

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 Physicochimique

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Biologie
Option : Biochimie appliquée

Thème

Evaluation de l'activité Antioxydant de l'écorce de
Fraxinus angustifolia in vivo

Présenté par :

M^{elle} : BENCHALAL Karima

M^{elle} : HANI Ghania

Membres du jury :

Présidente : M^{me} Debbache N.

Promotrice : M^{elle} Chaher N.

Co-promotrice : M^{elle} Cheraft N

Examinatrices : M^{elle} Sebaihi S.

M^{elle} Tahiri W.

Invitée : M^{me} Atmani D.

Promotion 2011-2012



Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier Dieu tout puissant de nous avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer nos gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice M^{elle} Chaher N pour nous avoir proposé ce nouveau sujet très intéressant, son aide, ses encouragements, ses conseils et orientations malgré son absence, sans oublier notre Co- promotrice M^{elle} Cheraft N de nous avoir accepter de nous co-encadrer ainsi qu'a sa gentillesse et sa disponibilité.

Toutes nos expressions de respect à M^{me} Debbache N qui nous a fait honneur par sa présence en qualité de présidente de jury, et à M^{elle} Tahiri W et M^{elle} Sebaihi S qui nous à fait honneur en qualité d'examiné ce travail.

Nos remerciements les plus vifs vont au Professeur Atmani DJ de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire ; Une pensée particulière à son épouse pour son esprit de coopération et de courtoisie dont elle a fait preuve, son aide précieuse, ses encouragements, ses conseils et orientations malgré ses nombreuses charges.

Ainsi que l'ingénieure de laboratoire Saidene Naima pour sa vive présence et son aide et sa disponibilité.

Enfin, Nous remercions également toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'achèvement de ce travail.



Dédicaces

Au nom du tout puissant

Je dédie ce travail

À mes très chers parents, qui m'ont soutenu tout au long de ces années, avec leurs affections et leurs amours, et que dieu leur offre une bonne santé et longue vie;

À mon adorable frère Rabah ;

A mes chères sœurs Souad et Farida ;

A ma grande famille de près ou de loin, cousins et cousines ;

À mes grands parents que dieu leurs prêtent une longue vie ;

À tous mes très chères ami(e)s et pour tous ceux qui m'aiment surtout Nabila et Sabah ;

À Mon fiancé Latamene pour son aide précieuse, ainsi à sa famille surtout leur petite adorée Hafida

À celle qui ma fait le plaisir de partager ce travail Karima et sa famille;

A toute la promotion de Biochimie Appliquée.

Ghania





Dédicaces

Au nom du tout puissant

Je dédie ce travail

A mes très chers parents, qui m'ont soutenue tout au long de mes études, que Dieu les protège et leur procure bonheur, santé et longue vie.

A mon adorable et très chère sœur : Nawel.

A mon très cher frère : Mouloud.

A mon grand-père et ma grand-mère : Djedi Yousef et Yema Ouda.

A tous mes oncles et tantes.

A tous mes cousins et cousines.

A la mémoire de mon grand-père et ma grand-mère « Yema Fatma » que Dieu ait leurs âmes et les accueille dans son vaste paradis.

A toutes mes amies : Nabila, Sabah, Nadia, Sabiha, Sonia.

A Celle avec laquelle j'ai partagé ce travail, Ghania et sa famille.

A toute la promotion Biochimie appliquée 20011- 2012.

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

KARIMA



SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
---------------------------	----

Chapitre I: Synthèse Bibliographique

I-peroxydation des lipides	02
I.1. Généralité	02
I.2. Les facteurs inducteurs de la peroxydation des lipides	02
I.3. Les initiateurs de l'oxydation des lipides.....	02
I.3.1. les espèces réactives de l'oxygène	02
I.3.2. les métaux	03
I.3.3. Facteurs environnementaux	03
I.4. Mécanisme de la peroxydation des lipides.....	03
I.4.1. Autooxydation.	03
I.4.2 Photo-oxydation	04
I.4.3. Voie enzymatique	05
I.5. Produit de la peroxydation des lipides	05
I.6. Conséquences de la peroxydation lipidiques	06
II. Les Antioxydants	08
II.1. Les antioxydants enzymatiques (endogènes)	08
II.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	08
II.1.2. Les catalases	08
II.1.3. Glutathion peroxydase et glutathion réductase.....	09
II.1.4. Thiorédoxine (TRX)	09
II.1.5. La bilirubine	10
II.2. Les antioxydants non enzymatiques (exogènes)	10
II.2.1. La vitamine E (alpha tocophérol)	11
II.2.2. La vitamine C (acide ascorbique).....	11
II.2.3. Les caroténoïdes	11
II.2.4. Les oligo-éléments	12
III. Les composés phénoliques	13
III.1. Définition	13
III.2. La biosynthèse des polyphénols	13
III.2.1. Voie de l'acide shikimique	13
III.2.2. Voie de polyacétate	13
III.3. Classification des composés phénoliques	14
III.3.1. Les composés phénoliques simples.....	14
III.3.1.1. Les acides phénoliques	14
III.3.1.2. Les coumarines	16
III.3.1.3. Les stilbénes	16
III.3.1.4. Les flavonoïdes	16
III.3.2. Polyphénols complexes	17
III.3.2.1. Tannins	17
IV. Mécanismes d'inhibition de la peroxydation lipidiques	19
IV.1. Les antioxydants préventifs	19
IV.1.2. Mécanismes d'action des antioxydants préventifs	19
IV.2. Les antioxydants « chain breaking »	20

IV.3. Mécanismes d'action	21
IV. 3.1.L'acide ascorbique	21
IV.3.2.Les flavonoïdes	21
IV.4. La relation entre la structure et l'activité des flavonoïdes dans l'inhibition de la peroxydation lipidiques	24

Chapitre II : Matériel et méthode

I.Matériels	26
I.1. Matériels végétal	26
I.1.1.Description	26
I.1.2. Propriétés et usage	27
I.1.3. Composition chimique	27
I.1.4. Préparation du matériel végétal	27
I.1.4.1. Récolte	27
I.1.4.2. Broyage et tamisage	27
I.1.4.3. Extraction	27
I.2. Matériel animal	29
II. Etude, <i>in vivo</i>, de l'activité antioxydant de l'extrait aqueux acétate d'éthyle de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>.	29
II.1. Plan d'expérience	29
II.2. Test de l'acide thiobarbiturique (TBA)	30
II.3. Le dosage de la bilirubine totale.....	30
II.4. Corrélations	30
II.5. poids relatifs des foies.....	31
II.6. Analyse statistique.....	31

Chapitre III : Résultats et discussions

II. 1. Taux d'extraction	32
II.2. Test de TBA	33
II.3.Le dosage de la bilirubine	36
II.4. Corrélations	38
II.4.1. Corrélation entre le poids des souris du control - et le taux de MDA	38
II.4.2. Corrélation entre le poids des souris du control + et le taux de MDA	38
II.4.3. Corrélation entre le poids des souris du standard et le taux de MDA	38
II.4.4. Corrélation entre le poids des souris traité par l'extrait et le taux de MDA	38
II.5. poids relative	39

CONCLUSION	40
-------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

- **AlCl₃** : Chlorure d'aluminium.
- **Cat** : Catéchine
- **CAT** : Catalase
- **Cu** : Cuivre
- **EDTA** : Ethylène-diamine tétra-acétique
- **Fe³⁺** : Ions ferriques
- **Fe²⁺** : Ions ferreux
- **FeCl₃** : Chlorhydrique ferrique
- **FeCl₂** : chlorure de fer
- **GR** : Glutathion réductase
- **GSH** : Glutathion réduit
- **GSSG** : Glutathion oxydé
- **GPx** : Glutathion peroxydase
- **H⁺** : proton d'Hydrogène.
- **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène.
- **HCl** : Acide chlorhydrique.
- **Mn** : Manganèse
- **Mn-SOD** : superoxyde dismutase associée au manganèse
- **NaCl** : Chlorure de sodium
- **NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
- **NADP⁺** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- **NOS** : Nitrique Oxyde Synthase
- **O₂** : Dioxygène
- **O₂^{•-}** : Radical superoxyde
- **OCH₃** : Méthoxyles
- **ROS** : Espèces réactives de l'oxygène
- **SDS** : Dodecyl Sulfate de Sodium
- **TEA** : Triethanolamine
- **XO** : Xanthine oxydase
- **Zn-SOD** : superoxyde dismutase associée au zinc
- **ERO** : Espèces réactifs de l'oxygène

Liste des abréviations

- **OH[•]** : Radical hydroxyl
- **RH** : acides gras insaturés
- **R[•]** : radical lipoylé
- **ROO[•]** : radicaux peroxydes instables
- **ROOH** : Hydroperoxyde organique
- **SOD** : Superoxyde dismutase
- **GSH** : Glutathion réduit
- **TBA** : Acide thiobarbiturique
- **TCA** : Acide trichloracétique
- **MDA** : Malon dialdéhyde
- **CCl₄** : Tétrachlorure de carbone
- **CCl₃[•]** : Trichlorométhyle
- **LPO** : lipid peroxidation

Figure 01 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique.....	05
Figure 02 : Les produits primaires et secondaires résultant de la peroxydation des lipides.	06
Figure 03 : Système antioxydant enzymatique.....	10
Figure 04 : Réactions d'anti oxydation mettant en jeu la vitamine E et C.....	11
Figure 05 : Structure chimique de la β -carotène.....	12
Figure 06 : Structure d'un phénol.....	13
Figure 07 : Principales structures d'acides hydroxybenzoïques.....	15
Figure 08 : Principales structures d'acides hydroxycinamique.....	15
Figure 09 : Structure de base des flavonoïdes.....	16
Figure 10 : Structure de l'acide gallique (A), d'un exemple de tannins hydrolysable (B) et de l'acide ellagique (C).....	17
Figure 11 : Exemple de tanins condensés.....	18
Figure 12 : Structure chimique de la vitamine C.....	21
Figure 13 : Piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes.....	22
Figure 14 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydant des flavonoïdes	23
Figure 15 : Sites proposés pour la chélation des ions métalliques par les flavonoïdes.....	24
Figure 16 : Photographie d'écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i>	26
Figure 17 : Protocole d'extraction.....	28
Figure 18 : Taux de MDA dans les foies de souris traitées ou non par le CCl_4	34

Liste des tableaux

Tableau I: Les principales classes des flavonoïdes	14
Tableau II : Quelques informations de <i>Fraxinus angustifolia</i>	26
Tableau III: Taux d'extraction d'extraits de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>	32
Tableau IV: Dosage de la bilirubine dans les différents groupes	36
Tableau V: Poids relatifs des foies	39

Introduction


En situation physiologique, il existe un équilibre entre la production des ERO et les systèmes de défenses antioxydants. Un stress oxydant surviendra en cas d'un déséquilibre dans la balance pro-oxydants/antioxydants (**Pincemail et al., 2002 ; Berger 2006**). Ce stress oxydant est souvent à l'origine d'altérations moléculaires comme la destruction de protéines, l'apparition de cassures au sein de l'ADN, et la peroxydation des lipides (**Pincemail et al., 2003 ; Baudin, 2006**).

Les lipides sont les constituants essentiels des membranes cellulaires et des lipoprotéines (**Laguerre et al., 2007**). Leur peroxydation est associé à de nombreuses pathologies, C'est le cas des maladies neurodégénératives , du diabète, des cancers, des maladies inflammatoires, du vieillissement...ect (**Cillard et Cillard, 2006**).

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou soigner diverses maladies (**Fiorucci, 2006**). L'explication de l'efficacité de nombreuses plantes médicinales repose sur la présence de composés phénoliques dans ces plantes. C'est pour cela que les polyphénols constituent la grande partie de l'intérêt des recherches actuelles grâce à leur pouvoir de pallier le déficit du système de défense endogène. Les composés phénoliques sont largement étudiés pour leurs propriétés biologiques et pharmacologiques, notamment antioxydants (**Hennebelle et al., 2004**).

L'écorce de *Fraxinus angustifolia* est choisie sur la base de son utilisation en médecine traditionnelle locale dans le traitement de nombreuses pathologies à caractère inflammatoire.

L'objectif de cette étude est de tester *in vivo* l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* pour son effet inhibiteur contre la peroxydation lipidique induite par le CCL₄.



*Synthèse
Bibliographique*

Chapitre 1
Peroxydation des
lipides

I-peroxydation des lipides

I.1. Généralité

La peroxydation des lipides est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène moléculaire (Cillard et Cillard, 2006). Il s'agit d'un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras insaturés conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, responsables de la diminution de la fluidité membranaire (Su et al., 1993).

I.2. Les facteurs inducteurs de la peroxydation des lipides

Les facteurs qui influencent l'oxydation des lipides sont nombreux. On trouve des facteurs intrinsèques tels que la composition en acide gras des lipides (nombre et position des doubles liaisons), la présence des métaux de transition tel que le Fer et le cuivre, et d'autres enzymes ou un excès d'antioxydants naturels : tocophérols, caroténoïdes ...etc, et des facteurs externes tels que la température, la lumière (Hsieh et Kinsella, 1989).

I.3. Les initiateurs de l'oxydation des lipides

La phase d'initiation de l'oxydation des lipides peut être déclenchée par plusieurs facteurs : les formes activées de l'oxygène (ERO), les enzymes, les métaux et la température (Huttlin, 1994 ; Frankel, 1998).

I.3.1. les espèces réactives de l'oxygène

L'appellation de ERO n'est pas restrictive elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (radical superoxyde (O_2^-), radical hydroxyle (OH^\cdot), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Brito et al., 1999 ; De Leiris, 2003).

L'oxygène moléculaire dans son état fondamental se trouve à l'état triplet. Il ne peut réagir directement avec les lipides car la barrière de spin est trop élevée. La réaction de l'oxygène avec les acides gras insaturés est rendue possible par trois types de mécanismes :

-L'autooxydation : résultent de l'attaque d'une ERO tel que le radical hydroxyle (OH^\cdot) qui peut arracher un hydrogène pour former un radical alkyle qui est considéré comme premier initiateur de la peroxydation des lipides (Pokorny et al., 2001).

- la photooxydation : est la formation d'oxygène singulet capable de réagir directement avec les chaînes grasses. (Eymard, 2003).

-**Mécanisme enzymatique** : le troisième est liée à l'intervention d'enzymes permettant une fixation directe de l'oxygène moléculaire (**Graille, 2003**).

I.3.2. les métaux

Les métaux de transition jouent un rôle important dans la génération des ERO, les principaux métaux de transition sont le fer et le cuivre. Ces derniers catalyse l'oxydation par des voies enzymatiques et non enzymatiques (**Halliwell et Gutteridge, 1990**). L'initiation peut se faire par transfert d'électron ou par formation de complexe de transition (**Frankel, 1998**).

I.3.3. Facteurs environnementaux

Les principaux facteurs impliqués dans l'oxydation des lipides sont: le PH, la température, l'activité de l'eau et de la pression partielle en oxygène (**Eymard, 2003**).

I.4. Mécanisme de la peroxydation des lipides

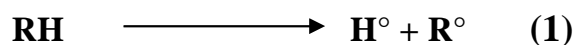
La peroxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

I.4.1. Autooxydation

L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. Il s'agit d'un enchainement de réaction radicalaire qui se déroule en trois étapes (**Eymard, 2003**)

➤ **Initiation** :

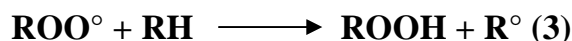
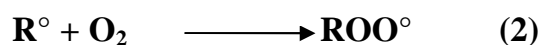
En présence d'un initiateur (I), les acides gras insaturés (RH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre de lipide (R°) (radical lipoyle). Réaction (1)



Ce mode d'initiation, favorisé par une élévation de température, peut être produit par des radiations ionisantes, des générateurs chimiques, des systèmes enzymatiques ou chimiques produisant des espèces activées de l'oxygène, et des traces métalliques.

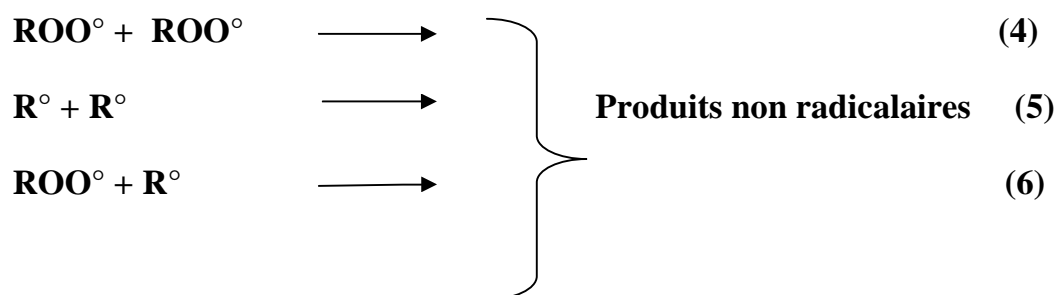
➤ **propagation**

Les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux peroxydes instables réactions (2) qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes, voir réaction (3).



➤ Terminaison

Les radicaux formés réagissent entre eux pour conduire à un produit qui n'est pas radicalaire.

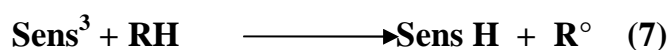


I.4.2 Photo-oxydation

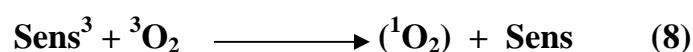
La photo-oxydation est une voie importante de production d'hydroperoxydes en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs. Ces derniers absorbent l'énergie lumineuse et passe à l'état triplet excité (Sens^3) (Eymard, 2003).

Les photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes (Frankel, 1998).

- **Type I**, telle que la riboflavine, qui a tendance à arracher un atome d'H ou une molécule insaturée pour former un radical qui est capable de réagir avec l'oxygène moléculaire. Dans leur état triplet, elle arrache un atome d'hydrogène ou un électron aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène réaction (7).



- **Type II**, comme chlorophylle et l'érythrosine qui réagissent dans leur état excité (Sens^3) avec l'oxygène triplet réaction (8) pour former de l'oxygène singulet



L'oxygène singulet ainsi formé peut réagir directement avec un acide gras insaturé (RH) formant un hydroperoxyde ROOH réaction (Frankel, 1998).

I.4.3. Voie enzymatique

Le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés peut être d'origine enzymatique. Les deux enzymes principalement impliquées dans ce phénomène sont la lipoxygénase et la cyclooxygénase (**Hutlin, 1994**).

La lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé selon une réaction stéréospécifique et aboutit à la formation d'hydroperoxydes. Elle agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés. Son activité est donc souvent couplée avec celle des lipases et phospholipase (**Figure 01**) (**Pokorny et al., 2001**).

La cyclooxygénase est une lipoxygénase qui incorpore deux molécules d'oxygène au niveau d'un acide gras pour former des hydroperoxydes spécifiques (**Josephon et Lindsay, 1986**).

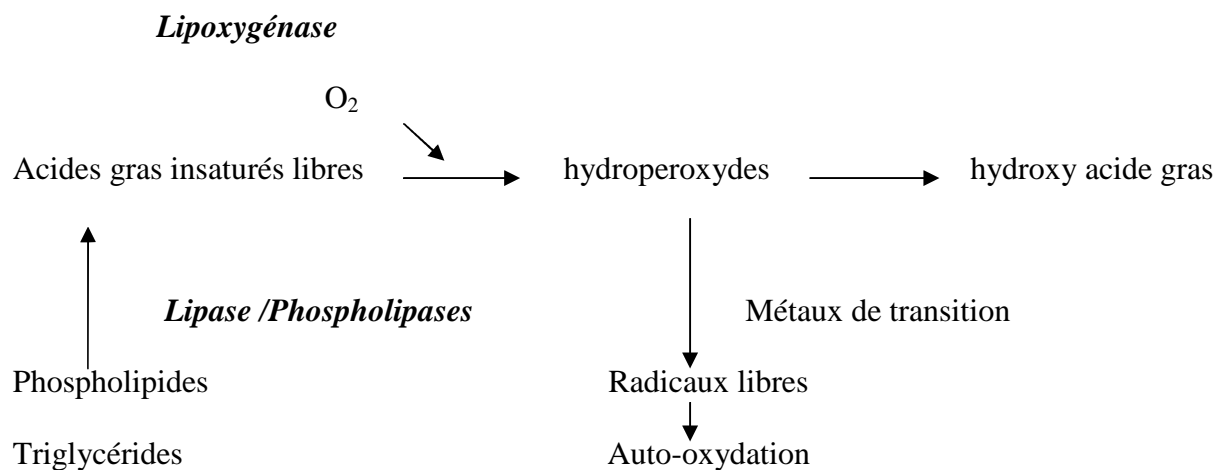


Figure 01 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique (**Eymard, 2003**).

I.5. Produit de la peroxydation des lipides

L'oxydation des lipides conduit à la formation de produits primaires : hydroperoxydes, radicaux libres, diènes conjugués, très instables et rapidement décomposés en produits secondaires : aldéhydes, alcools, cétones (**Judda, 2004**). Les composés issus lors de l'oxydation des lipides sont représentés dans la figure suivante :

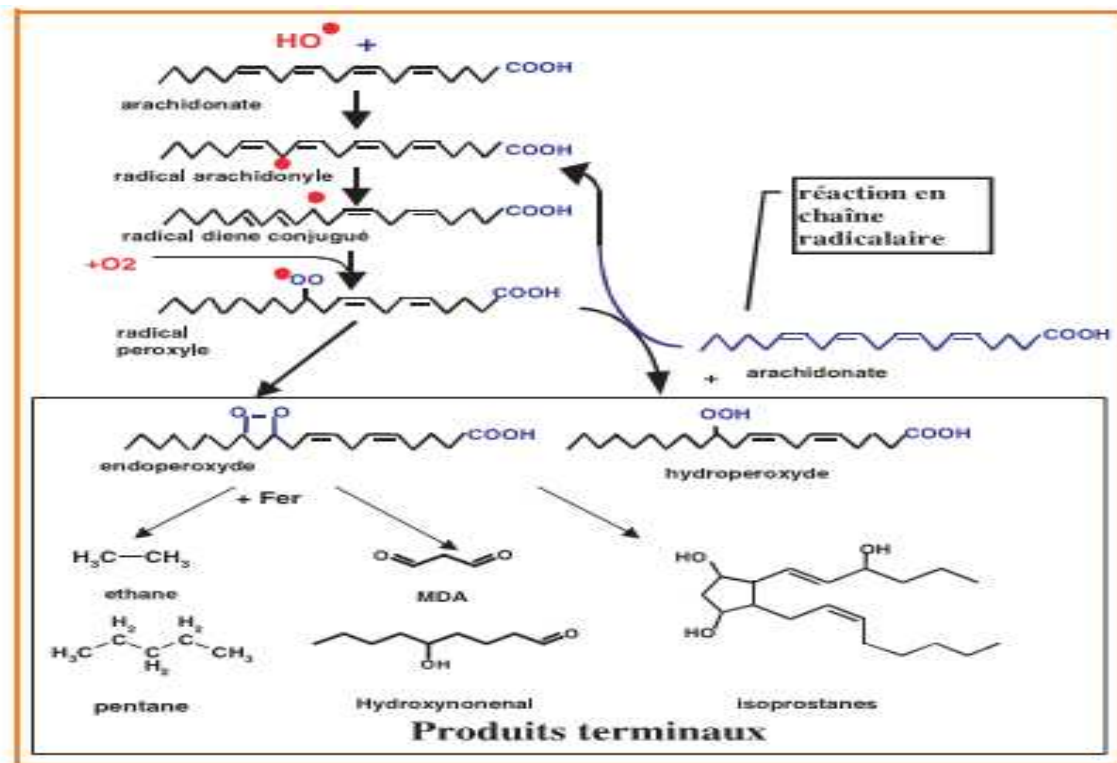


Figure 02 : Les produits primaires et secondaires résultant de la peroxydation des lipides (Favier, 2003).

I.6. Conséquences de la peroxydation lipidiques

Elles sont très nombreuses, les hydroperoxydes instables en se décomposant vont donner de nouveaux radicaux libres provoquant des oxydations des biomolécules, mais aussi des aldéhydes réactifs qui feront des adduits sur les groupements NH_2 des biomolécules (acides nucléiques, protéines, lipides).

- L'oxydation des protéines au niveau de leurs fonctions thiols altère leurs structures et leurs fonctions (perte d'activités des enzymes et des récepteurs).
- Toutes les structures de la cellule seront ainsi touchées et particulièrement les membranes (plasmiques, mitochondriale, lysosomale).
- Des conséquences nutritionnelles vont résulter de l'oxydation de nutriments (disparition des vitamines A, E, C, oxydation d'acides aminés) (Cillard et Cillard, 2006).

Chapitre II

Les antioxydants

II. Les Antioxydants

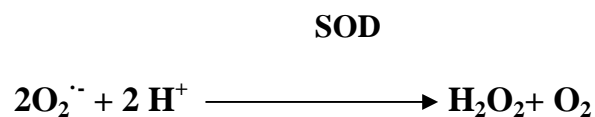
Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques, se sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (**Droge, 2002**). Les antioxydants sont classés en deux systèmes de défense différents en fonction de leur origine, le système de défense endogène et le système de défense exogène (**Comhair et Erzurum, 2002**).

II.1. Les antioxydants enzymatiques (endogènes)

Le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx), sont enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'O₂ et du H₂O₂, conduisant à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel et al., 2001**).

II.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Comme son nom l'indique, la superoxyde dismutase (SOD), qui existe sous différentes formes, est une enzyme qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (**Marfak, 2003**) selon la réaction suivante :



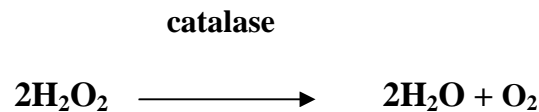
Cette enzyme existe en trois types:

- La SOD à cuivre et à zinc (Cu/Zn-SOD) ou (SOD1) localisée dans le cytosol des cellules eucaryotes et dans les globules rouges
- La SOD à manganèse (Mn SOD) ou (SOD2), située dans la membrane mitochondriale interne (**Pincemail et al., 1998**).
- La SOD à cuivre et à zinc extracellulaire (Cu Zn SOD) ou (SOD3) a été découverte chez l'homme dans le sérum, la lymphe et le liquide Synovial (**Jungbluth, 2008**).

II.1.2. Les catalases

Les catalases sont des enzymes hémiques localisés dans les érythrocytes et les tissus à métabolisme élevé comme le foie, les reins et le cœur, mais ils existent en fortes concentrations dans les peroxysomes (**Clausse 2001, Favier 2003**). Elles agissent en synergie

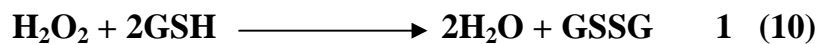
avec la SOD puisque leur rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante: (Marfak, 2003).



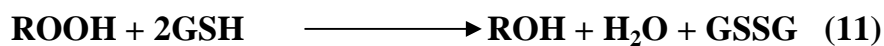
II.1.3. Glutathion peroxydase et glutathion réductase

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau (réaction10), et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools.

Pour leur fonctionnement, elles utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur le transformant en glutathion oxydé (GSSG) (réaction11) (Garait, 2006). Selon la réaction suivante :

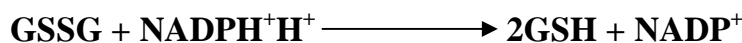


GPx



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

GR



II.1.4. Thiorédoxine (TRX)

Cette enzyme à une structure proche de celle de la glutathion réductase. Elle consomme aussi du NADPH dans son fonctionnement et joue un rôle protecteur contre une grande variété de stress oxydatif grâce à ses propriétés de capture des radicaux libres (figure 03), (Soares, 2005).

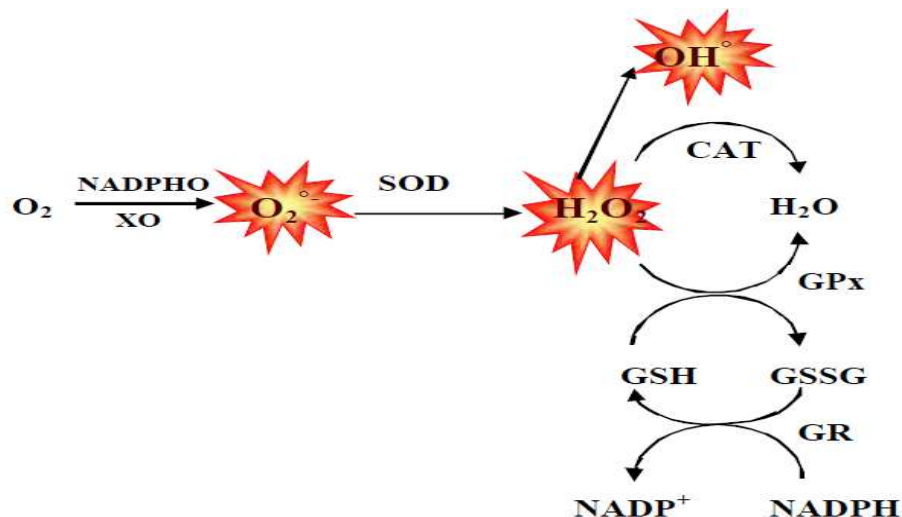


Figure 03 : Système antioxydant enzymatique.

II.1.5. La Bilirubine :

Les globules rouges sont décomposés à la fin de leur vie circulatoire dans le système réticulo-endothélial et principalement dans la rate. L'hème résultant, est alors converti en bilirubine. Son excrétion de l'organisme est réalisée de façon prédominante par sécrétion dans la bile, elle est insoluble et nécessite une transformation chimique par le foie avant son excrétion pour être solubilisée. Et présente sous deux formes dans le sérum, direct conjugué (soluble) ou indirecte qui correspond à la forme non conjugué (non soluble). Les normes de la bilirubine représentent la balance entre la production (dégradation de l'hémoglobine) et son élimination hépatique (Masood., et al 2002)

La bilirubine est également considérée comme un membre de la famille antioxydant, contre des radicaux de peroxy. Dans le plasma, elle peut agir synergique avec la vitamine E de protéger des membranes contre la peroxydation lipidique, peut agir in vivo comme l'extracteur efficace du ROS et joue un rôle physiologique principal dans le cytoprotection contre des dommages oxydatifs (Annabi., et al 2007).

II.2. Les antioxydants non enzymatiques (exogènes)

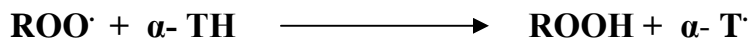
Un certain nombre de substances d'origine alimentaire telles que la vitamine E et C, les carotènes et les polyphénols s'opposent à la propagation des radicaux libres, très souvent en formant à partir d'un radical très réactif un autre radical beaucoup moins réactif. Elles sont capables de neutraliser un seul radical libre par molécule (Servais, 2004).

II.2.1. La vitamine E (alpha tocophérol)

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, qui comprend quatre substances :

L' α -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol). Biologiquement, l' α -tocophérol est la forme la plus active et la plus efficace (Ricciarelli et al., 2001)

La vitamine E est capable de neutraliser les radicaux HO, ROO \cdot et RO \cdot en cédant l'hydrogène du groupement hydroxyle, il se forme le radical α -tocophérole α -T \cdot , tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde (Gardès-Albert et al., 2003).



La vitamine E a un rôle essentiel dans la protection des phospholipides membranaires en interrompant les réactions radicalaires en chaîne (Jungbluth, 2008).

II.2.2. La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique a une structure apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone (Jungbluth, 2008). La vitamine C hydrosoluble est considérée comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires, son rôle est de capter efficacement les radicaux hydroxyle(OH), peroxyde d'hydrogène(H₂O₂) et superoxyde (O₂) (Gardès-Albert et al., 2003). Son effet antioxydant permet la régénération de la vitamine E, l'acide déshydroascorbique qui peut être ensuite réduit par le glutathion.

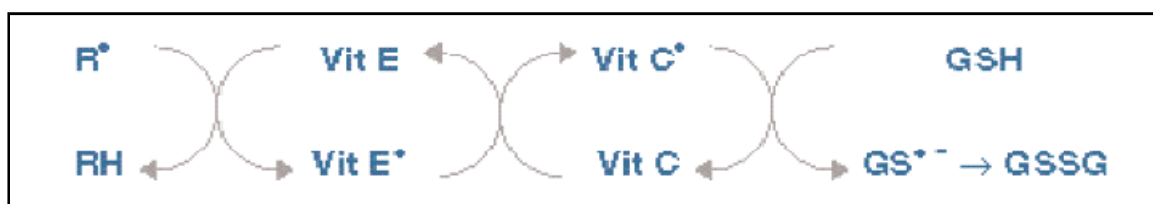


Figure 04 : Réactions d'anti oxydation mettant en jeu la vitamine E et C (Pincemail et al., 1998).

D'autre part, à concentration élevée et en présence de métaux de transition la vitamine C peut devenir pro-oxydante et générer des radicaux libres (Cossu et al., 1997 ; Pincemail et al., 1998).

II.2.3. Les caroténoïdes

Les principaux caroténoïdes sont la α - et β -carotène, la lutéine, la zéaxanthine, la cryptoxanthine et le lycopène. Certains caroténoïdes préviennent ou contrôlent efficacement

la génération de radicaux libres notamment en captant l'oxygène singulet, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière (Gardés-Albert *et al.*, 2003 ; Derbel et Ghedira, 2005).



Figure 05 : Structure chimique de la β -carotène (Lee *et al.*, 2003).

II.2.4. Les oligo-éléments

Les oligoéléments (le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Les enzymes antioxydantes requièrent ces éléments pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GP_X de sélénium. Cependant, certains oligoéléments notamment le fer lorsque sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro oxydante (Garait, 2006).

III. Les composés phénoliques

III.1. Définition

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonction hydroxyles, libres ou engagés avec un glucide. Il s'agit de métabolites secondaires présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois (**Harborne, 1989**).

Les polyphénols peuvent être divisés en 10 classes différentes selon leur structure chimique de base, ils peuvent s'étendre de molécules simples, tels que les acides phénoliques aux composés fortement polymérisés, tels que les tannins (**Lugasi et al., 2003**).

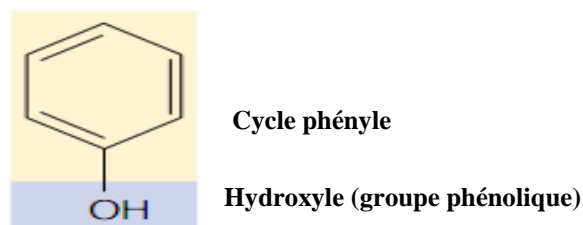


Figure 06: Structure d'un phénol (**Croteau et al., 2000**).

III.2. La biosynthèse des polyphénols

Ils sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques: shikimate et acétate.

III.2.1. Voie de l'acide shikimique

La première réaction de cette voie est la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) avec l'érythrose -4- phosphate (**Croteau et al., 2000**) Ce dernier conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

III.2.2. Voie de polyacétate

Une seconde voie de biosynthèse prend comme point de départ l'acétate et conduit aux poly- β -cétoesters (polyacétates) de longueur variable qui engendrent, par cyclisation (condensation avec le shikimate) des composés polycycliques : chromones, isocoumarines, xanthones, quinones (**Richter, 1993**).

III.3. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes selon le nombre et l'arrangement des atomes de carbones, la nature du squelette carboné et la longueur de la chaîne aliphatique liée au noyau benzénique (Macheix et al., 2006).

Ces différentes classes sont regroupées dans le tableau I

Tableau I : les principales classes des composés phénoliques (Harborne et al., 1989)

Squelette carboné	Classe	Exemple
C6	Phénols simples	Catéchol
C6-C1	Acide hydroxybenzoïques	P-hydroxybenzoïque
C6 -C3	Acides hydroxycinnamique Coumarines	Acide caféique
C6 -C2- C6	Stilbènes	Resveratrol
C6- C3- C6	Flavonoïdes	Quercétine, catéchine
(C6- C3) n	Lignines	–
(C6- C3- C6) n	Tanins	Procyanidine trimérique

III.3.1. Les composés phénoliques simples

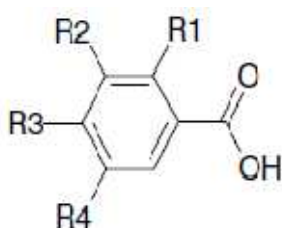
Ce sont des dérivés en C6 du noyau benzénique, rare à l'état naturel et issus de la décarboxylation de l'acide shikimique, on trouve parmi les phénols simples l'hydroquinol, le pyrocatéchol et le phloroglucinol (Chira et al., 2008).

III.3.1.1. Les acides phénoliques

Ils regroupent deux classes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Skerget et al., 2005).

➤ Acide hydroxybenzoïque

C'est une classe très importante, dont la structure de base est de C6-C3 (**Figure 07**), dérivée de celle de l'acide cinnamique (**Macheix et al., 2005**). Ces molécules ont une réactivité chimique grâce aux modifications du cycle benzénique, dont la molécule de base est appelée phényle propanoïde (l'acide caféique, p-coumarique, férulique et sinapique) qui sont produits par des séries d'hydroxylation et de méthylation (**Chira et al., 2008**).

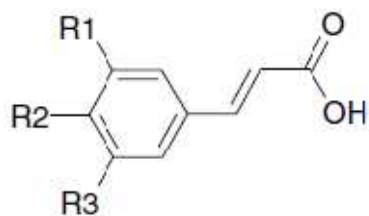


Acide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Acide benzoïque	H	H	H	H
Acide protocatechique	H	OH	OH	H
Acide gallique	H	OH	OH	OH
Acide salicylique	OH	H	H	H
Acide gentistique	OH	H	H	OH

Figure 07 : Principales structures d'acides hydroxybenzoïques (**Laguerre et al., 2007**).

➤ Les acides hydroxycinnamique

C6-C3 représentent la structure de base des dérivés hydroxycinnamiques (acides 4-coumarique, caféique, férulique, sinapique) qui sont très abondants ; les autres sont peu fréquents (acide 2-coumarique) (**figure 08**). C'est une classe très importante largement distribuée dans le règne végétale et se trouvent souvent liés à un glucide sous forme de glucoside ou d'ester (**Richter, 1993**).



Acide hydroxycinnamique	R ₁	R ₂	R ₃
Acide p-coumarique	H	OH	H
Acide cinnamique	H	H	H
Acide caféique	OH	OH	H
Acide férulique	OCH ₃	OH	H
Acide sinapique	OCH ₃	OH	OCH ₃

Figure 08 : Principales structures d'acides hydroxycinnamique (**Laguerre et al., 2007**) .

III.3.2. Les coumarines

Leur nom est tiré de « coumarou » qui est le nom vernaculaire de fève tonka (*Dipteryx odorata Willd*) d'où fut isolée en 1820 la coumarine (**Bruneton, 1999**).

Les coumarines sont des substances phénoliques, formées de l'union du noyau benzénique et α -pyrone (**Kennedy et al., 1997**).

III.3.3. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés polyphénoliques qui ont une structure en C6-C2-C6, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène, ils sont produits par les plantes en réponse à des attaques, fongiques, bactériennes ou virales (**Chira et al., 2008**).

III.3.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (du latin flavus, jaune) sont des substances généralement colorées répondues chez les végétaux, on les trouve dissoutes dans la vacuole à l'état lié aux hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, et dans les chromoplastes (**Guingard, 1996**). Ce sont des composés naturels qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'être humain (**figure 09**). Ils constituent des pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. La classe des flavonoïdes appartient à la famille des polyphénols ayant un rôle de métabolites secondaires chez les plantes. C'est l'une des plus abondantes, à ce jour, plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (**Harborne, 1989 ; Havsteen, 2002**).

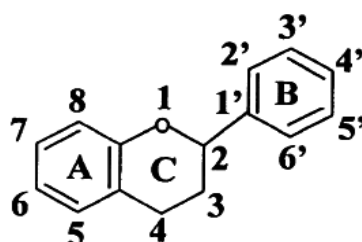


Figure 09 : Structure de base des flavonoïdes (**Heim et al., 2002**).

Selon le degré d'oxydation du noyau pyranique, les flavonoïdes sont classés sur la base du nombre, de la position et de la nature des substituants (groupements hydroxyles OH et méthoxyles OCH₃ principalement), sur la base des deux cycles aromatiques A et B et sur celle de la chaîne de carbone intermédiaire. Ils ont donc en commun une même structure, dont les

multiples substitutions permettent de les diviser en plusieurs classes : flavones, flavonols, flavanones, isoflavanones, anthocyanidines et flavonols (**Ouarkoub et al., 2008**).

III.3.2. Polyphénols complexes

Les formes condensés ou complexes des composés phénoliques sont représentées par les tanins.

III.3.2.1. Tannins

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

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

Les tannins hydrolysables

Se sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre qui est généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acide- phénol qui est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation exemple(acide chébulique=DHHDP) dans le cas des tanins classiques sont improprement dénommés tanins ellagiques(ellagitanins) (**Figure 10**) (**Khanbabaee et Van Tee, 2001 ; Derbel et Ghedira, 2005**).

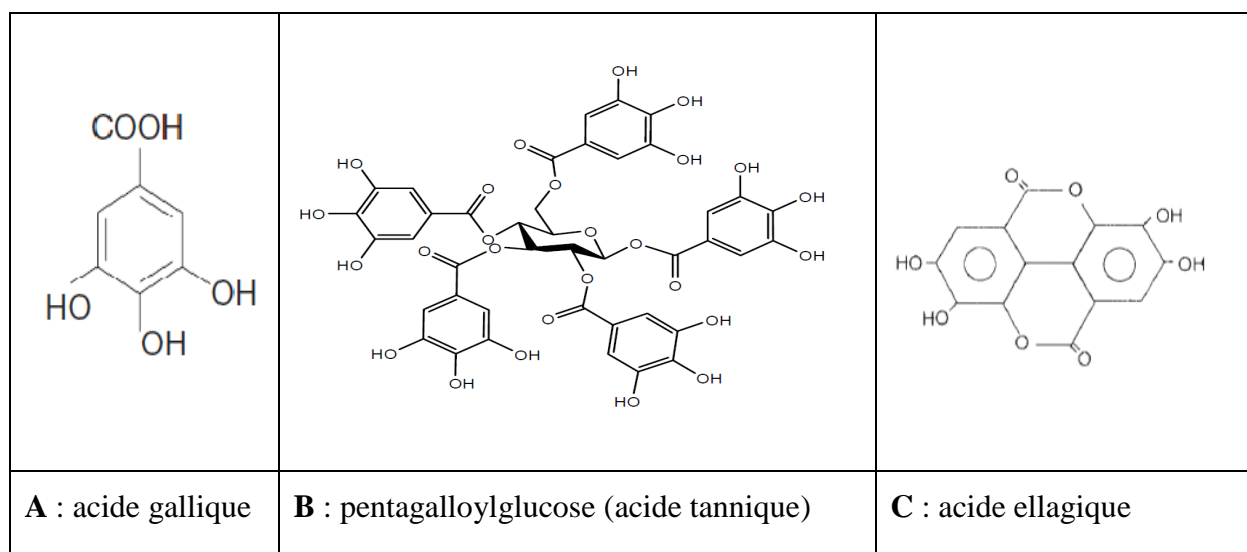


Figure 10 : Structure de l'acide gallique (A), d'un exemple de tannins hydrolysable (B) et de l'acide ellagique (C) (**Derbel et Ghedira, 2005**).

➤ **Les tannins condensés**

Les tanins condensés ou pro-anthocyanidines sont principalement des polymères et oligomères non hydrolysables de « Flavan -3- ols » (**Figure 11**), Les tanins condensés ne sont pas hydrolysables mais peuvent être oxydés par des acides forts libérant des anthocyanidines (**Macheix et al., 2006**).

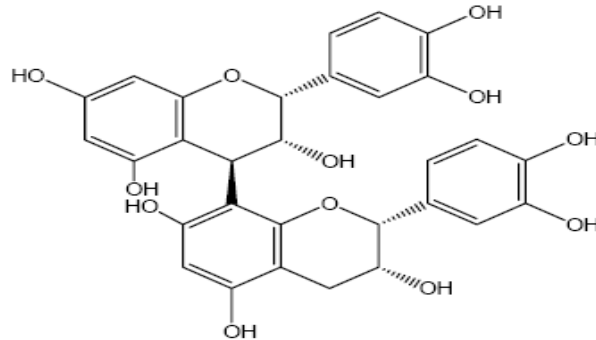


Figure 11 : Exemple de tanins condensés (**Nicholson et Vermerris, 2006**).

Chapitre III

*Mécanisme d'inhibition de
la peroxydation des lipides
par les antioxydants*

III. Mécanismes d'inhibition de la peroxydation lipidiques

Les antioxydants susceptibles de protéger les lipides de l'oxydation peuvent être répartis en deux types (**Buettner, 1999**).

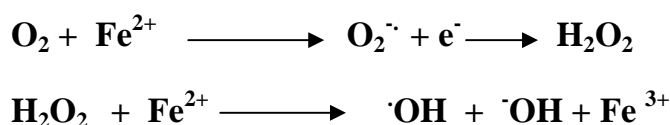
III.1. Les antioxydants préventifs

Il s'agit des antioxydants qui empêchent la formation d'ERO ou interceptent les espèces responsables de l'initiation de la lipoperoxydation.

III.1.2. Mécanismes d'action des antioxydants préventifs

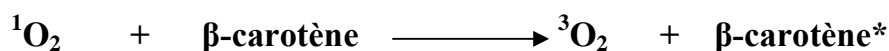
- **Les chélateurs des métaux de transition**

Comme le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^{2+}) sont impliqués dans la génération de radicaux libres (voir les réactions ci-dessous). Ces chélateurs forment des complexes ou des composés de coordination avec ces métaux. Ils inhibent ainsi le cycle redox du métal ou forment des complexes métalliques insolubles (**Muggli, 1993**). Les flavonoïdes sont des bons chélateurs du fer ce qui est un des mécanismes de leur activité antioxydante (**Durackova, 2008**).



- **Les désactivateurs (quencher) de l'oxygène singulet**

Ils peuvent agir par désactivation chimique en se fixant sur une molécule telle qu'un acide gras pour donner un hydroperoxyde ou encore par désactivation physique éliminant l'énergie d'excitation sans provoquer un changement chimique, exemple du β -carotène (voire la réaction suivante) (**Cillard et Cillard, 2006**).



- **L'élimination des hydroperoxydes**

Les hydroperoxydes peuvent être réduits par des enzymes. La glutathion peroxydase (GPx) élimine les hydroperoxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène à faible concentration.

Elle élimine également les peroxynitrite (ONOO^{\cdot}) qui sont des oxydants très puissants (**Florians et al., 2001**).

- **Les piègeurs d'oxygène**

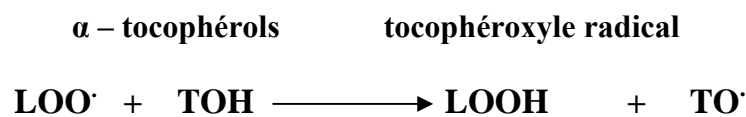
Ce sont des molécules telles que les sulfites ou l'acide ascorbique (Cillard et Cillard, 2006).

III.2. Les antioxydants « chain breaking »

Le qualificatif de « chain breaking antioxidant sacrificial » concerne des molécules, elle-même radicalaire qui réagissent le plus souvent avec les radicaux peroxydes ou alcoxydes, pour donner des produits non radicalaires interrompant ainsi la réaction de propagation de la peroxydation (Cillard et Cillard, 2006 ; Laguerre et al., 2007). Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes :

- **Les donneurs d'hydrogène**

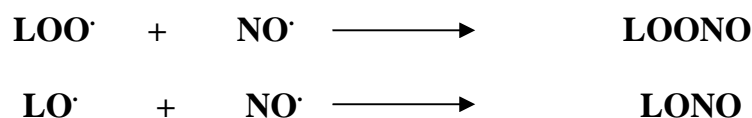
Sont principalement des composés phénoliques mono- ou polyhydroxylés (tocophérols, tocotriénols, flavonoïdes ...) avec diverses substitutions sur les noyaux. Après la réaction d'oxydation, l'antioxydant est transformé en un radical qui doit être suffisamment stable pour inhiber la formation d'un autre radical et arrêter ainsi la propagation de la chaîne radicalaire. Il doit ensuite évoluer vers un produit d'oxydation stable, ce qui conduit à la consommation de l'antioxydant (Cillard et Cillard, 2006 ; Halliwell, 1995). Le tocophérol donnera un radical tocophéroxyle qui évoluera vers un composé d'oxydation non radicalaire tel que la tocophérylquinone ou un composé de dimérisation ou de polymérisation supérieure (Cillard et Cillard, 2006 ; Laguerre et al., 2007). La réaction suivante montre le mécanisme d'action de tocophérol :



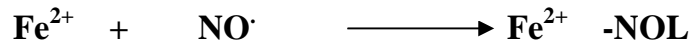
- **Les antioxydants « sacrifiés » :**

Deux radicaux sont connus pour se combiner avec les radicaux peroxydes. Le monoxyde d'azote (NO) et l'anion superoxyde (O_2^\bullet).

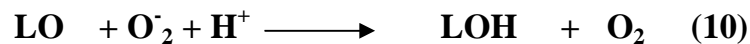
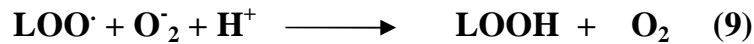
Le NO réagit avec les radicaux peroxydes et alcoxydes pour donner des composés d'addition non radicalaires (voire les réactions suivantes).



NO peut aussi agir comme antioxydant préventif en formant des complexes inactifs avec le fer hémique et le fer de bas poids moléculaire (Sergent et al., 1997).



L'anion superoxyde peut aussi interrompre la propagation de la peroxydation en réagissant avec les radicaux peroxydes (réaction 9) et alcoxydes (réaction 10) (Nelson et al., 1994).



III. 3. Mécanismes d'action

De nombreux antioxydants ont des modes d'action mixtes ce qui complique leur classification. Deux exemples peuvent illustrer ces mécanismes multiples :

III. 3.1. L'acide ascorbique : est une espèce chimique hydrosoluble. Il s'agit d'un antioxydant particulièrement efficace contre les dommages créés dans l'organisme par les RL. Elle empêche l'oxydation des LDL produit par divers systèmes générateurs des ERO et réduit la vitamine E oxydée et la régénère sous sa forme antioxydant active (Sorg, 2004).

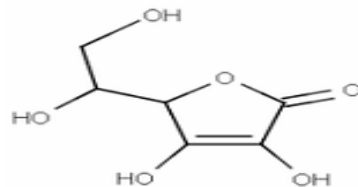


Figure 12: Structure chimique de la vitamine C.

III.3.2. Les flavonoïdes : tels que les anthocyanines, les catéchines, les flavones, les flavonols, les isoflavones et les proanthocyanidines sont chélateurs de métaux, piègeurs d'anions superoxyde et donneurs d'hydrogène (Cillard et Cillard, 2006).

d'après Halliwell (Halliwell, 2000), les mécanismes de l'action d'un flavonoïde peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ROS
- L'inhibition des enzymes pro-oxydant
- La chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS

- La protection des systèmes de défense antioxydants.

➤ **Piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène**

C'est le plus prédominant des mécanismes antioxydants, s'effectuant par donation d'atomes d'hydrogène et la formation d'une liaison intra moléculaire ou par un transfert d'électron (délocalisation d'électrons) (Kim et al., 2005). Les flavonoïdes sont dotés d'une forte capacité à piéger les radicaux libres (figure 13), cela est probablement lié aux groupements phénoliques hydroxyles attachés aux structures cycliques (Wattele et al, 2002). En plus, la présence des groupements catéchols dans le cycle B (dihydroxylé) confère aux flavonoïdes la capacité de donner un atome d'hydrogène ou un électron afin de stabiliser le radical (Ghedira, 2005).

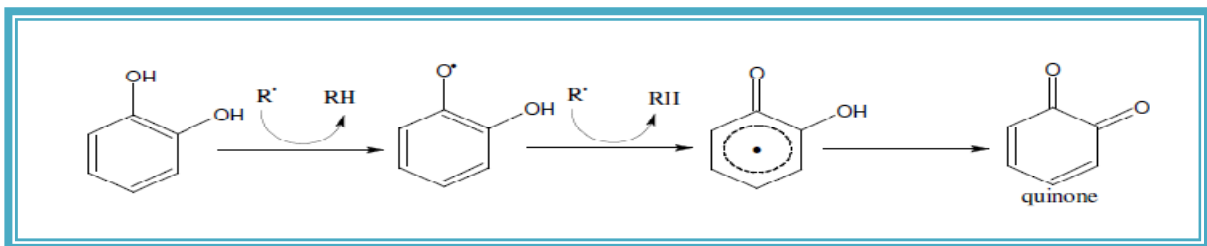
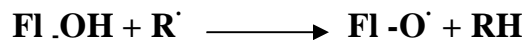


Figure 13 : Piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

Où R^\cdot : représente l'anion superoxyde, le peroxyde ou l'anion péroxynitrite.

Selon plusieurs auteurs (Pietta, 2000 ; Amié et al., 2003 ;ect).

Il existe une relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leurs capacités à piéger les radicaux libres (figure 14).

-La structure ortho-diphénolique du cycle (B), celle-ci est essentielle à l'activité des flavonoïdes présentant un hétérocycle saturé

-Une double liaison entre C_2 - C_3 conjuguée avec la fonction 4-oxo, qui est responsable de la délocalisation des électrons et de la stabilisation du radical aroxyyl formé

-des groupements hydroxyles en position 3 et 5 permettant une activité anti-radicalaire maximale.

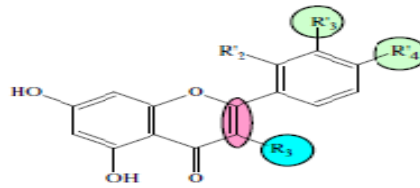


Figure 14 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydant des flavonoïdes (Marfak, 2003).

➤ **Inhibition enzymatique**

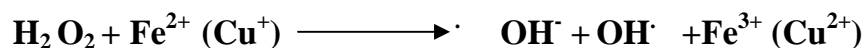
La xanthine oxydase est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde lors de l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique (Pietta, 2000 ; Nijveldt *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (Hanasaki, 1994).

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont aussi des bons inhibiteurs d'autres enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Nijveldt *et al.*, 2005).

➤ **Chélation des ions métalliques**

Les ions de fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, Cu et Zn pour le superoxyde dismutase) (Cotelle, 2001). Ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton (Cotelle, 2001 ; Ghedira, 2005).



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques et d'après les études réalisées par Van Acker et ses collaborateurs (1996), ils ont constaté que la quercétine est la plus active des flavonoïdes grâce aux 3 sites qu'elle possède et qui lui permet de chélater les métaux.

Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont (voir la figure 15):

- le noyau catéchol sur le cycle B
- les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C
- les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C

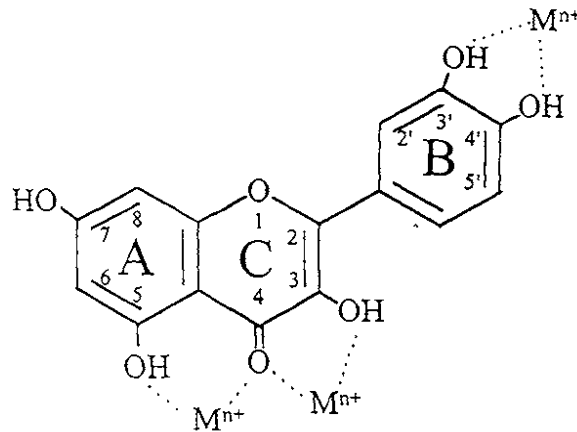


Figure 15 : Sites proposés pour la chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Rice-Evans, 2001).

III.4. La relation entre la structure et l'activité des flavonoïdes dans l'inhibition de la peroxydation lipidiques

L'inhibition de la peroxydation lipidiques est influencée par un certains nombres de caractéristiques structurales des flavonoïdes.

- 1) La présence d'un groupe hydroxyle en position trois (3-OH) du cycle C (Ratty et Das, 1988).
- 2) La double liaison entre le carbone deux et trois (C2-C3) du cycle C, l'hydrogénation de cette liaison diminue l'effets antiperoxydative (Cholbi et al., 1991 ; Morel et al., 1993).
- 3) Le groupement carbonyle en C4 du cycle C est nécessaire pour l'activité antiperoxydante (Ben ammar et al., 2009).
- 4) La présence d'une fraction sucre (Fraga et al., 1987). La fraction sucre réduit l'efficacité antiperoxydative des groupements hydroxyles adjacents due à des encombrements stérique (Cook et Samman, 1996).
- 5) Les groupements méthoxyles réduisent l'efficacité antiperoxydative des flavonoides in vitro en raison d'un encombrement stériques (Cook et Samman, 1996).

6) Le modèle de l'hydroxylation (Cholbi et al., 1991).

- Les groupements hydroxyles sur les positions C5 et C7 du cycle A (**De whalley et al., 1990**). C3 et C4 du cycle B et la position C3 du cycle C semblent contribuer un rôle dans l'inhibition de la peroxydation lipidiques (**Fraga et al., 1987**).



Partie

Pratique

Chapitre I
Matériels et
méthodes

I.1. Matériel végétal

I.1.1. Description

Notre étude a été réalisée sur l'écorce d'une plante largement utilisée en médecine traditionnelle locale il s'agit de *Fraxinus angustifolia* (figure 16).

C'est un arbre élevé majestueux qui peut atteindre 20 mètres de longueur, l'écorce d'un beau gris, ses feuilles sont de 7 à 13 folioles (**Bernard, 1997**). Le tableau II ci-dessous cite quelques caractéristiques de *Fraxinus angustifolia*



Figure 16 : Photographie d'écorces de *Fraxinus angustifolia*.(Original).

Tableau II : Quelques informations sur *Fraxinus angustifolia* (**Baba aissa, 1999**).

Nom scientifique	Partie utilisée	Nom local	Localisation
<i>Fraxinus angustifolia</i> (famille des Oléacées)	écorces	Aslène, Sella, Derdar	Espèce euro-méridionale, commune dans les régions humides de toute l'Algérie septentrionale

I.1.2. Propriétés et usage

Fraxinus angustifolia est une plante largement utilisée dans le traitement des maladies à caractère inflammatoire elle est aussi utilisée comme diurétique et laxatif (Baba aissa, 1999).

I.1.3. Composition chimique

L'écorce de *Fraxinus angustifolia* contient des tannins, résines, glucosides, sucres, sels minéraux, la vitamine C, flavonoïdes, etc (Kostova et al., 2007).

I.1.4. Préparation du matériel végétal

I.1.4.1. Récolte

L'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été récoltée en juillet 2011, dans un endroit loin de la pollution dans la forêt d'Azru n' Bechar, commune d'Amizour située à l'est de Bejaia.

I.1.4.2. Broyage et tamisage

L'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été séchée à température ambiante dans un endroit ombragé et aéré, elle a été ensuite broyée à l'aide d'un broyeur électrique (Kika Labortechnik M20) et tamisée jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de diamètre inférieure à 63µm.

I.1.4.3. Extraction

Dans le but de pouvoir séparer et fractionner les composés phénoliques en diverses catégories d'extraits polaires et organiques, une extraction sélective à plusieurs solvants a été entreprise selon le protocole de Chiang et al., (1994) avec quelques modifications (figure17).

La poudre fine de la plante (100g) a été macérée dans l'éthanol à 95% pendant 24 heures avec un rapport de 4,0 ml pour 1,0g de la poudre végétale. Après décantation de la solution éthanolique, une centrifugation pendant 10 minutes à une vitesse de 1500 tours /min a été effectuée.

Le surnageant a été versé dans des cristallisoirs, et séché à l'air libre. Après l'évaporation totale, la pesée de l'extrait a été prise jusqu'à stabilisation du poids sec.

La deuxième étape consiste en une partition de l'extrait éthanolique dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'eau suivant les rapport 1:3:1 (p/v/v). Après 12 heures de macération, la décantation subséquente a donné naissance à deux phases distinctes, organique et aqueuse. Les deux phases ont été récupérées, séchées séparément et pesées. L'extrait organique (acétate d'éthyle) est mise dans un mélange (chloroforme-eau), avec un rapport (3:1) (v/v).

Après 12 heures de macération, les deux phases résultantes ont été séparées et mises à sécher jusqu'à évaporation totale du solvant. Le taux d'extraction a été évalué comme suit :

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

P_1 : Poids d'extrait après évaporation (g).

P_0 : 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).

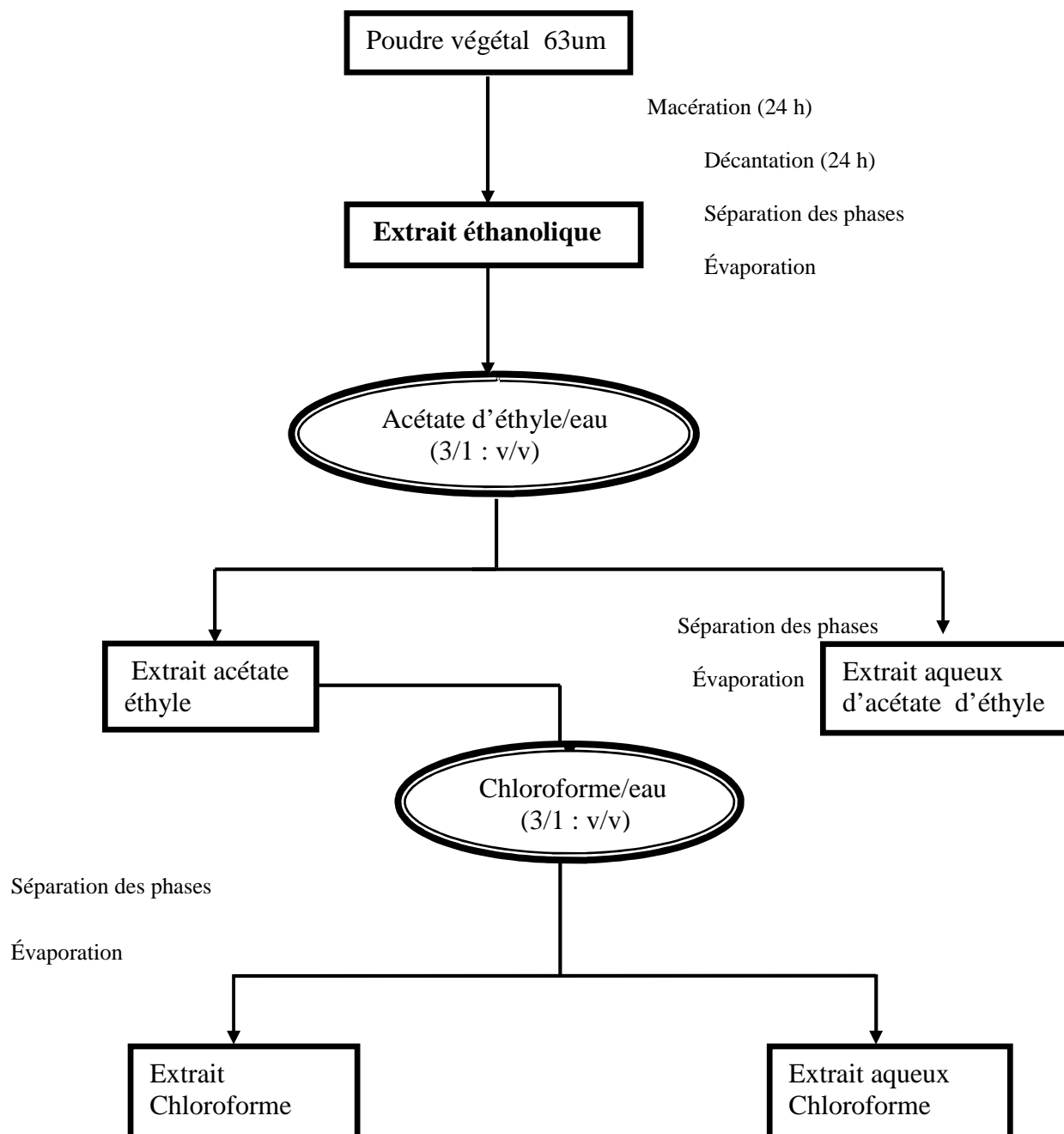


Figure 17 : Protocole d'extraction (Chiang et al., 1994).

I.2. Matériel animal

Les souris utilisées dans cette expérimentation sont des souris mâles et femelles adultes de souche Albinos, pesant entre 21 et 27 g (au début de l'expérimentation) et provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Avant toute expérimentation, elles ont été soumises à une période d'adaptation aux conditions d'élevage du laboratoire pendant une semaine : cycle contrôlé de lumière/ obscurité (12h/12h), température ambiante maintenue $22C^{\circ} \pm 1C^{\circ}$, et avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Les souris mâles et femelles ont été séparées en lots de $n= 5$.

II. Etude, *in vivo*, de l'activité antioxydant de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

L'extrait aqueux de l'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été choisi pour ce test vu que ses activités antioxydantes en général et son activité contre la peroxydation lipidique de l'acide linoléique en particulier testées *in vitro* ont été assez élevées. La peroxydation lipidique du α -tocophérol comme molécule de référence a été aussi évaluée.

II.1. Plan de l'expérience

L'induction de la peroxydation lipidique par le CCl_4 a été effectuée suivant le procédé de Naskar *et al.* (2010).

Après une semaine d'adaptation, les souris ont été divisées en quatre groupes ($n=5$). L'extrait et l' α -tocophérol ainsi que le CCl_4 et l'eau physiologique ont été administrées aux souris par voie orale (intragastrique) pendant une période de 7 jours; le volume administré a été de 0,3 ml. Les souris ont été sacrifiées le huitième jour.

Groupe I : contrôle négatif

1ere administration : eau physiologique

2ème administration : eau distillée + paraffine

Groupe II : contrôle positif

1ere administration : eau physiologique

2ème administration : CCl_4 : paraffine (1v :2v) avec une concentration de 1ml/kg.

Groupe III : Standard

1ere administration : 0,3 ml de α tocophérol (50mg/kg)

2^{ème} administration : CCl₄ : paraffine (1v :2v) 1ml/kg.

Groupe IV : expérimental

1^{ere} administration : 0,3 ml de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* (50mg/kg)

2^{ème} administration : CCl₄ : paraffine (1v :2v) 1ml/kg.

Les groupes II-IV ont reçu CCl₄ : paraffine (1v :2v) une fois chaque 72 h et entre la première administration et la deuxième il y a un intervalle de 2 heures.

II.2. Test de l'acide thiobarbiturique (TBA)

Le principe de la réaction est d'évaluer le taux des malondialdéhydes (MDA) qui est l'un des produits terminaux de la peroxydation lipidique. L'acide thiobarbiturique (TBA) forme un complexe de couleur rose avec le MDA ayant un maximum d'absorbance à 535nm. La méthode adoptée dans notre travail est celle de **Harish et Shivanandappa (2006)** modifiée.

Après 24heures du dernier traitement les animaux sont anesthésiés et sacrifiés. Le foie est excisé, lavé avec de l'eau physiologique froide, et homogénéisés de façon manuelle. Ensuite, il est mis dans un tampon phosphate glacé (0.1M, pH7.2) avec une proportion de 10% (p/v). Après centrifugation à 3000g à 4°C pendant 10 min, 1ml du surnageant est additionnée à 2 ml TCA-TBA (TBA 0.67% dissous dans 20% TCA), puis un chauffage est réalisé à 100°C et pendant 15 min à la suite duquel on mesure l'absorbance à 535 nm.

Le taux de MDA est exprimé en nmoles/mg de protéines en utilisant le coefficient d'extinction du [complexe MDA-TBA de $1,56 \times 10^5$]. Le taux de protéines dans chaque homogénat de foie a été déterminé selon la méthode de **Bradford (1976)**.

II.3. Le dosage de la bilirubine totale

La bilirubine totale a été déterminée comme un indice de lésion du foie. Ce test a été réalisé en utilisant un kit commercial.

II.4. Corrélations

Le poids des souris à été suivi durant l'expérience, une pesée du poids a été effectuée le premier jour de l'expérience, le troisième, ainsi que le dernier jour avant le sacrifice afin d'établir si il existe une corrélation entre les poids des souris et le taux de MDA.

II.5. poids relatifs des foies

Afin de vérifier si la peroxydation lipidique n'a pas causé une inflammation ou une nécrose, les foies de toutes les souris ont été pesés et les poids relatifs ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Poids relatifs} = \text{poids du foie} / \text{poids de la souris}$$

II.6. Analyse statistique

Les résultats des tests effectués *in vivo* sont exprimés en moyenne \pm SEM. L'analyse de la variance d'essai (ANOVA) nous a permis de comparer entre les moyennes des différents tests avec $p < 0.05$ considérée statistiquement significative.

Chapitre II
Résultats et
discussions

II. 1. Taux d'extraction

Il a été établi que l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques à partir du matériel végétal dépend de plusieurs facteurs : la structure chimique, le temps de macération, la température et la nature du solvant (**Ribéreau-Gayon, 1968**). D'autres chercheurs ont confirmé que les taux d'extraction des métabolites secondaires tels que les composés phénoliques sont influencés par le type de solvant, le rapport solide-liquide, la granulométrie de la poudre végétale, le nombre d'extractions, la température et le pH du milieu etc. (**Nazck et Shahidi, 2004 ; Falleh et al., 2008**).

En effet l'éthanol, le solvant le plus utilisé pour l'extraction, est considéré comme étant le meilleur solvant pour extraire le maximum de composés phénoliques. D'autre part il est moins altérant que le méthanol, qui peut exercer un effet de méthanolyse sur les tannins (**Bruneton, 1999**).

Aussi, pour extraire le maximum de composés phénoliques, nous avons utilisé une poudre très fine d'un diamètre inférieur ou égale 63 μ m et cela pour augmenter la surface d'échange entre le solvant et la poudre utilisé (**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.

Les taux d'extraction de l'écorce de *F. angustifolia* est représenté dans le tableau III.

Tableau III : Taux d'extraction d'extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

Extrait	Ecorce de <i>Fraxinus angustifolia</i>
Ethanol	5.77%
Acétate d'éthyle	36.54%
Aqueux acétate d'éthyle	50%
Chloroforme	52.34%
Aqueux chloroforme	10.06%

Dans la première étape, un taux d'extraction faible a été obtenu par rapport à la poudre initiale pour l'extrait éthanolique avec 5,77%. Dans la deuxième étape d'extraction on a remarqué un taux élevé (50 %) pour l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle par rapport à la phase organique correspondante (36,54 %), ce qui suggère que la phase aqueuse de cette étape est riche en composés hydrosolubles. Cependant, la troisième étape (chloroforme/eau) a donné un taux très faible qui est de 10,06% dans la phase aqueuse comparé à la phase organique qui présente un taux beaucoup plus élevé (52,34%). Ceci pourrait être expliqué par la structure chimique des composés extraits qui ne sont pas solubles dans la phase aqueuse issue du chloroforme. Ainsi, le degré de polymérisation et la richesse de la plante en composés apolaires ou peu polaires peuvent être considérés comme la cause de cette mauvaise solubilité (Naczk et Shahidi, 2004).

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

II.2. Test de TBA

Le foie est l'un des organes essentiels dans notre corps, il joue un rôle important en réglant diverses fonctions physiochimiques, y compris la synthèse, la sécrétion et le métabolisme des xenobiotiques. Les dommages du parenchyme hépatique peuvent être délétères à ces fonctions physiochimiques (Wolf, 1999). Beaucoup de facteurs étiologiques peuvent induire un tel dommage, y compris les agents infectieux et les produits chimiques hépatotoxiques. Le tétrachlorure de carbone (CCl_4) est l'une des hépatotoxines les plus utilisées généralement pour induire le dommage du foie dans des études *in vivo* (Johnston et Kroening, 1998).

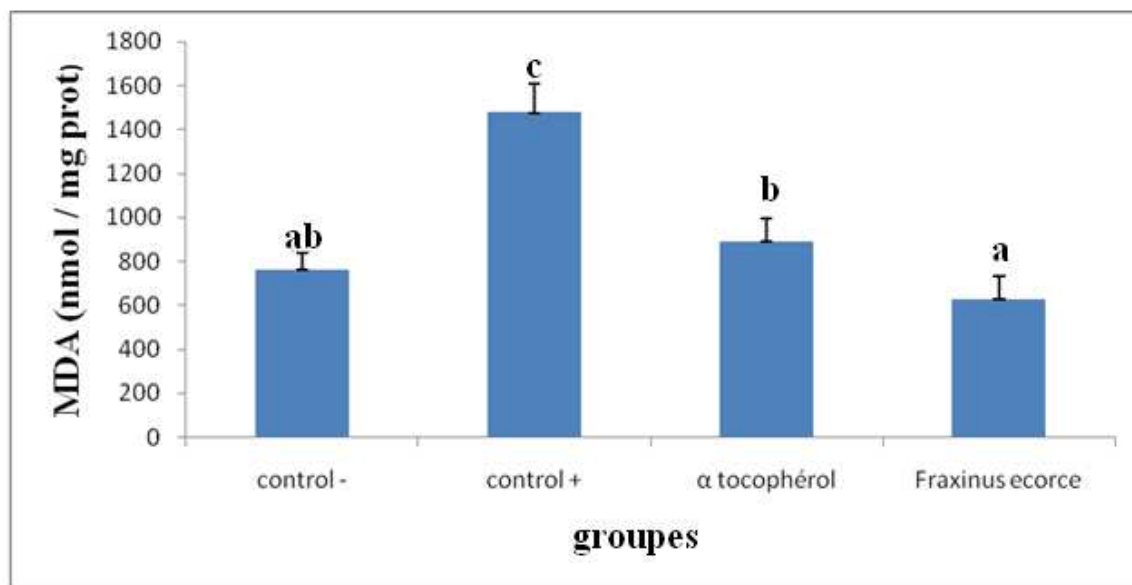


Figure 18 : taux de MDA dans les foies de souris traitées ou non par le CCl₄

Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 4-5) : control- (eau physiologique 1ml/kg) ; control + (CCl₄ 1ml/kg) ; α tocophérol (standard 50mg/kg) ; Fraxinus écorce (aqueux d'acétate d'éthyle 50 mg/kg)].

La présente étude a pour but de tester les effets hepatoprotecteurs et antioxydants de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* contre les dommages du foie induite par le CCl₄ chez les souris.

Le CCl₄ est connu pour induire l'hépatotoxicité (Johnston et Kroening, 1998). Ce dernier est métabolisé par le cytochrome P450 en trichlorométhyl (CCl₃•), il s'agit d'un radical libre qui cause l'alkylation des protéines cellulaires et d'autres macromolécules avec une attaque simultanée sur les acides gras polyinsaturés, en présence de l'oxygène, pour produire des peroxydes, menant à des lésions du foie (Zeashan et al., 2008 ; Peng et al., 2010).

Les résultats montrés dans la figure 18 indiquent que la peroxydation des lipides a augmenté dans le groupe du control positif qui correspond au lot qui a reçu le CCl₄ seul, cela est révélé par les niveaux élevés de MDA (1477,2 nmol/mg de protéine), en comparaison avec le groupe du control négatif (763,1 nmol/mg de protéine) qui correspond à notre témoin. Le traitement avec l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de *F. angustifolia* à une concentration de 50mg/kg avant l'administration du CCl₄ a réduit de manière significative les niveaux de MDA (631,4 nmol/mg de protéine) par contre le prétraitement des souris avec l' α -tocophérol (50

mg/kg) a diminué de façon importante le taux de MDA (891,9 nmol/mg de protéine) mais de façon moins efficace que l'extrait testé (voir fig. 18).

La peroxydation des lipides est un paramètre important du stress oxydant. L'augmentation des niveaux des MDA induits par le CCl₄ dans le foie suggère la présence d'un niveau élevé de peroxydation lipidique, menant à des dommages du tissu hépatique et une diminution des mécanismes de défense antioxydants (**Vuda et al., 2011**).

L'activité scavenging des radicaux libres est l'un des mécanismes antioxydants majeurs qui empêche la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides. Dans la présente étude, le traitement avec l'extrait aqueux de *F. angustifolia* a réduit la peroxydation des lipides en diminuant les niveaux de MDA, suggérant que les constituants de cet extrait possède une activité scavenging qui neutralisent les radicaux libres produits par le CCl₄. En effet, une étude *in vitro* par Atmani et collègues (2009) qui a testé l'activité antioxydante de l'écorce de *F. angustifolia* contre le DPPH (2,2-diphényl-1 - picrylhydrazyl), le H₂O₂, et la peroxydation de l'acide linoléique a démontré que l'extrait aqueux de *F. angustifolia* a été très efficace (90.29± 0.29 ; 33.83 et 51.05%) (**Atmani et al., 2009**). En effet, la présente étude a confirmé l'effet inhibiteur contre la peroxydation lipidique *in vivo* qui a déjà été prouvée *in vitro* (93%) par l'étude mentionnée ci-dessus.

Le potentiel hépatoprotecteur de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* s'est avéré plus prometteur que celui d'autres plantes testées dans des conditions similaires. En effet, Gupta et ses collaborateurs (2011) qui ont testé l'activité hépatoprotectrice du fruit de *Solanum xanthocarpum* à plusieurs concentrations (100, 200, 400mg/kg) ont trouvé que l'activité anti-LPO est dose-dépendante, la meilleur est observée avec une concentration de 400mg/kg.

La prévention de la LPO est probablement liée à la structure et la quantité de polyphénols dans la plante. En effet, le dosage des polyphénols totaux par Atmani et al. (2009) a démontré la richesse de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* en phénols totaux et en tannins respectivement par rapport aux autres extraits. Ces derniers pourraient contribuer aux activités hépatoprotectrices et antioxydantes de l'écorce de *F. angustifolia*.

Harish et Shivanandappa (2006) ont réalisé des travaux sur l'activité antioxydant et hépatoprotectrice des extraits méthanolique et aqueux des feuilles et des fruits de *Phyllanthus niruri* à 100mg/kg contre les dommages induits par le CCl₄ dans le foie des rats. Les résultats obtenus ont montré l'efficacité de cette plante contre la peroxydation

lipidique où une diminution du taux de MDA est observé au niveau des groupes pré-traités par les extraits; l'extrait méthanolique a réduit le taux de MDA de 6nmol/mg (correspond au tau observé au niveau du groupe traité que par le CCl₄) à 4,5nmol/mg du tissu et l'extrait aqueux a été le plus efficace avec une diminution qui atteint 3nmol/mg du tissu.

Ces résultats sont comparables aux résultats obtenus dans cette présente étude où l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle a diminué de façon significative le taux de MDA et par conséquence inhibé la peroxydation lipidique.

En conclusion, cette étude a prouvé que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a diminué le taux de MDA donc il a inhibé la peroxydation lipidique suggérant qu'il possède des capacités hépatoprotectrices, et antioxydants chez les souris traitées par le CCl₄. Ces résultats méritent d'être approfondies en explorant d'autres facteurs affectés par la peroxydation lipidique tels que les enzymes du foie comme les transaminases et les enzymes antioxydantes comme la catalase et la superoxyde dismutase ainsi que des analyses histopathologiques.

II.3.Le dosage de la bilirubine

Le tableau IV montre le taux de bilirubine mesuré chez tous les groupes de souris comme indice de lésions hépatiques. En effet, la comparaison du groupe de souris traitées avec le CCl₄ avec celui du témoin qui représente la normale révèle qu'il y a une augmentation significative dans le taux de la bilirubine.

Tableau IV : dosage de la bilirubine dans les différents groupes

Test	C-	C+	st	extrait
Moyenne de bilirubine totale	0,095	0,467±0.007	0,846±0.145	0,92±0.088

Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n = 4-5). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe témoin ; p≤0.05

Groupes : [control- (eau physiologique 1ml/kg) ; control + (CCl₄ 1ml /kg) ; α tocophérol (groupe standard α tocophérol 50mg/kg) ; *Fraxinus angustifolia* (l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle 50 mg/kg)

Cependant, après le traitement avec l' α -tocophérol on a noté une augmentation du taux de la bilirubine qui a même dépassé significativement ($p < 0,05$) celui du contrôle positif. La même observation est valable dans le cas de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de *F. angustifolia*, qui a provoqué une plus grande élévation de la bilirubine totale par rapport au standard et au contrôle positif.

La bilirubine est considérée comme un membre de la famille des antioxydants, spécifiquement contre les radicaux peroxydes. Dans le plasma, elle peut agir en synergie avec la vitamine E pour protéger les membranes contre la peroxydation lipidique, *in vivo* elle agit comme un piègeur efficace des ROS et joue un rôle physiologique principal dans la cytoprotection contre des dommages oxydatifs (Annabi et al., 2007).

Dans ce travail, on a remarqué que le taux de la bilirubine est augmenté dans le groupe de souris qui n'ont reçu que le CCl₄. Cela confirme l'élévation de la peroxydation des lipides trouvée ci-dessus (augmentation des MDA) dans ce groupe. Comme le taux de la bilirubine reflète le niveau de dommages au tissu hépatique et le manque des mécanismes de défense antioxydants, on peut assumer que les foies de ces souris sont touchés par des lésions hépatiques (Vudaa et al., 2011 ; Amresh et al., 2007).

Cependant, en ce qui concerne le standard et l'extrait de *Fraxinus angustifolia*, bien que ces deux aient donné un effet inhibiteur de la peroxydation lipidique, les taux de bilirubine chez les souris des groupes III et IV ont subi une hausse accrue.

Ces résultats sont en accord avec un rapport publié par (Joshi et al., 1995), qui a démontré que l' α tocophérol cause l'augmentation de la bilirubine 3 jours après le traitement avec le CCl₄ suivie par une diminution 7 jours après. Ceci nous amène à supposer que le standard α -tocophérol n'a pas eu le temps pour agir puisque la dernière administration du CCl₄ a été 24h avant le sacrifice. Une autre supposition se basant sur la même étude est que ce standard a activé les enzymes de défense endogènes tel que la SOD qui a empêché à son tour la dégradation de la bilirubine.

D'autre part, il a été démontré que la vitamine C est l'antioxydant le plus efficace dans le plasma, son influence sur la bilirubine a été étudiée par l'injection des doses de vitamine C pendant 3 jours. Ceci n'a causé aucun changement crucial de la bilirubine. Après avoir augmenté les doses de cette vitamine, le taux de la bilirubine a été augmenté significativement ; Comme l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est très riche en vitamine C

d'après **Baba (1999)**, donc l'élévation de la bilirubine pourrait être due à la richesse en acide ascorbique dans l'extrait.

Une étude menée par **Brown et al., (1990)** a démontré que certains polyphénols cause l'hémolyse des globules rouges. L'hème produit est catabolisé par l'hème oxygénase en biliverdine, fer et monoxyde de carbone. La biliverdine est immédiatement réduite en bilirubine par la biliverdine réductase, ce qui explique aussi l'augmentation de la bilirubine dans le sang des souris prétraitée avec l'extrait.

II.4. Corrélations

II.4.1. Corrélacion entre le poids des souris du control - et le taux de MDA

Le coefficient de corrélation entre le poids des souris et le taux de MDA (annexe 2) est ($r = - 0,90$), suggérant qu'il y a une corrélation négative entre les deux facteurs et menant à la suggestion la peroxydation lipidique est d'autant plus élevée que la souris est petite.

II.4.2. Corrélacion entre le poids des souris du control + et le taux de MDA

Le coefficient de corrélation est de ($r = 0,35$), dans ce cas il n'y a pas de corrélation entre le poids des souris et le taux de MDA, suggérant que le CCl_4 a perturbé le métabolisme des souris et donc l'équilibre de la peroxydation lipidique et le poids observé chez les souris du contrôle négatif.

II.4.3. Corrélacion entre le poids des souris du standard et le taux de MDA

Le coefficient de corrélation entre le poids des souris traitées par l'alpha-tocophérol et le taux de MDA résultant est ($r = - 0,94$), ce résultat montre que une corrélation négative entre le poids et la peroxydation lipidique a été rétabli.

II.4.4. Corrélacion entre le poids des souris traité par l'extrait et le taux de MDA

Le coefficient de corrélation entre le poids des souris traitées par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de *Fraxinus angustifolia* et le taux de MDA résultant est ($r = - 0,80$), suggérant que de même manière que pour le standard l'équilibre entre le poids et la peroxydation lipidique a été rétabli ainsi que le métabolisme normal des souris.

II.5.Poids relatifs

Les foies et les souris ont été pesés et les poids relatifs ont été calculés pour déterminer si le CCl₄ ou la plante n'ont pas provoqué une inflammation ou une nécrose chez les souris traitées.

Tableau V : Poids relatifs des foies

Test	C ⁻	C ⁺	ST	<i>F.angustifolia</i>
poids relatifs*	0,059	0,062	0,066	0,078

Poids relatif *=poids du foie / poids des souris. Les valeurs sont une moyenne de n=5

Le CCl₄ est connu pour son effet néfaste au niveau du foie, engendrant des dommages et une nécrose en phase finale (**Gupta et al., 2011 ; Vuda et al., 2011**). Cependant, d'après les résultats observés au niveau du tableau V, les poids relatifs du control- sont comparables à ceux du control +, et le standard ($p > 0,05$), ce qui suggère l'absence d'inflammation au niveau du foie. Ce résultat peut être expliquée par la courte durée du traitement (7jours), étant donné que la nécrose ou l'inflammation provoquées par le CCl₄ nécessitent une longue durée (**Uzma et al., 2011**).

Cependant, une augmentation significative ($p < 0,05$) au niveau des foies relatifs des souris traitées avec l'extrait est observée ce qui suggère une inflammation des foies des souris probablement causée par l'extrait. Ces données doivent être vérifiées en réalisant des tests de toxicité et d'histopathologie. En effet, des morceaux de foie ont été prélevés pour effectuer des tests histochimique, Les données obtenues dans le test de TBA montrent que cette plante est un fort inhibiteur de la peroxydation lipidique. L'inflammation détectée peut causer la production de radicaux libres qui n'ont pas atteint un niveau élevé pour affecter la peroxydation lipidique. On suppose alors que l'écorce de *Fraxinus angustifolia* peut causer une inflammation du foie comme effet secondaire.

Conclusion

L'écorce de *Fraxinus angustifolia* est en grande partie employée dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter un éventail d'inflammations. Dans cette étude, nous rapportons, pour la première fois, leur activité antioxydant *in vivo*, sachant que cette capacité à été déjà prouvée *in vitro* par **Atmani et al. (2009)**.

Les résultats démontrés dans ce présent travail indiquent que le traitement avec l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* a empêché fortement la peroxydation des lipides, en réduisant les niveau de MDA suggérant que les constituants de cet extrait possèdent une activité scavenging qui neutralisent les radicaux libres produits par le CCl₄. Ces resultats importants nous encouragent à valider l'utilisation de cette plante en medecine traditionnelle.

D'autres études approfondies seraient nécessaires afin d'isoler et identifier les molécules naturelles responsables de cette activité. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- La multiplication du nombre d'essais *in vivo* vis-à-vis de cette plante ;
- L'étude de la cytotoxicité des extraits ;
- L'exploration d'autres facteurs affectés par la peroxydation lipidique telles que les enzymes du foie comme les transaminases et les enzymes antioxydants comme la catalase et le superoxyde dismutase ainsi que des analyses histopathologiques.

*Références
bibliographiques*

- **Amié, D.; Davidovié-Amié, D.; Beslo, D. and Trinajstić, N. (2003).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat. Chem. Acta*, **76** (1): 55–61.
- **Amresh, G.; Kant, R.; Zeashan, H.; Gupta, R J.; Rao, Ch V.; Singh, PN. (2007).** Gastroprotective effects of ethanolic extract from *Cissampelos pareira* in experimental animals. *J Nat Med*; **6**: 323-328.
- **Annabi, A.B.; Nehdi, A.; Hajjaji, N.; Gharbi, N.; El-Fazâa, S. (2007).** Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *C. R. Biologies* **330** : 581–588.
- **Atmani, D.; Chaher, N.; Barboucha, M.; Ayouni, K.;Lounis, H.; Boudaoud, H .; Debbache, N.; Atmani, D. (2009).** Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, **112**: 303-309.
- **Baba aissa F. (1999).** Origan. In« les plantes médicinales en Algérie». *Ed Bouchène et Diwan*, Alger : P 121.
- **Baudin, B. (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Médecine Thérapeutique Cardiologie*, **2** (1): 43-52.
- **Ben Ammara, R. ; Bhourri, W. ; Ben Sghaier, M. ; Boubaker, J. ; Skandrani, I. ; Neffati, A. ; Bouhlel, I. ; Khilani, S. ; Mariote, A-M. ; Chekir-Ghedira, L. ; Dijoux-Franca, M-G. ; and Ghedira, K. (2009).** Antioxydant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, **116**: 258-260.
- **Berger, M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20**: 48–53.
- **Bernard, B . (1997).** Dictionnaire : Plantes et champignons. *Edition ESTEM*, **P**: 190-345.
- **Bradford, M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* **72**, 248 -254.
- **Brito, C.; Naviliat, M.; Adriana, C.; Tiscornia, L.; Vuillier, F.; Gualco, G.; Dighiero, G.; Radi, R. et Cayota, A. M. (1999).** Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite driven apoptotic death. *The American Association of Immunologists*, **162**: 3356-3366.

- **Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK and Goldstein JL, (1980).** The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation. Specificity of binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *I Supramol Struct* ;**13**: 67-81.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. Technique et documentation. Edition, *Lavoisier*, **3**: 286-347.
- **Buettner, G. (1999).** Singlet oxygen toxicity is cell line-dependant: a study of lipid peroxidation in nine leukemia cell lines. *Photochem Photobiol.* **70**: 858-867.
- **Chiang, H. S.; Juilo, Y.; and Lu, F. J. (1994).** Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition*, **8(1)**: 61-71.
- **Chira, K. ; Suh, J.H. ; Saucier, C. and Teissède, P. L. (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **6** : 75-82.
- **Cholbi, M.R., Paya M.,and Alcaraz, M.J (1991).** Inhibitory effects of phenolic compounds on CCL₄ induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia*, **47**: 195-199.
- **Cillard, J. et Cillard, P. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **13(1)** : 24-29.
- **Clausse, F.(2001).** Radicaux libre et molécules à activité antioxydant. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine, Créteil.
- **Comhair, S.A et Erzurum S.C. (2002).** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol.* **283**: 246-255.
- **Cook, N. C and Samman, S. (1996).** flavonoids- chemistry, metabolism cardioprotective effects , and dietary source. *Nutritional biochemistry*, **7**: 69-70.
- **Cossu, C. ; Doyotte, A. ; Jacquin, M.C. ; Babut, M. and Vasseur, P. (1997).** Glutathione reductase, selenium-dependant glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, **38**: 122-131. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de médecine, Créteil, 92p.
- **Cotelle, N. (2001).** Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry.* **1**: 569-590.
- **Cowan M. (1999):** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* **12(4)**: 564-582.

- **Croteau, R.; Kutchan, M. T. and Lewis, G. N. (2000).** Natural products (Secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, *American Society of Plant Physiologists*, **24**: 1250-1318.
- **De Leiris, J. (2003).** Biochemistry of free radicals. *Heart Metabolism*, **19**: 40–44.
- **De whalley, C.V., Rankin, S.M., Houlst, J.R.S., Jessup, W., and Leake, D.S(1990).** Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages., *Biochem Pharmacol*, **39**:1743-1745.
- **Derbel, S et Ghedira, K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et Nutrition*. **05**: 100-108.
- **Droge, W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**: 47-95.
- **Durackova, Z . (2008).** Oxidants, antioxydants and oxidative stress. *Mitochondrial Medecine*, **19**: 20-25.
- **Eymard, S. (2003) .** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. p : 28-38.
- **Falleh, H., ;Ksouri, R. ; Chaieb, K. ; Karray-Bouraoui, N. ; Trabelsi, N. ; Boulaaba, M. and Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities . *Comptes Rendus Biologies*, **331**: 372-379.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimentale dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutiques. *L'actualité chimique*. 108-115.
- **Fiorrucci, S. (2006).** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approche par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Thèse de doctorat Université de Nice-Sophia Antipolis*. P :10
- **Florians, G.; Wingler, K. and SCHMEHL, K. (2001).** Cellular and subcellular localization of gastro intestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. *Free Radic Res*, **35**: 655-660.
- **Fraga, C.G.; Martino, V.S.; Ferraro, G.E.; Coussio, J.D.; and Boveris, A. (1987).** Flavonoid as antioxydants evaluated by in vitro and situ liver chemiluminescence. *Biochem pharmacol*, **36**:717-719.

- **Frankel, E.N. (1998).** Photooxidation of unsaturated fats. In: Frankel, EN, ed. Lipid oxidation, the oily press Dundee. 43-54
- **Garait, B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie métabolique ou par voie gazeuse et effet de la GliSODin. *Thèse doctorat*, université Joseph Fourier, P: 22-23.
- **Gardès-Albert, A. M.; Bonnefont, D. R.; Abedinzadeh, Z. et Jore. D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité Chimique*, 91-95.
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. **04**: 162-169.
- **Goudable, J. et Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique Métabolisme*. **11**: 115-20.
- **Graille, J.P.(2003)** . Lipides et corps gras alimentaire. Edition *LAVOISIER*. P : 51-66.
- **Gupta, K. R.; Hussain, T.; Panigrahi, G.; Das, A.; Singh, G.N. ; Sweety, K.; Faiyazuddin, Md.; Rao, C. V. (2011).** Hepatoprotective effect of Solanum xanthocarpum fruit extract against CCl4 induced acute liver toxicity in experimental animals, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 964-968.
- **Halliwell B. (1995).** Antioxidant characterization, methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*, **49**: 1341 -8.
- **Halliwell, B (2000).** Lipid peroxidation, antioxidant and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*, **47**:410.
- **Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1990).** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods ensymol*, **186**: 1-10.
- **Hanasaki, Y.; Ogawa, S. and Fukui, S. (1994).** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical of Biology Medecine*, **16**: 845-850.
- **Hannebelle, T.; Sahpaz, S. et Bailleul, F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**: 3-6.
- **Harborne, J. B. (1989).** General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). *Methods in plant biochemistry*: Volume 1 Plant Phenolics (p 1–28).

- **Harish, R.; Shivanandappa T. (2006).** Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chemistry*, **95** :180–185.
- **Havsteen, B. H. (2002).**The biochemistry and medical significance of the Flavonoids. *Pharmacol Therap* **96**: 67-202.
- **Heim, E.K., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**: 572-584.
- **Hsieh, R.J. and Kinsella, J.E.(1989).** Oxydation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. *Advances in Food and nutrition Research*, **33**: 233-341.
- **Hutlin, H.O (1994).** Oxidation of lipids in seafoods. *In seafoods :Chemistry, processing Thechnology and Quality*. Shahity, F.& Botta, J.R. (Eds), Blackie Academic & professional, New York; 49-74.
- **Jayakumar, T., Sridhar, M.P., Bharathprasad,T.R., Ilayaraja M .,Ilayaraja, Govindasamy,S., Balasubramanian, M.P. (2009).** *Journal of Health Science*, **55(5)**:701-708.
- **Johnston DE, Kroening C. (1998)** Mechanism of early carbon tetrachloride toxicity in cultured rat hepatocytes. *Pharmacol Toxicol*; **83**: 231–9.
- **Josephon, D.B. and Lindsay , R.C. (1986).** Enzymic Generation of Volatile Aroma Compounds from Fresh. *Biogeneration of Aromas*: 201-219.
- **Joshi, M.; Billing, B.H.; Hallinan.(1995).** Investigation of the role of reactive oxygen species in bilirubin metabolism in the Gunn rat, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1243**:244-250.
- **Judda, A.(2004).** Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: Mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ?. *OCL*, **11(6)** : 414-417.
- **Jungbluth Guillaume (2008)** : Les espèces réactives de l'oxygène et leurs principales implications dans la phosphopathologie canine. *Thèse de Doctorat a l'université Claude-Bernard-Lyon I*.
- **Kennedy, R.D .Thornes, (1997).** Coumarins- Biology, Applications and Mode of Action, *Eds. John Wiley et Sons Ltd, Chichester*.

- **Khanbabae, K. and Van Tee, T. (2001).** Tannins: classification and definition. *Natural Product Report*, **18**: (6) 641–649.
- **Kim, M-Y.; Iwai, K. and Matsue, H. (2005).** Phenolic compositions of *Viburnum dilatatum* Thunb. Fruits and their antiradical properties. *Journal of Food composition and Analysis*, **18**: 789-802.
- **Koehler-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et métabolisme*. **20**: 165-177.
- **Kostova, I ; and Iossifova, T. (2007).** Chemical components of *fraxinus* species. *Fitoterapia*, **78**: 85-106.
- **Laguerre, M.; Lecomte, J et Villeneuve, P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*. **46**: 244–282.
- **Lee, H.M. (2003).**Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicin*. (**10**): 170–175.
- **Lehucher-Michel, M.P. ; Lesgards, J.F. ; Delubac, O. ; Stocker, P. ; Durand, P et Prost, M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. **30**: 1076-1081.
- **Lugasi, A. ; Hovari, J. ; Sagi, K V et Biro L. (2003).** The role of antioxydant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szediensis*.**47 (1-4)**, 119-125.
- **Macheix, J. J., Fleuriet, A et Sarni-Manchado, P. (2006).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôles. In : Les polyphénols en agroalimentaire. *Edition Tech et Doc .Lavoisier*. 01-11.
- **Marfak, A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides. *Thèse de doctorat. Université de Limoges* P: 7-62.
- **Martin, S et Andriantsitohaina, R. (2002).** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. **51**: 304-315.

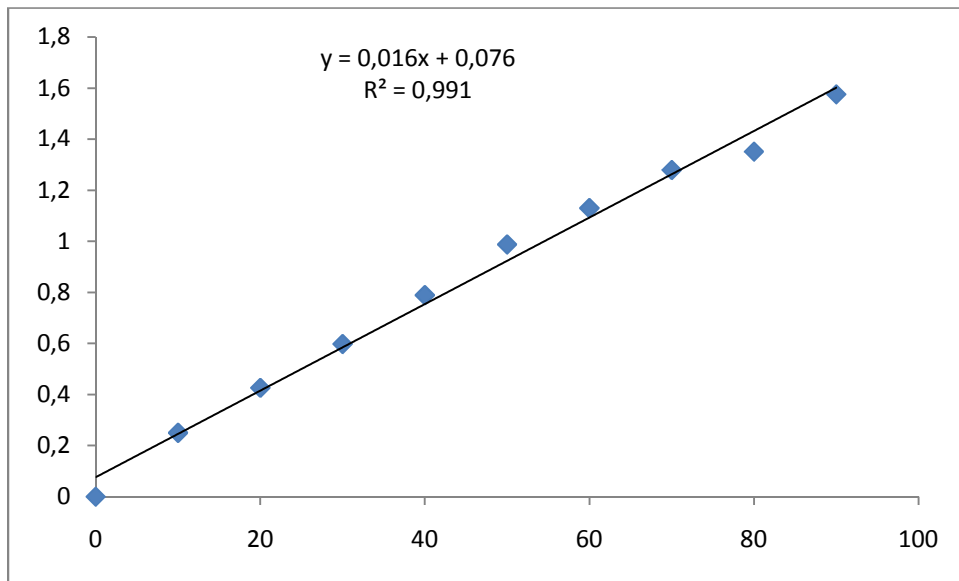
- **Masood, A.K.; Faisal,S.M.;Mushahid, M.K.; Nadeem, A.; Siddiqui, M.U.; Owais, M.(2002).** Binding of bilirubin with albumin-coupled liposomes: implications in the treatment of jaundice. ; *Biochimica et Biophysica Acta*, **1564**: 219– 226.
- **Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent Padeloup O.; Brissot N., P., and Cillard, P. (1993).** Antioxidant and ironchelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures . *Biochem. Pharmacol*, **45**:13-17.
- **Muetzel, S. et Becker, K. (2006).** Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. *Animal Feed, Science and Technology*, (**125**), 139-149.
- **Muggli, R. (1993).** Free radical tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. *Nutrition Richelieu press* : 189-204.
- **Nacz, M. and Shahidi, F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**: 95-111.
- **Naskar, S.; Islam, A.; Mazumder, U. K.; Saha, P. ; Haldar, P. K.; and Gupta, M. (2010).** In Vitro and In Vivo Antioxidant Potential of Hydromethanolic Extract of *Phoenix dactylifera* Fruits. *J. Sci. Res*, **2 (1)**, 144-157.
- **Nelson, S.K.; Bose,S.K. and Mccord, J.M (1994).** The toxicity of high-dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. *Free Radic Biol Med*, **16** :195-200.
- **Nicholson , R et Vermerris, W. (2006).** Phenolic compounds Biochemistry. *Edition: Springer. New York.* 01-48.
- **Nijveldt, R.J.; Nood, E.V.; Hoorn, D.EC.V.; Boelens, P.G.; Norren, K.V.; Skerget, M.; Kotnik, P.; Hadolin, M.; Hras, A.R.; Simonic, M et Knez, Z.(2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Food Chemistry*. **89**: 191-198.
- **Ouarkoub, B., ;Allafet, K et Hamdi, A. (2008).** Séchage de l'oignon par DIC S. *Revue des Energies Renouvelables*. **08**: 97-104.
- **Peng, W.; Tiena, Y. ; Huangb, C. ; Huangd, T; Liaod, J.; Kuoe, C.; Linf, Y. (2010).** *Fraxinus rhynchophylla* ethanol extract attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats via down-regulating the expressions of uPA, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1. *Journal of Ethnopharmacology*, **127** : 606–613.

- **Pietta, P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. **63**: 1035-1042.
- **Pincemail, J. ; Bonjean, K. ; Cayeux, K. and Defraigne, J. O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16** : 233-239.
- **Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R et Defraigne, J O. (1998).** Fumée de cigarette: une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. *Medi Sphere*. P: 1-3.
- **Pincemail, J., lecomte,J., Collart, E., Castiaux, J-P., and Defraigne, J-O (2003).** Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Vaisseaux, Cœur, Poumons* , **6** (5) :1
- **Pokorny, J.; Yanishlieva, N. and Gordon, M. (2001).**Antioxidants in food. *Woodhead Publishing Limited*, P: 9-50.
- **Ratty, A.K. and Das, N.P. (1988).** Effect of flavonoids on non enzymic lipid peroxidation structure activity relationship. *Biochem. Med metabol. Biol*, **39**:69-70.
- **Recknagel R. O., E. A. Glende, J. A. Dolak Jr and R. L. C. Waller (1989).** Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Ther.* **43**: 139154.
- **Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques. In: Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod*. p: 1-27.
- **Ricciarelli, R.; Zingg, J-M. and Azzi, A. (2001).** Vitamin E: protective rôle of a Janus molecule. *The FASEB Journal*, **15**: 2314-2325.
- **Rice-Evens, C.A. Milier, N.J.and Paganga, G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20** (7), 933-956.
- **Richter, G. (1993).** Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. *Edition Presse polytechnique et universitaire Romande*. 317-339.
- **Servais, S. (2004).** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à L'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3, *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1, France*. pp. 19-35.
- **Shenoy; K. A., S. N. Somayaji, K. L. Bairy (2001)**'Hepatoprotective effects of Ginkgo biloba against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats' *Indian J. Pharmacol*, **33**:260-266.

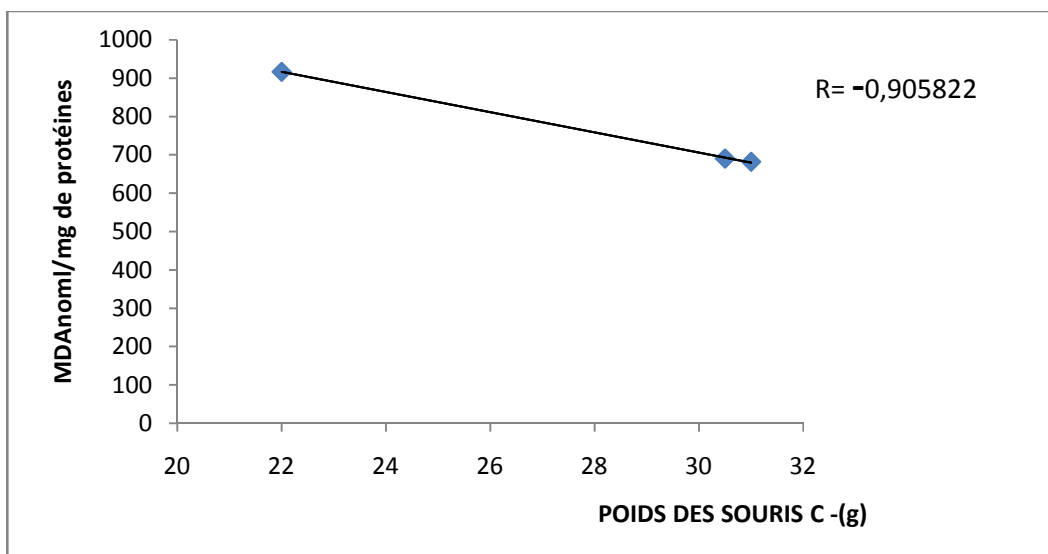
- **Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M et Knez, Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of Food Chemistry*. 89: 191-198.
- **Soares, A.F. (2005).** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : Adiponectine et prostaglandines .Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliqués de Lyon.
- **Sorg, O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, **327**: 649-662.
- **Souza MF, RaoVSN, SilveiraER (1997).** Inhibition of lipid peroxidation by ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa* L. *Phytomedicine*; **4**: 25–9.
- **Su, Z., Yan, X. D., Y.J. and Chen, X. (1993).** Effects of hydrogen peroxide on membrane fluidity and Ca⁽²⁺⁾ transporting ATPase activity of rabbit myocardial sarcoplasmic reticulum. *Acta pharmacologica Sinica*, 14 (5): 393-396.
- **Uzma Nazia, B. Santhosh Kumar^{1*} and Syeda Anees (2011).** Red wine ameliorates CCl₄ – induced acute liver injury in rats. *AJBS* 1(1) 1-7.
- **Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. (2007)** .Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **39**: 44-84.
- **Van Acker, S.A.B.E, L., Van Den Berg, D-J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van Der Vijgh, W.J.F et Bast, A. (1996).** Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*. **20(3)**: 331-342.
- **Vudaa, M.; Souza, R.; Upadhyay, S.; Kumar, j.; Raob, N.; Kumara, V.; Boillat, C.; Mungli, P. (2011).** Hepatoprotective and antioxidant activity of aqueous extract of *Hybanthus enneaspermus* against CCl₄-induced liver injury in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*.
- **Wattele, A.; Kamel, S.; Mentaverri, R.; Lorget, F.; Prouillet, Ch.; Petit, J-P.; Fardelonne, P. and Brazier, M. (2002).** Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kampferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption. *Biochemical pharmacology*, **65**: 35-42.
- **Wolf, P.L. (1999).** Biochemical diagnosis of liver disease. *Indian J Clin Biochem* ; **14**:59–65.

- **Zeashan, H.; Amresh, G.; Singh, S.; Rao ChV (2008).** Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food Chem Toxicol*; **46**: 3417-3421.

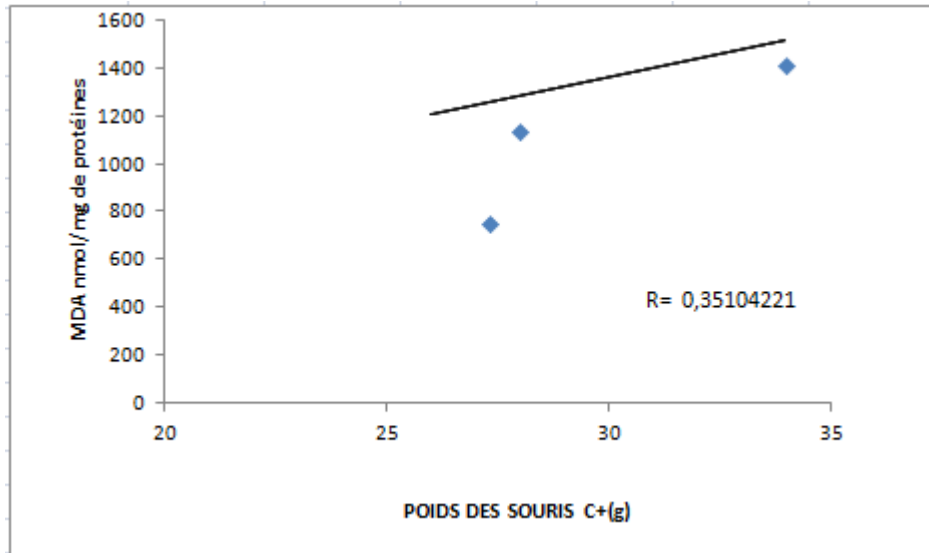
Annexes



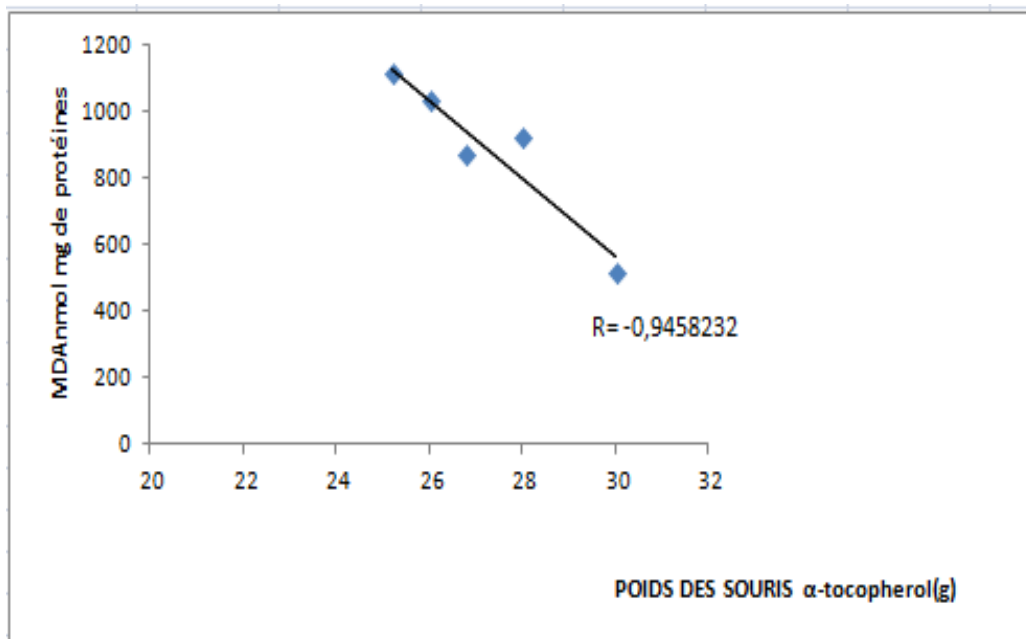
Annexe 01: Courbe d'étalonnage de dosage des protéines de Bradford.



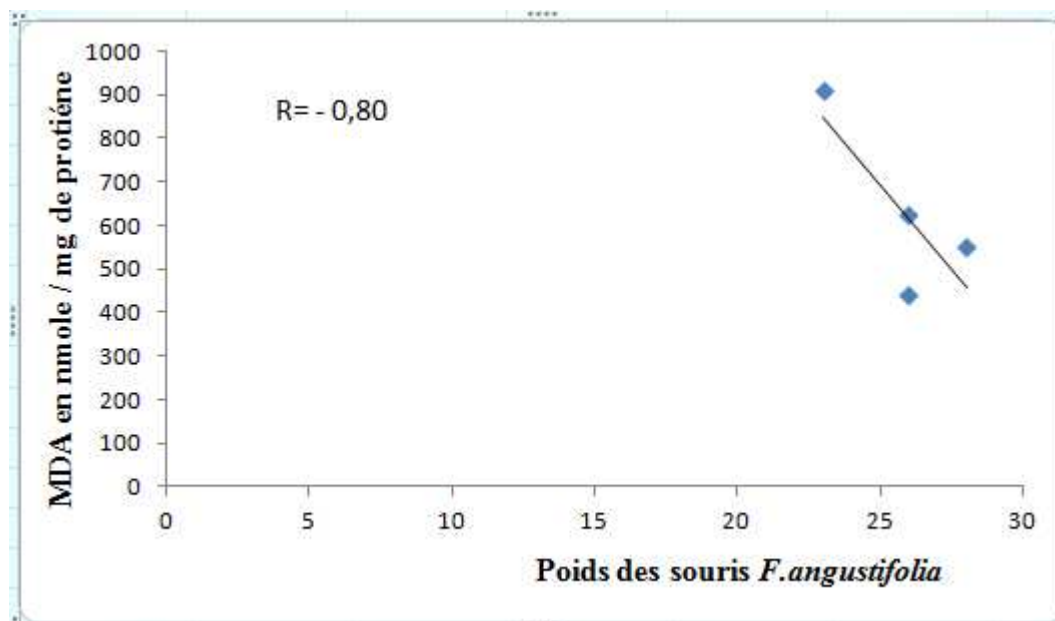
Annexe 02: Corrélation entre le poids des souris du control- et le taux de MDA .



Annexe 03: Corrélation entre le poids des souris du control+ et le taux de MDA .



Annexe 04: Corrélation entre le poids des souris de α - tocopherol et le taux de MDA.



Annexe 05: Corrélation entre le poids des souris traité par l'extrait et le taux de MDA

Dosage des protéines

Teste	X : concentration de protéines(mg)
C-1	49,79
C-2	52,92
C-4	39,17
C-5	38,69
c+1	70,35
c+2	61,41
c+3	50,85
c+4	56,65
c+5	28,37
st2	54,34
st3	41,65
st4	45,53
st5	38,99
frax 1	41,80
frax2	54,58
frax3	92,65
frax4	58,78
frax5	54,26

Résumé :

Fraxinus angustifolia est une plante médicinale largement utilisée par les populations locales pour le traitement des maladies à caractère inflammatoire. Le but de ce présent travail est l'étude *in vivo* de l'activité antioxydant de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* contre la peroxydation lipidique induite par le tétrachlorure de carbone (CCl₄) chez les souris.

Les résultats obtenus indiquent que l'extrait de *F. angustifolia* a réduit le taux de malondialdéhydes (MDA) (631,4nmol/mg de protéine) d'une façon significative par rapport au control (1477,2 nmol/mg de protéine) dépassant significativement le standard α -tocophérol qui a aussi exhibé une activité inhibitrice contre la peroxydation lipidique en réduisant le taux de MDA jusqu' à 891,9 nmol/mg de protéine.

Le taux de la bilirubine totale a été mesuré dans le sérum des souris, les données (0,095; 0,467; 0,846; 0,92) qui correspondent aux groupes témoin, control positif, standard et expérimental respectivement ont révélé une augmentation plus significative de cette protéine dans le sang des souris des groupes standard et expérimental que le contrôle positif suggérant une activation des systèmes de défense antioxydants.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude sont très intéressants, ce qui est encourageant pour effectuer d'autres tests biochimiques et histopathologiques sans oublier le test de cytotoxicité.

Mots clés : *Fraxinus angustifolia*, effet hepatoprotective, dommage du foie, tétrachlorure du carbone, activité antioxydant, α -tocophérol.

Abstract :

Fraxinus angustifolia, a medicinal plant largely used by local populations for the treatment of inflammatory diseases. The aim of this present work was the study of the *in vivo* activity of an aqueous extract of ethyl acetate of the bark of *Fraxinus angustifolia* against lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in mice.

The obtained results indicate that the extract of *F. angustifolia* has reduced significantly the amount of malondialdehydes (MDA) (631,4nmol/mg of proteins) compared to the control (1477,2 nmol/mg de protéine), surpassing that of the standard, α -tocophérol, that also exhibited an inhibitory activity against lipid peroxidation by reducing the quantity of MDA attaining 891,9 nmol/mg of proteins.

The determination of total bilirubin in the serum of mice has revealed, according to the data (0,095; 0,467; 0,846; 0,92) corresponding respectively to the groups of the normal control, positive control, standard and experimental, a more significant increase of this protein in the blood of mice from the standard and experimental groups than the control suggesting an activation of antioxidant defense systems.

The whole body of results in the present work are very interesting, encouraging the realization of other biochemical and histopathological tests in addition to cytotoxic ones.

Keywords: *Fraxinus angustifolia*, Hepatoprotective effect, Liver injury, Carbon tetrachloride, Antioxidant activity, α -tocophérol.