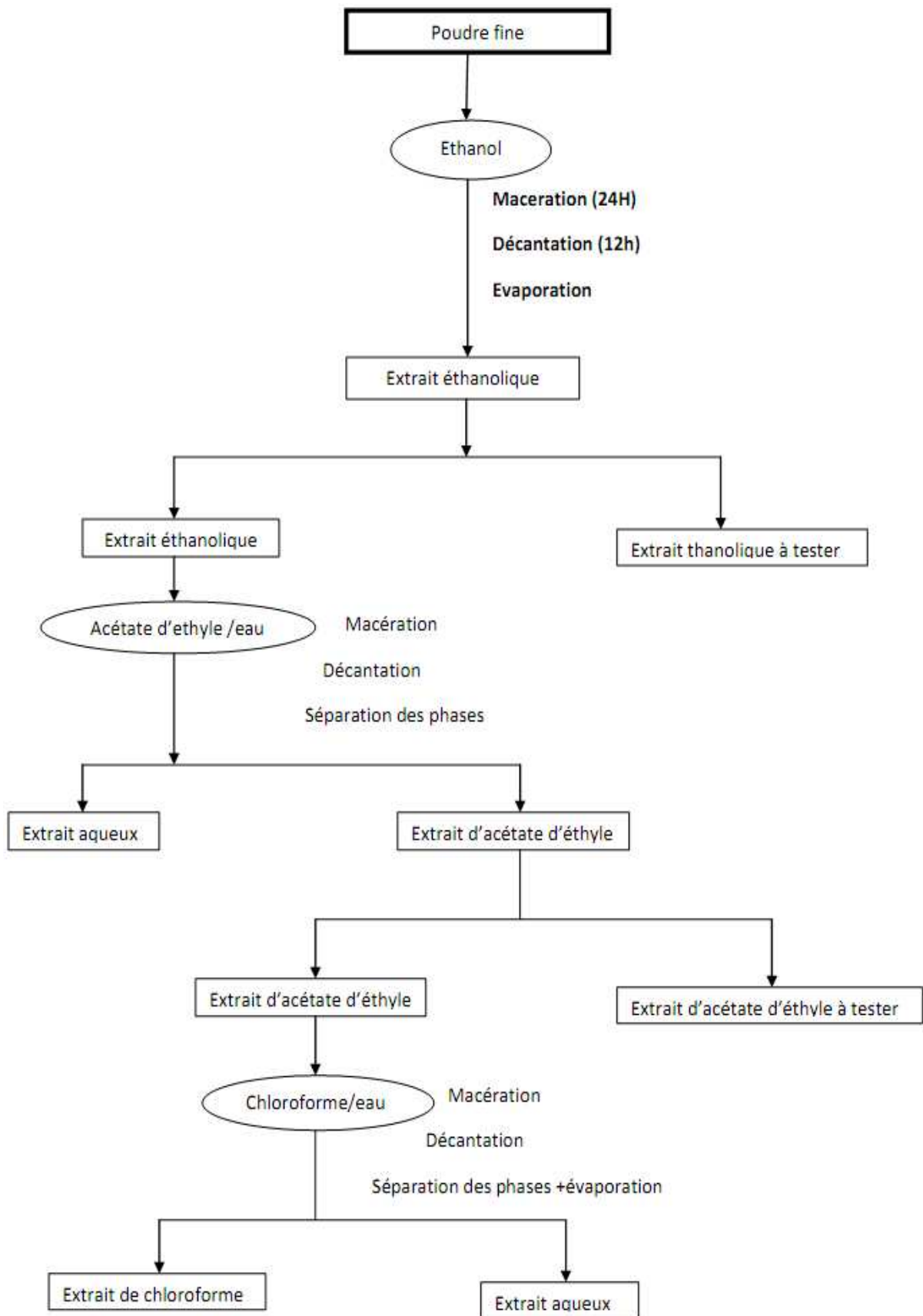


Figure 20 : Schéma récapitulatif des étapes de la procédure d'extraction (Chiang *et al.*, 1994).

II.4. Les dosages :

- **Dosage des phénols totaux :**

La quantité des phénols totaux dans les extraits d'écorces de *Fraxinus angustifolia* a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu proposée par (Singleton et Rossi, 1965) et modifiée par (Kahkonen *et al.*, 1999).

C'est une méthode colorimétrique simple, rapide et présentant l'intérêt de ne pas nécessiter un chauffage. Cette méthode colorimétrique est basée sur la formation d'un complexe de coloration bleu entre les polyphénols et l'acide phosphomolybdène-phosphotungstène du réactif de Folin-Ciocalteu. Le complexe coloré formé possède un maximum d'absorption à 765 nm.

- **Procédure :**

Un volume de la solution d'extrait est ajouté au réactif de Folin-Ciocalteu, le tout a été introduit dans un tube de centrifugation et additionné de 0,8 ml de carbonate de sodium (7,5%). Le mélange a été vortexé puis incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 30min. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 765 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait.

En se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec la catéchine (annexe A), les concentrations en phénols totaux ont été calculées et exprimées en milligrammes d'équivalent catéchine par gramme d'extrait sec.

- **Dosage des flavonoïdes :**

L'analyse quantitative des flavonoïdes a été réalisée selon le protocole de Mimica-Dukić, 1992 ;Maksimović *et al.*, 2004 avec quelques modifications. La méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à chélater des métaux (chlorure d'aluminium) et de former un complexe de coloration jaunâtre.

- **Procédure :**

Un volume de la solution d'extrait a été additionné au réactif de chlorure d'aluminium et mélangé afin de bien homogénéiser. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 430 nm, contre un blanc contenant uniquement de l'extrait et de l'eau distillée.

Les concentrations en flavonoïdes ont été exprimées en milligrammes d'équivalent de quercétine (annexe A) par gramme d'extrait sec.

- **Dosage des tannins :**

Les tannins contenus dans les extraits ont été estimés en procédant par la méthode de (**Hagerman et Butler, 1978**), qui est basée sur la précipitation du complexe BSA tannin formé. Les tannins précipités sont dosés par mesure de l'absorbance à 510 nm après formation du complexe ion ferrique -tannin de coloration violette.

- **Procédure :**

Un volume d'une solution de BSA et de solution d'extrait ont été mélangés et incubés pendant 24 heures à 4°C. Le mélange a été ensuite centrifugé à 3000g pendant 15 min et le culot a été récupéré et dissout dans 4ml de la solution de SDS et de triethanolamine (TEA). Afin de révéler la présence des tanins, 1ml du réactif FeCl₃ a été ajouté et le mélange est porté au vortex. Après 15 min d'incubation l'absorbance a été mesuré à 510 nm contre un blanc contenant du réactif FeCl₃ et de la solution de SDS/TEA. La teneur en tannins des extraits a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide tannique.

III. Activité Scavenging de l'acide hypochloreux :

- **Synthèse de l'acide hypochloreux :**

75mM HOCl ont été préparée immédiatement avant utilisation en ajustant une solution de NaOCl à pH 6,2 avec de l'acide sulfurique dilué. La concentration de HOCl a encore été déterminée par spectrophotométrie à 235 nm en utilisant le coefficient d'absorption molaire de 100 M⁻¹ cm⁻¹.

- **Synthèse du 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB) :**

Une solution 1 mM de DTNB dans un tampon phosphate de potassium 50 mM (pH 6,6) contenant 5 mm d'EDTA, du borohydrure de sodium 20 mM a été ajouté.

La solution a été incubée à 37 °C pendant 30 min. La concentration de la TNB a été déterminée en mesurant l'absorbance à 412 nm et utilisant le coefficient d'absorption molaire de 13600 M⁻¹ CM⁻¹.

- **Détermination de l'activité Scavenging de l'acide hypochloreux :**

L'essai a été effectué à la température ambiante dans une cuvette contenant 40 μ m de solution TNB .

L'absorbance à 412 nm a été mesurée avant et 5 min après l'addition de l'acide hypochloreux (40 Mm). Un contrôle positif a été réalisé avec l'acide lipoïque, qui inhibe l'oxydation du TNB de façon dépendante de la concentration.

- **Mode opératoire de l'activité scavenging de HOCL**

Le mélange réactionnel est le volume final de 1, »ml ;il contient 130 μ l de chaque solution d'extrait (500 μ l/ml) ;880 μ l de TNB ;100 μ l de tampon et 180 μ l de méthanol.

La mesure de l'absorbance à 412nm a été réalisé avant et 5mn après addition de 30 μ l de HOCL. Le blanc a été préparé de la même manière sans extrait.

II .RESULTATS ET DISCUSSION :

II.1.Extraction :

Les taux d'extractions des composés phénoliques est influencé par le type du solvant, le rapport solide-liquide, la granulométrie de la poudre végétale, le nombre d'extraction, la température et le pH du milieu etc.(Narzck et Shahidi,2006 ; Falleh *et al.*,2008).

Cependant, pour extraire le maximum de composé, nous avons utilisé une poudre très fine d'un diamètre inférieure ou égale 63 μ m et cela pour augmenter la surface d'échange entre le solvant et la poudre (Jayakumar *et al.*, 2009)

Les taux d'extractions de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été calculés par rapport à la poudre initiale pour l'extrait éthanolique, et la suite des taux d'extraction a été calculée par rapport au poids de l'extrait issu de l'étape précédente à chaque fois. Le but est d'optimiser l'extraction des composé susceptibles d'avoir une action antioxydant dans les plus importants sont des polyphénols. L'éthanol qui à été utilisé dans la première étape d'extraction est connu comme un excellent solvant d'extraction de métabolite secondaires tel que les polyphénols avec une faible toxicité (Contini *et al.*, 2008) . Pour les autres étapes, des solvants de polarité décroissant ont été utilisés comme suite : eau, acétate d'éthyle et le chloroforme. Les taux d'extractions des différents extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont donnés par le tableau.

Tableau N°3 : Taux d'extraction de différents extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Solvant	Taux d'extraction de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>
Ethanol	5,6
Acétate d'éthyle	23,5
Aqueux acétate d'éthyle	49,18
Chloroforme	61

Dans la première étape, un taux d'extraction faible a été obtenu par rapport à la poudre initiale pour l'extrait éthanolique avec 5,6%. Dans la deuxième étape d'extraction, un taux plus élevé est obtenu par rapport à l'extrait éthanolique en

utilisant l'acétate d'éthyle/eau comme solvant. Dans cette étape, la phase aqueuse présente un taux d'extraction plus élevé (49,18) que celui obtenu dans la phase organique (23,5%).

Dans la dernière étape, en utilisant le chloroforme/eau comme solvant, un taux d'extraction meilleur est obtenu dans la phase organique avec 61%. Ceci pourrait être expliqué par la nature du solvant utilisé dans l'extraction et la structure chimique du composé extrait tel que le degré de polymérisation et par la richesse de la plante en composés apolaires ou peu polaires (**Naczk et Shahidi, 2004**).

Ce type d'extraction nous a permis de fractionner et de sélectionner les composés phénoliques du matériel végétale étudié, en fonction de leur degré de polarité, d'une manière que les plus polaires sont concentrés dans les phases aqueuses, tandis que les composés apolaires sont concentrés au niveau des phases organiques.

II.2.Dosage des composés phénoliques

II.2.1.Dosage des phénols totaux

La méthode de Folin-Ciocalteu est très sensible mais malheureusement peu spécifique car beaucoup d'autre composés réducteurs non phénoliques peuvent interférer. Cependant elle reste la méthode la plus employée (**Kahkonen et al., 1999**).

Les composés phénoliques sont généralement soluble dans les solvants organiques polaires et les solution aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires (**Bruneton, 1999 ; Makris et al., 2005**).

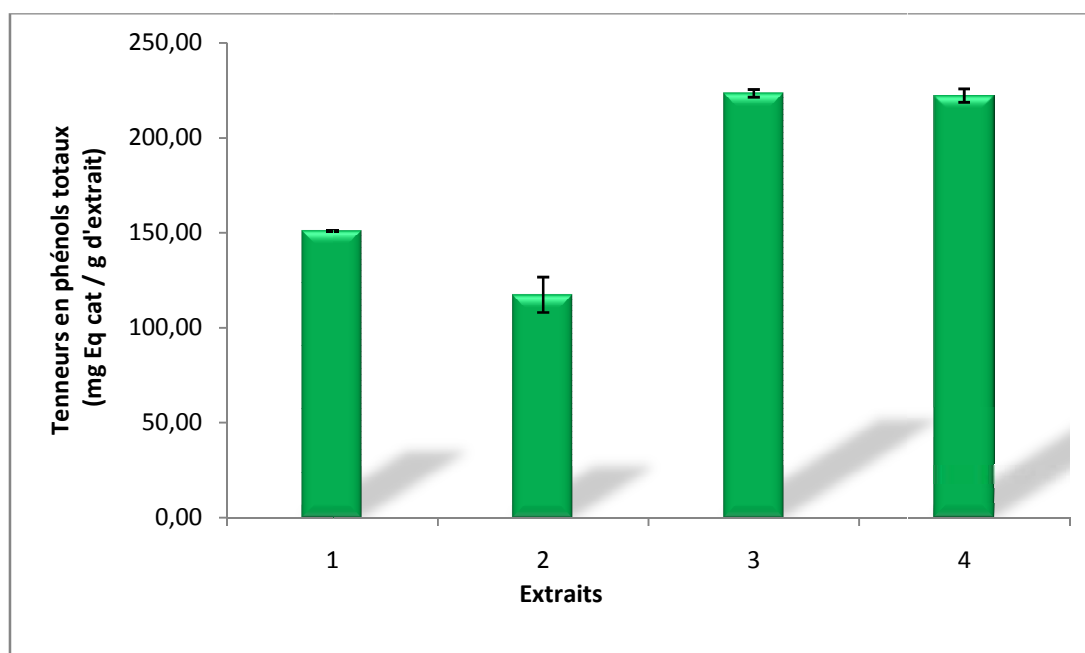


Figure N°21: La teneur en phénols totaux des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* **Eth.** : éthanolique, **E.A** : éthyle acétate, **Aq.E.A.** : Aqueux d'éthyle acétate, **Chl** : Chloroforme.

Nous constatons que le taux le plus élevé en phénols totaux de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est celui de l'aqueux acétate d'éthyle et du chloroforme organique par rapport aux autres extraits avec des teneurs de 223,43 et 222,25 mg Eq cat/g d'extrait respectivement. Alors que le taux le plus faible est celui d'acétate d'éthyle organique

Ceci peut être expliqué par le fait que l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est plus riche en composés phénoliques glycosylés (polaires) qu'en composés phénoliques non glycosylés (apolaires), ce qui augmente leur solubilité dans les phases aqueuses des extraits.

II.2.2. Dosage des flavonoïdes :

Les flavonoïdes constitue le groupe le plus hétérogène des composés phénoliques, dont certaines classes sont soluble dans des solvant polaire tandis que d'autres sont solubles dans les solvant apolaire (**Makris et al., 2005**).

Les résultats du dosage des flavanoides dans les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont représentés dans la **figure N°22**

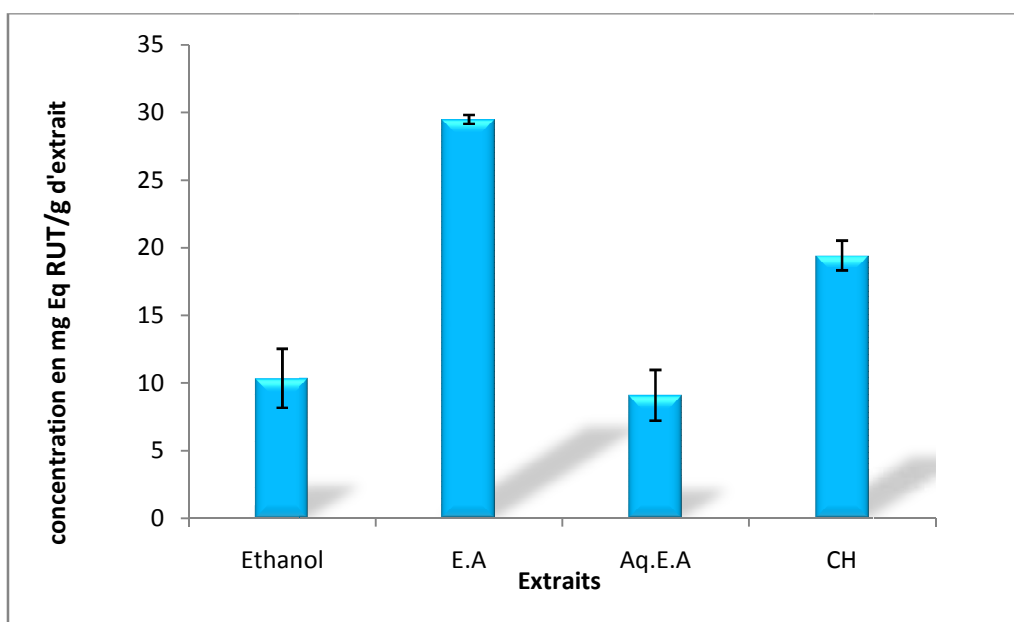


Figure N°22 : la teneur en flavanoides des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*
Eth. : éthanolique **E. A.** : acétate d'éthyle, **Aq.E.A.** : Aqueux acétate d'éthyle, **Chl.** : Chloroforme

Les résultats par la figure ci-dessus, indiquent que les différents solvants utilisés montrent une différence dans leur capacité à extraire les substances phénoliques de *Fraxinus angustifolia*.

Par ailleurs, l'extrait d'éthyle acétate est le plus riche en flavanoides avec une teneur de 29,49mg Eq rutine/mg d'extrait, suivie par l'extrait chloroformique 19,4 mg Eq rutine/mg d'extrait. L'extrait éthanolique et la phase aqueuse d'acétate d'éthyle exhibe des taux faibles qui sont trois fois moins que celui de l'extrait éthyle acétate et deux fois moins que celui de l'extrait chloroforme.

D'après ces résultats, on constate que la plupart des flavonoïdes présents dans l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont apolaire, vu qu'ils sont soluble dans la phase organique et peu soluble dans la phase aqueuse.

II.2.3. Dosage des tanins :

Les résultats du dosage des tanins dans les extraits d'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont représentés dans la **figure N°23**

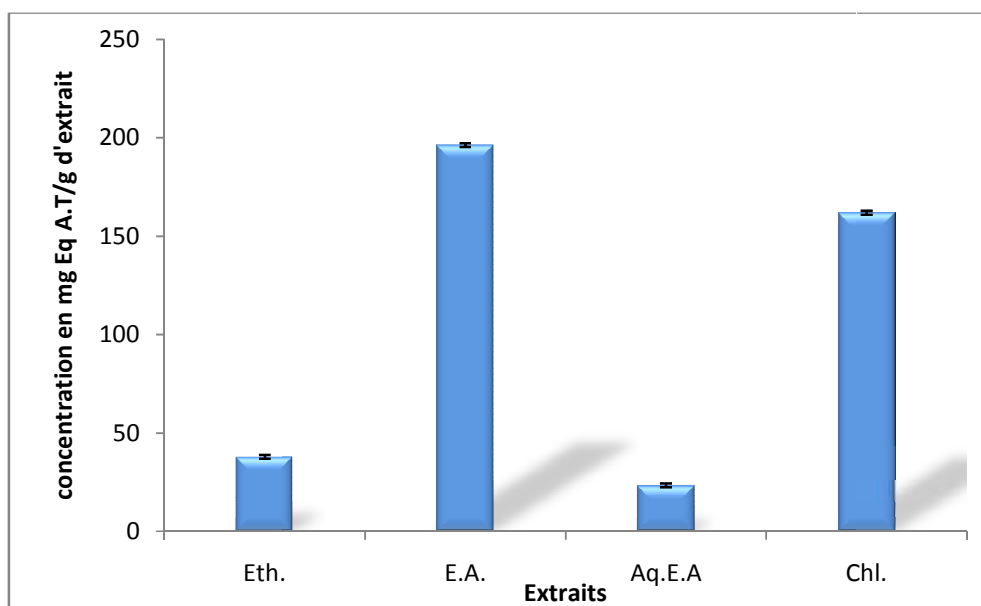


Figure N°23 : La teneur en tanin des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*. **Eth.** : éthanolique, **E.A.** : éthyle acétate, **Aq.E.A.** : Aqueux d'éthyle acétate, **Chl.** : Chloroforme.

Les résultats obtenus du dosage des tannins, montrent que les meilleurs taux sont concentrés au niveau de l'extrait acétate d'éthyle et celui du chloroforme avec 196,34 et 161,94 mg Eq acide tannique/g, respectivement. Quant à l'extrait de l'aqueux acétate d'éthyle est huit fois inférieur à celui observé au niveau de l'extrait acétate d'éthyle et sept fois inférieur à celui de chloroforme. Cela permet de constater que les plus grandes concentrations ont été obtenues dans les phases organiques.

De ces résultats, on peut en conclure que notre plante d'étude *Fraxinus angustifolia* contient plus de tannins polaires qu'apolaires.

II.3. Activité inhibitrice de l'HOCL :

L'activité scavenging du radical HOCL des différents extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à 500µg/ml avec la standard rutine est illustrée dans la figure suivante :

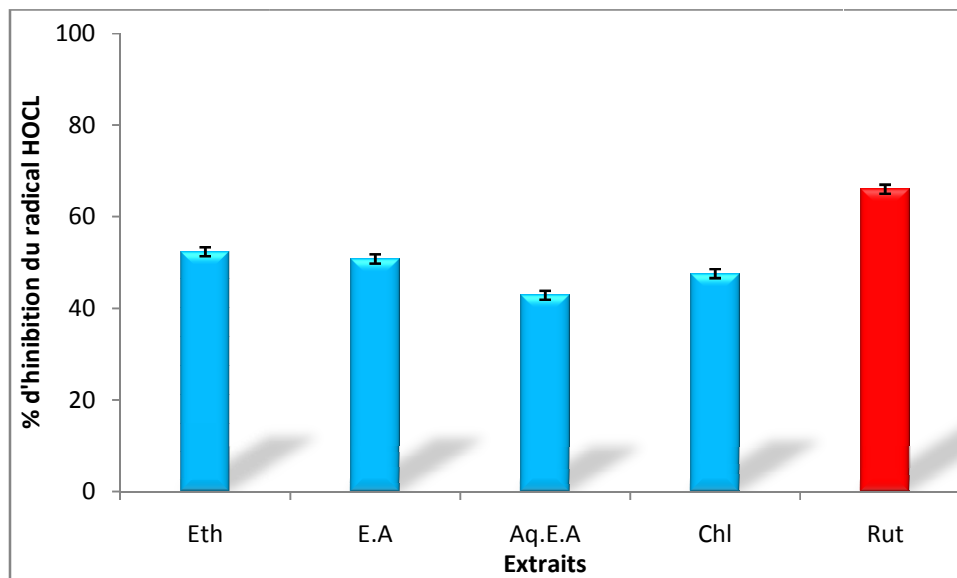


Figure N°24 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition du radical HOCL des différents extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et un standard à 500µg/ml **Eth.** : éthanolique, **E.A** : éthyle acétate, **Aq.E.A** : Aqueux d'éthyle acétate, **Chl** : Chloroforme, **Rut** : Rutine.

Selon les résultats illustrés dans la figure N°24, on constate que l'extrait éthanolique et l'extrait acétate d'éthyle présentent les meilleures activités scavenging du HOCL par rapport aux autres extraits avec 52,38% et 50,79%, respectivement. Mais, ces résultats restent inférieurs à celle de standard utilisé la rutine qui est de 66%. Quand à l'extrait aqueux acétate d'éthyle il exhibe l'activité la plus faible par rapport aux autres extraits avec 42,85%.

II.3.1. Pourcentage d'inhibition du radical HOCL en fonction de la concentration :

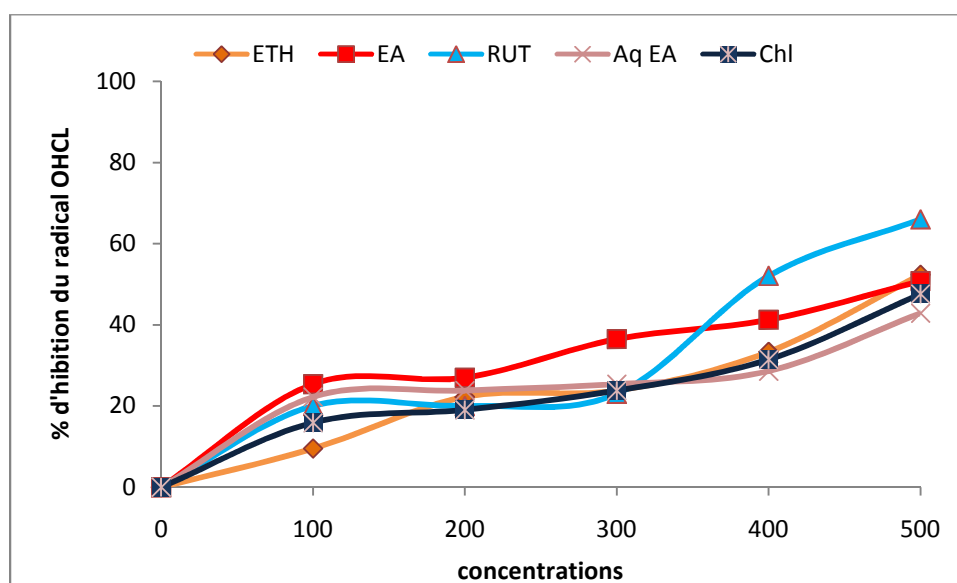


Figure N°25 : Pourcentage d'inhibition du radical HOCL en fonction de la concentration

L'effet de piéger l'espèce oxygénés HOCL par les extraits : ethanolique et aqueux acétate d'éthyle et chloroforme présente presque le même pouvoir au fur et à mesure que la concentration augmente cela nous a poussé à soupçonner que les composés responsable de ce pouvoir peuvent être les mêmes dans les deux extraits ou ayant les même caractéristiques.

II.4. Corrélation :

La structure des polyphénols est l'élément clé de leurs activités antioxydant. Il existe une forte corrélation entre l'arrangement spatial des substituant et l'activité antioxydant. En effet, la configuration ainsi que le nombre total des groupements hydroxyles influencent fortement les mécanismes de l'activité antioxydant (Hein *et al.*, 2002).

Afin de déterminer la relation qui existe entre la teneur en composés phénoliques des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* et leurs activités anti-radicalaires, nous avons déterminé les facteurs de corrélation

II.4.1. Corrélation entre les teneurs en phénols totaux et l'activité anti-HOCL :

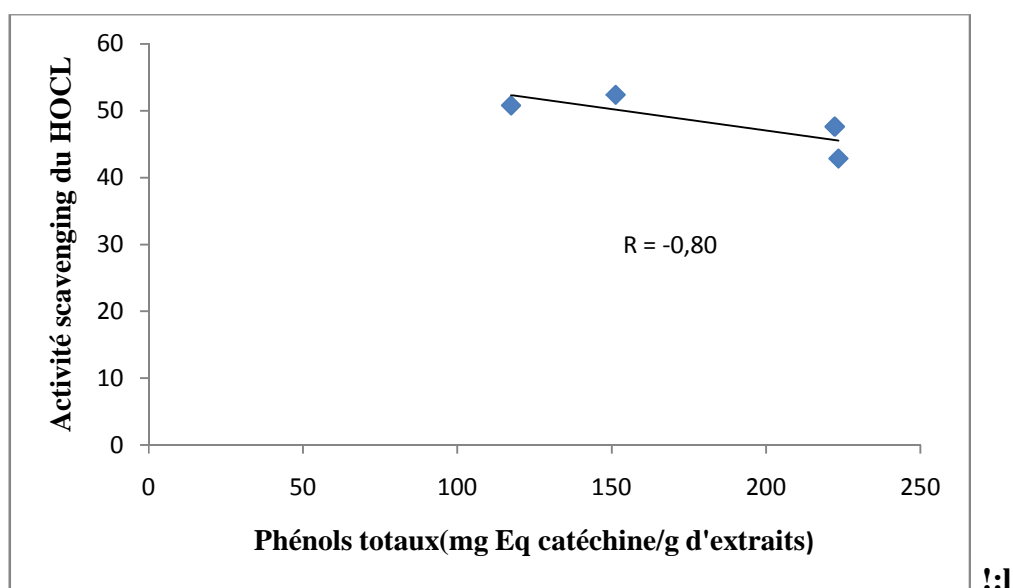


Figure N° 26 : Corrélation entre l'activité scavenging du HOCL et les phénols totaux des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

Le coefficient de de corrélation entre le taux en phénols totaux des extraits de *Fraxinus angustifolia* et leurs activités scavenging du HOCL est de $r=0,80$, ce qui suggère qu'il ya une bonne corrélation positive entre l'effet scavenging et la teneur en phénol totaux. Ce résultat est en accord avec une étude menée par **Vidushi et ses collaborateurs (2006)**, qui a montré qu'il ya une bonne corrélation entre la composition en phénols totaux des extraits de deux plantes endémiques et l'activité anti-HOCL ($r=0,714$).

II.4.2. Corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et l'activité anti-HOCL :

La corrélation entre l'activité scavenging du radical HOCL et les flavonoïdes des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est illustrée par la figure suivante :

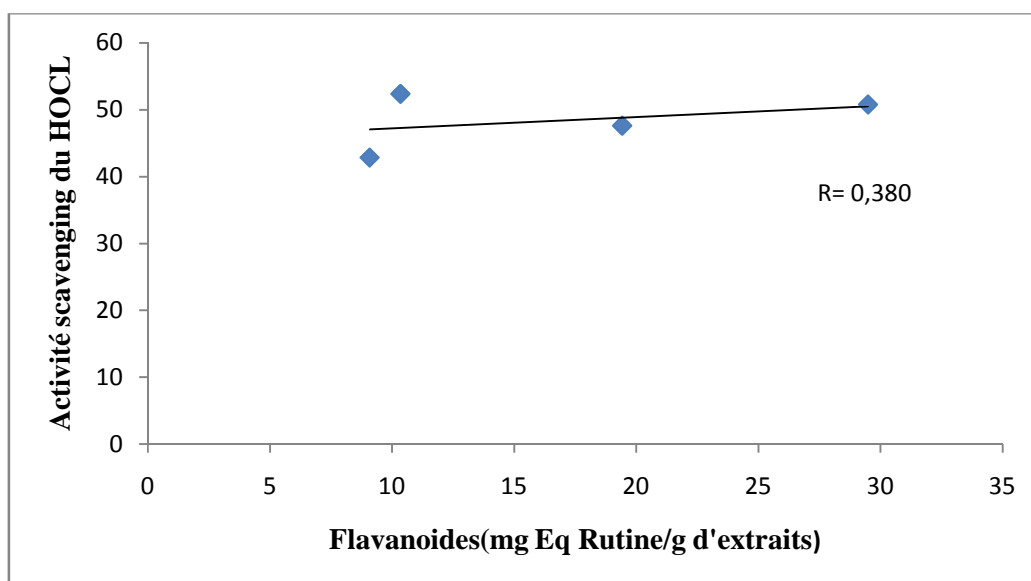


Figure N°27 : Corrélation entre l'activité scavenging du HOCL et flavonoides des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*

Le coefficient de corrélation entre les taux en flavanoides des extraits de *Fraxinus angustifolia* et leurs activités scavenging du radical HOCL et de $r=0,380$, ce qui suggère qu'il ya une moyenne corrélation positive entre l'effet scavenging et la teneur en flavonoïdes.

II.4.3. Corrélation entre les teneurs en tannins et les activités anti-radicalaires HOCL :

La corrélation entre l'activité scavenging du radical HOCL et les tannins des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* sont illustré par la figure suivante :

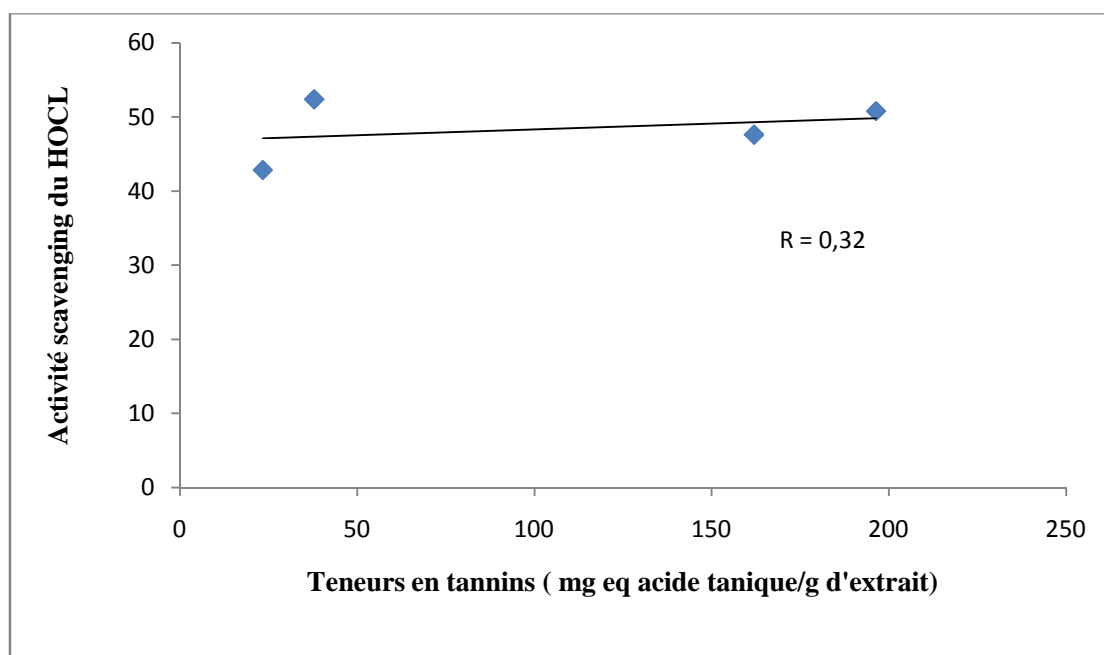


Figure N°29 : Corrélation entre l'activité scavenging du HOCl et les tanins des extraits l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

Le coefficient de corrélation entre le taux en tanins des extraits de *Fraxinus angustifolia* et leurs activité scavenging du HOCl est de $r=0,32$, ce qui suggère qu'il y a une moyenne corrélation positive entre l'effet scavenging et la teneur en tanins

Conclusion

Conclusion

Dans le but de poursuivre les recherches effectuées sur la capacité des extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* à piéger les différents radicaux libres, on a évalué l'activité scavenging d'un nouveau radical, à savoir le HOCL des différents extraits de l'écorce de la plante étudiée.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire contre le radical HOCL à une concentration de 500µg/ml, a prouvé une bonne activité scavenging, notamment au niveau de l'extrait éthanolique et l'extrait acétate d'éthyle avec 52,38% et 50,79% respectivement. Mais ces résultats restent inférieurs à celle du standard utilisé, la rutine qui est de 66% à 500µg/ml.

Quant à l'extrait aqueux acétate d'éthyle il exhibe l'activité la plus faible par rapport aux autres extraits avec 42,85%.

En perspective, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur ces extraits s'imposent au niveau pharmacologique et chimique. Donc il serait intéressant à l'avenir de :

- Tester les composés de ces extraits en faisant appel à des tests pharmacologiques in vivo.
- Vérifier l'absence d'effets cytotoxique de ces composés.
- Etudier d'autres propriétés biologiques de ces extraits, à savoir les propriétés anti- inflammatoires, antifongique, antibactériennes, antivirales, antidiabétiques et d'autres.

A

Andersen, H.R. Nielsen, J. B. Nielsen, F. randjean, P. (1997). Anti oxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry*. 43: 562-568

Afons Valéry, Romulad Champy, Dragoslav Mitrovic, Pasacal colin, Abderrahim Lomrie (2007). Radiacaux libres derives de l'oxygène et superoxide dismutase: role dans les amaladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*. 74:636-643

Akihiko, H. Yuichiro, K. Teruko,I. Masaki, O. Hiroshi, M. (1991). Conj- uation of copper-zinc superoxide dismutase with succinylated gelatin: Pharmacological activity and cell-lubricating function. *Bioconjugate Chemical*. 4 : 490–498.

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

Ashok B., Ali R. (1999).The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol*. 34:293–303.

B

Baba, A. F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident. Librairie Moderne. *Roiba Dépôt légal*. N°91, 1-294.

Barouki R, Morel Y. (2001). Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress : mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol*. 61 : 511-516.

Besançon, P. 2000. Effets benifiques pour la santé des fruits et des legumes. Alimentation méditerranéenne et santé : actualité et perspectives. Montpellier, John libbey. Pp99-108

Beaudeux, J .L .Vasson, M. P.,(2001). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. *Biochem Pharmacol*. 61: 511-516.

Beaudeau, J-L., Delattre, J.; Therond, P.; Bnnefont-Rousselot, D.; Legrand, A. and Peyet, J. (2006). Le stress oxydant, composant physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*. 21:144-150

Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., et Sapirstein, H.D., (2005). Phenolic content and antioxidant Activity of Pearled wheat and Roller-Milled. Fractions. **Cereal chem.** 82 (4), Pp 390-393.

Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales 3^{ème} édition. Tec&doc. Paris.

Bravo, I. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary, sources, metabolism and nutritional significance, *Nutr.Rev.*56, Pp317-333. In: Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Macheix, J.J., Fleriet, A., et Christian, A. 2005. PPTUR Lausanne.

Borg et Reeber A. (2004). Le stress oxydant .in Biochimie métabolique. Ellipses, paris, pp 217-228

C

Calis, I.; Hosny, M. and Lahloub, M. F. (1993). secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry* ; 33 (6): 1453-1456.

Chiang, H. and Wen, P. and Lu, F. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *alsophila spinulosa* (Hook) tryon . *Journal of Enzyme Inhibition*, 8 (1): 61-71.

Comhair, S. A .Erzurum, S .C. (2000). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J. Physiology*. 283:246-255.

D

Droge, K . S. (2002). Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol.Rev.* 82 :47-95.

Drebel, S.; Ghedira, k. (2005). Les phytonutriments et leur impacte sur la santé.

Phytothérapie et nutrition, 1:1-9

Defraidue et al., 2006

Dicko , MH., Gruppen, H., Traoré, A.S., Alphons, G.J., Willem, J.H., and Berkel, V. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. **Biotechnology and Molecular Biology Review.** 1 (1), Pp. 21-38, April.

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

F

Favier, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. **L'actualité chimique.** 5: 108-115.

Fridovich, B. L. (1995). A superoxide dismutase mimic protects sodA sodB Escherichia coli against aerobic heating and stationary-phase death. **Arch.Biochem.Biophys** 322:291-294.

Frank, A. and Patrik, R. (2004). Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough. **Human Molecular Genetics.** 13:21–31.

G

Gattas, G. J. Kato, M.Soaes Vieira, J. A. Siraque, M. S. Kohler, P. Gomes, L. Rego, M. A. Bydlowski, S. P. (2004). Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Braz J Med Biol Res.** 337:451-458.

Gerard-Monnier, D. Chaudiere, J. (1996). Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathology Biol.* 44: 77-85

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., and Amiot, M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived product, *J.Agric.Food Chem*, 53: 1370-1373.

Guignard, J.L., Cosson, L., et Henry, M. (1985). *Abérgé de phytochimie*, Pp 138.

Guignard, J.L. (1974). *Abergé de Biochimie végétale à l'usage des étudiants en pharmacie*: Masson. Paris. Pp 146-155.

Guignard, J.L. (2000). *Biochimie végétal* 2éme edition Dunod. 188 p

H

Harman, D. (2000). Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci.* 928:1–21

Halliwell, B. Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1–14.

Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Rev.* 55:44–49.

-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.

Herbert, R. B. (1989). *The Biosynthesis of secondary metabolites*. 2éme edition Chapman and Halle p 2, 11-115.

Haborne, J.B. (2005). Plant phenolics in *Encyclopedia of plant physiology*, 8, Bell EA, Charlwood BV, eds Springer-Verlag, Berlin; Pp 329-402. In: *Les composés phénoliques*

des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Macheix, J.J., Fleriet, A., and Christian, A. PPTUR Lausanne

Heller, R., Esnault, R., et Delance, C. (1998). physiologie végétale 1-nutrition 6^{ème} édition. Dunod. Paris, Pp 289-288.

Haborne, J. B. (1980). Plant phenolics in Encyclopedia of plant physiology, 8, Bell EA, Charlwood BV, eds Spinger-Verlag, Berlin; Pp 329-402. In: Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Macheix, J.J., Fleriet, A., and Christian, A. 2005. PPTUR Lausanne

Haslam, E. (1989). Plant polyphenols, végétale tannins revisited cambridge University Press, Combridge, P 230. In: Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. Macheix, J.J., Fleriet, A., et Christian, A. 2005. PPTUR Lausanne

Hopkins, W. G. (2003). Physiologie végétale. Edition Debock et lancier. Pp 276.

Houdret, J. C. (2004). Bien se soigner par les plantes, Un guide pratique pour traiter les troubles et affections du quotidien de toute la famille. *Pocket Evolution*. 633 p

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.

J

Ji, I. I. (1998). exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*. Vol 928.236-247.

Jayakumar, T., Thomas, P.A and Geraldine, P. (2009). In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 228–234. **K**

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

Kirkman, H. N. Rolfo, M. Ferraris, A. M. Gaetani, G. F. (1999). Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biology Chem.* 274:13908-13914.

Knight, T. R. Kurtz, A. Bajt, M. L. Hinson, J. A. Jaeschke, H. (2001). Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen-induced liver injury:role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci.* 62:212–220.

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.

L

Laight, D. W. Carrier, M. J. Anggards, E. E. (2000). Antioxidants,diabetes and endothelial function. *Cardiovasc Res.* 47: 457-464.

Levine, R. L. Garland, D. Oliver, C. N. Amici, A. Climent, I. Lenz, A. G. Ahn , B. W, Shaltie S, Mc Cord JM 2002. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 108: 652-659.

Lee, K.W.; Kim, Y. J.; Kim, D-O.; Lee, H. J.; and Lee, C.Y.(2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4-8. M

Maarouf A .2000. Dictionnaire botanique Pp 129.

Makris, D. P.; Kefalas, P. (2005). Association between *in vitro* antiradical activity and ferric reducing power in aged red wines: a mechanistic approach. *Food Science Technology International*, **11** (1):11-18.

Marfac, A. 2003. Radiolyse Gamma des Flavonoïds. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de Depsides. Thèses de Doctorat. Université de Limoges.

Medic Saric, M., Jasprica, I., Smoleic-Bubalo, An et Mornar, A. 2004. Optimisation of chromatographic condition in thin layer chromatography of flavonoïdes and phenolic acids. *Croatian chemica acta*.77- (1-2), 361-366.

Macheix, J.J., Fleriet, A et Christian, A .2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de metabolites secondaire d'importance économique. PPTUR Lausanne.

Morel, Y. Barouki, R. 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*: 342 : 481-496.

Mates, J.M. Perez-Gomez, C. Nunez de Castro,I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*. 32:595-603.

May,J.M. Mendiratta,S. Hill,K.E. Burk,R.F. 1997. Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the selenoenzyme thioredoxin reductase. *JBio Chem*. Vol 272: 22607-22610.

N

Nacz, M.; and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**: 95-111.

Niki ,L. Reynaert, S.W. Aesif, T. McGovern, Amy Brown, Emiel, F.M.Wouters, Charles, G. Irvin Yvonne, M. W. Janssen-Heininger . 2007. Catalase Overexpression

Fails to Attenuate Allergic Airways Disease in the Mouse. **The Journal of Immunology**. 178: 3814-3821.

Nancy, J. Linford, S. I. Chriner, E. Peter, S. Rabinovitch. 2006. Oxidative Damage and Aging: Spotlight on Mitochondria. **Cancer Res**; 66: 2497-2499.

P

Purdue, P.E. Lazarow, P. B. 1996. Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. **The Journal of Cell Biology**. 134: 849-862.

Psotová, J., Lasovsky, J; Vicar, J. 2003. Metal –chelating Property, Electrochemical Behaviour, Scavenging and Cytoprotective Activities of six Natural Phenolic. *Biomed. Papers* 147(2), 147-153.

R

Richter, R. 1993. *Metabolisme des végétaux physiologie et biochimie*. PPUR. Lausanne Pp 319-322.

Renuka B. Rajurkar, Z. H. Govind, T. G. 2003. Studies on levels of glutathione S-transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. **Current Science**. 85: 1355-1360.

Radi, R. Turrens, J. F. Chang, L.Y. Bush, K. M. Crapo, J. D. Freeman, B. A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. **J Biology Chemical**. 266: 22028-22034.

Rehman, I. ; Biswa, S. K. and Kode, A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and diseases. *European Journal of Pharmacology*, 533:222-239

S

Stief, T. W. 2003. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. **Med Hypoth .** 60:567–572.

Steinman, H. M. (1992). Construction of an *Escherichia coli* K-12 strain deleted for manganese and iron superoxide dismutase genes and its use in cloning the iron superoxide dismutase gene of *Legionella pneumophila*. **Mol & Gen Genet..** 232, 427-430.

V

Vergely, C. Goirand, F. Ecartot-Laubriet, A. Renard, C. Moreau, J.-C. Guiland, D. 2003. NF- κ B activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. **Experi Biol and Med.** 228: 855 - 865.

Vainshtein, et al. 1985. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at. 2.0 Å resolution. **J Mol Biology.** 18: 49-61.

Vertuani, S. Angusti, A. Manfredini, S. 2004. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. **Curr Pharm Des.** 10: 1677-1694.

Vidushi S., Neergheena, Muhammad A., Soobratteea, Theeshan Bahoruna, Okezie I. (2005). Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro. Aruomaba Department of Biosciences, Faculty of Science, University of Mauritius, Réduit, Republic of Mauritiusb, Faculty of Health and Social Care, London South Bank University, Borough Road, London SE1 0AA, UK.

W

Wuerges, J. Lee, J. W. Yim, Y. Yim, H. S. Kang, S. Djinovic, K. C. 2004. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. **Biochemistry.**101: 8569 – 8574.

Wassmann, S. Wassmann, K. Nickenig, G. 2004. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hyperten.** 44: 381-386.

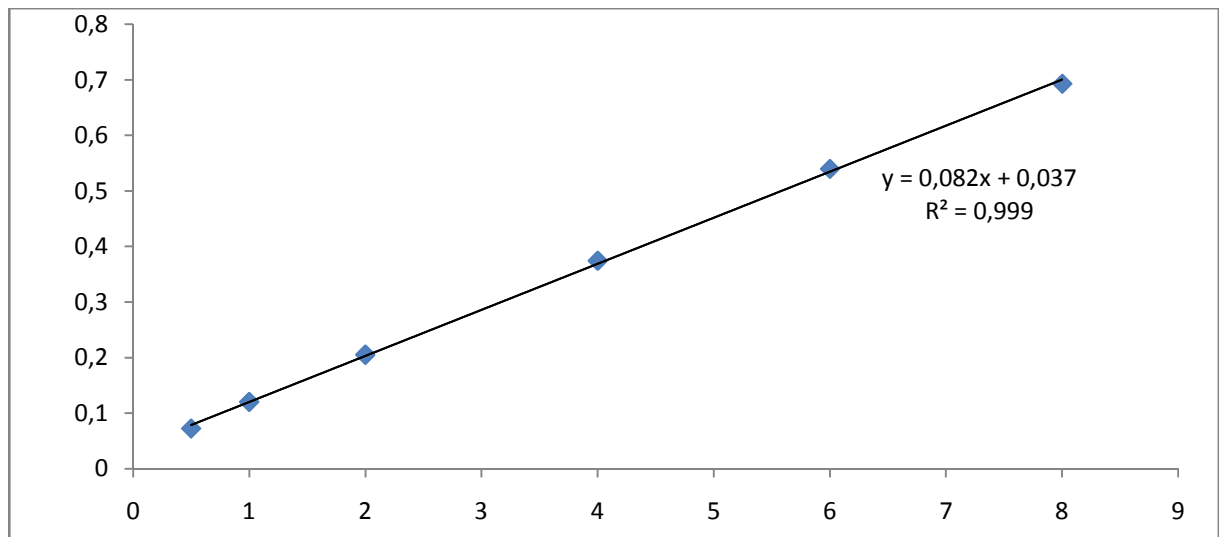
Wiernsperger, N. F. 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes:revisiting the controversy. *Diabetes Metab.* 29,579-85.

Y

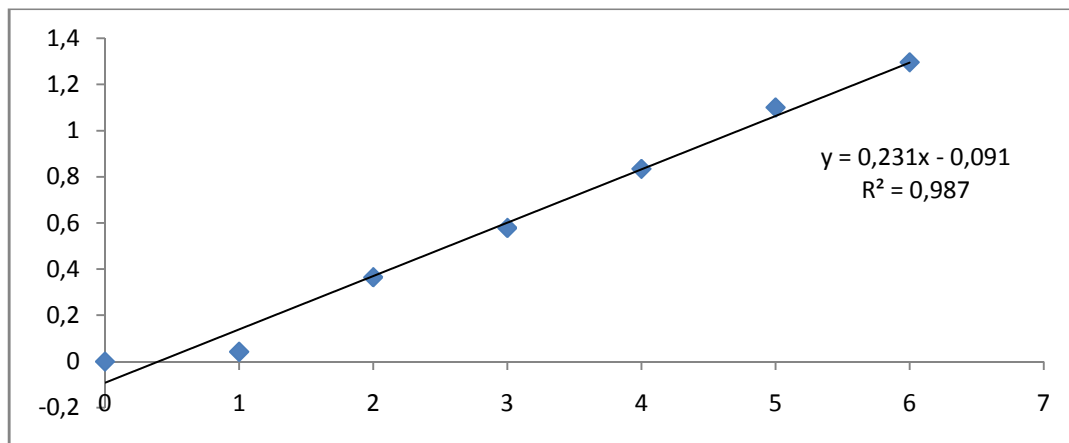
Ye - Shih, Ho. Ye, Xiong, Wanchao. Ma, Abraham. Spector, Dorothy, S. Ho. 2004. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. **J of biological chemistry.** 279: 32804 –32812.

Z

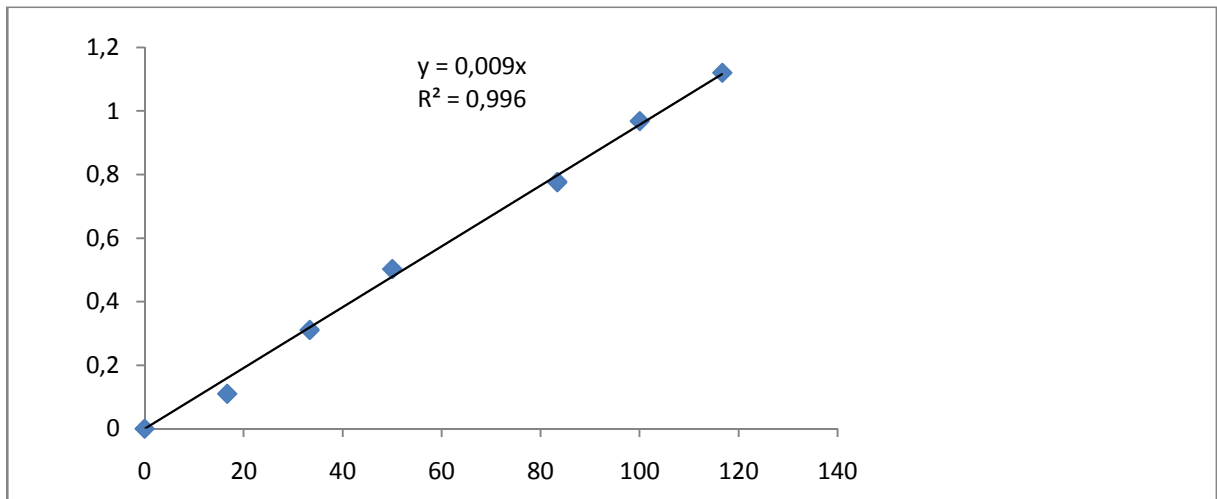
Zhijia, J. Elias, S. J. A. Ying, M. Linda, J. Jinming, S. Siqi, Z. Shujun, L. Ruiying, W. Tianzhu, Z. Ganglin, Y. Junqiu, L. Jiacong, S. Guimin, L. 2004. Expression of selenocysteine-containing glutathione S-transferase in Escherichia coli. **Biochem and Bioph Res Commun.** 321:94–101



Annexe I : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des phénols totaux des extrait de *Fraxinus angustifolia*



Annexe II : Courbe d'étalonnage avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes.



Annexe III : Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tanins.