

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

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



Réf :

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

MASTER

Thème

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

Présenté par : AIT AMRAOUI MALIKA et BOUKROUS NOUNA

Soutenu en: **20 Juin 2017**

Devant le jury composé de :

M^f GUIDOUCHE A.
M^f ATMANI D.
M^{elle} AIT ALI D.
Dr LESLOUS M.

M.C.B à l'U.A.M.B
Professeur à l'U.A.M.B
M.C.B à l'U.A.M.B
Docteur, C.T.W.S

Président
Encadreur
Examinatrice
Co-promoteur

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Au terme de ce travail nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience de mener à fin ce mémoire.

*On tient à exprimer nos plus chaleureux remerciements à notre promoteur Professeur **ATMANI DJEBBAR**, de nous avoir fait l'honneur de nous encadrer et accompagné dans la réalisation de ce travail.
Veuillez trouver ici Monsieur notre profonde gratitude.*

*Nos reconnaissances particulières à M^{elle} **Ayouni Karima** pour sa présence, ses conseils, ses orientations, sa gentillesse et sa confiance, veuillez trouver ici l'expression de nos sincères considérations.*

*On tient à remercier Dr **Leslous Mourad** pour son accueil chaleureux au sein du Centre de Transfusions Sanguines de Bejaia d'avoir accepté de superviser ce travail, pour sa disponibilité et ses encouragements. On remercie parallèlement tout l'effectif du centre, pour leurs aides, conseils et gentillesses.*

Nous adressons aussi nos remerciements aux membres de jury, nous sommes très honorées que vous acceptiez d'évaluer notre travail.

*On doit une reconnaissance particulière à Mme Dr. **Atmani Dina**, qui nous a accueillie au sein de Laboratoire de Biochimie Appliquée.*

*On exprime aussi toute notre sympathie pour l'ensemble de personnels du laboratoire de Biochimie Appliquée, exceptionnellement M^{me} **You Farah** pour son soutien, conseils et bonne humeur.*

A toute l'équipe de laboratoire de Chimie Organique, Biologie Physico-Chimique, de Technique d'Analyse Moléculaire, de Biologie des Soles et laboratoire de Biologie Moléculaire, merci pour votre bienveillance.

On tient à exprimer nos sincères remerciements à tous les enseignants qui nous ont formés pendant ce cursus.

En fin, on remercie toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel.

Dédicaces

Je dédie ce travail, tout d'abord et spécialement à ma chère « mère », Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je te porte ni la profonde gratitude que je te témoigne pour tous les efforts que tu n'as jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

A mon très agréable « père », qui s'est tant sacrifié pour moi, qui s'est toujours donné du mal pour assurer mon bien être.

J'espère que je suis à la hauteur de ce que vous attendez de moi

A mes grands parents « Vava Kaci », « Djeddi Ahmed », « Yema koukou » et « Yema haja » que Dieu vous accorde santé, bonheur et longue Vie.

A Ma sœur unique « Naima », mes frères « Abd Elhamid », « Azzedine », « Salem » et notre petit ange « Samir », vous m'aviez toujours aidé et ces quelques lignes sont insuffisantes pour exprimer mon profond amour et ma reconnaissance que Dieu vous aide à réaliser vos vœux les plus chers.

A mes chers oncles, tantes, A mes chers cousins et cousines et à tous les membres de la famille petits et grands, puisse Dieu nous garder toujours unis.

A quelqu'un de si exceptionnel, mon soutien moral et source d'encouragement pour ta présence au continu et tes conseils, je tiens à te dire merci infiniment que Dieu te comble de bonheur

A Celle dont j'ai eu l'honneur de partager le cursus universitaire « Nouna » merci pour ta patience ton grand cœur et ta volonté

A Celles avec qui j'ai trouvé la joie, à ma plus chère amie « Katia », « Yamina », « Nouara », « Farida », « Syham », « Tata », « Hanane », « Zaza », « Kenza », « Sonia », « Samira », « Madiha » et « Ouazna » en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables, Je vous dédie ce travail et je vous souhaite tout le bonheur, et à tous mes amis.

*A Mes adorables collègues avec qui j'ai partagé le travail au laboratoire merci infiniment « Souhila » pour tes conseils, ton aide, ta charité, merci « Houda », pour ta générosité, « Meriem » merci pour ta sincérité et « Ryma » merci pour ta gentillesse.
Merci pour votre énergie, votre soutien et pour le partage de vos connaissances.*

A Tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

A toute la promotion de Pharmacologie Moléculaire.

Malika

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A Mes chers parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement continu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.

Ames chers frère et sœurs, Doudou, Karima, Kahina et ses petits, Souli et Ikram

A mes grands parents.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines, à toutes la famille Boukrous, et Hammoudi.

A mes amis qui ont cru en moi et qui m'ont toujours encouragé, et avec qui j'ai passé des années inoubliables, surtout mes meilleures Aldja, Nawel et Kadhima.

Mes spéciales dédicaces pour ma très chère binôme Malika et les filles (Houda, Meriem, Ryma et Souhila), qui nous ont accompagné dans la réalisation de ce travail, en souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

A tous les gens que j'aime et qui m'aiment. Je leur dédie ce mémoire.

Nouna.

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

I-Synthèse bibliographique

I-1- Radicaux libres, stress oxydant et pathologies associées	02
I-1-1- Stress oxydant et radicaux libres	02
I-1-1-1- Les espèces réactives oxygénées (EROs)	02
I-1-2- Les cibles moléculaires des EROs	03
I-1-2-1-L'oxydation de l'ADN	03
I-1-2-2- L'oxydation des protéines	03
I-1-2-3- La peroxydation lipidique	03
I-1-3- Implications pathologiques du stress oxydatif	04
I-2-Stress oxydant et pathologies hémolytiques	04
I-2-1- Les érythrocytes	04
I-2-2-L'hémolyse	04
I-2-3-Mécanisme d'oxydation des érythrocytes par les EROs	05
I-2-4- Les antioxydants	06
I-2-4-1-Les systèmes antioxydants enzymatiques	06
I-2-4-2-Les systèmes antioxydants non enzymatiques	07
I-3- Prévention de l'oxydation et d'hémolyse dans la médecine traditionnelle	07
I-4- <i>Fraxinus angustifolia</i>	08
I-4-1- Effets pharmacologiques et composés phénolique de <i>F.angustifolia</i>	09

II- Matériel et Méthodes

II-1- Matériel

II- 1-1- Matériel végétal	11
II-1-2-Les érythrocytes.....	11
II-1-3-Equipement, verrerie et produits chimiques	12

II-2- Méthodes

II-2-1-Préparation des extraits à partir des feuilles de *Fraxinus angustifolia*..... 13

II-2-1-1- Procédure d'extraction éthanolique..... 13

II-2-1-2- Procédure de préparation de la décoction

II-2-2- Dosages des contenus phénoliques des extraits éthanolique et aqueux de feuilles de *F.*

angustifolia

II-2-2-1- Le dosage des phénols totaux..... 14

II-2-2-2- Le dosage des flavonoïdes

II-2-2-3- Le dosage des tanins

II-2-3- Activités biologiques des extraits de feuilles de *F.angustifolia*

II-2-3-1-Tests d'hémolyse..... 17

II-2-3-2- Traitement des érythrocytes par le H₂O₂

II-2-3-3- Evaluation des effets hémolytiques des extraits de feuilles de *F. angustifolia* sur les érythrocytes

II-2-3-4- Evaluation des effets anti-hémolytique des extraits de feuilles de *F.angustifolia* sur les érythrocytes..... 18

II-2-3-5- Estimation de la peroxydation lipidique par la mesure des MDA

II-3-Analyse statistique..... 19

III- Résultats et discussion

III-1-Résultats et interprétations	20
III-1-1-Taux d'extraction	20
III-1-1-1- Teneurs en composés phénoliques.....	20
III-1-2-Traitement des érythrocytes par le peroxyde d'hydrogène	21
III-1-2-1- Mesure des dérivés de la peroxydation lipidique (MDA).....	22
III-1-3- Test de toxicité des deux extraits sur les érythrocytes en suspensions	23
III-1-3-1-Estimation des taux de MDA après traitement par l'extrait éthanolique et aqueux de <i>F. angustifolia</i>	25
III-1-4- Effet anti-hémolytique et anti peroxydant de deux extraits	26
III-1-4-1- Evaluation des effets anti-hémolytiques des extraits de feuilles de <i>F. angustifolia</i> sur les érythrocytes	26
III-1-4-2- Mesure de l'effet anti-péroxydant par le dosage des MDA.....	28
III-2- Discussion générale	31
Conclusion	36
Références bibliographiques	37

Annexes

Liste des Figures

N°	Titre	Page
1	Photographies de l'arbre et des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> (Originales).	11
2	Photographies de feuilles sèches et poudre de <i>F. angustifolia</i> (Originales).	13
3	Procédure expérimentale de dosage des phénols totaux dans extraits éthanoliques et aqueux de feuilles de <i>F. angustifolia</i> .	14
4	Procédure expérimentale de dosage des flavonoïdes dans extraits éthanoliques et aqueux de feuilles de <i>F. angustifolia</i> .	15
5	Procédure expérimentale de dosage des tanins dans extraits éthanoliques et aqueux de feuilles de <i>F. angustifolia</i> .	16
6	Effet hémolytique de H ₂ O ₂ induit sur des érythrocytes humains à différentes concentrations.	21
7	Taux de MDA, marqueur de la peroxydation lipidique induite par le H ₂ O ₂ sur des érythrocytes humains à différentes concentrations.	22
8 (A)	Test de toxicité d'extrait éthanolique de feuilles de <i>F. angustifolia</i> sur les érythrocytes humains.	23
8 (B)	Test de toxicité d'extrait Aqueux de feuilles de <i>F. angustifolia</i> sur les érythrocytes humains.	24
9	Taux de MDA, marqueur de la peroxydation lipidique obtenue par différentes concentrations d'extrait éthanolique (A) et d'extrait aqueux (B) de feuilles de <i>F. angustifolia</i> sur les érythrocytes humains.	25
10 (A)	L'effet antihémolytique de différentes concentrations d'extrait éthanolique de feuilles de <i>F. angustifolia</i> sur l'hémolyse induite par H ₂ O ₂ sur les érythrocytes humains.	26
10 (B)	L'effet antihémolytique de différentes concentrations d'extrait aqueux de feuilles de <i>F. angustifolia</i> sur l'hémolyse induite par H ₂ O ₂ sur les érythrocytes humains.	27
11	Taux de MDA, marqueurs de la peroxydation lipidique obtenue par l'extrait éthanolique (A) et extrait aqueux (B) de feuilles de <i>F. angustifolia</i> sur les érythrocytes humains en présence du H ₂ O ₂ .	29

Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
I	Les Types des espèces réactives oxygénées et leurs sources	2
II	L'activité anti-hémolytique de quelques plantes médicinales.	8
III	Quelques exemples de composés phénolique de <i>F. angustifolia</i> .	10
IV	Equipements, verreries et produits chimiques.	12
V	Les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins dans les extraits éthanolique et aqueux des feuilles de <i>F. angustifolia</i> .	20
VI	Pourcentages d'inhibition d'hémolyse induite par le H ₂ O ₂ après traitement par les deux extraits de feuilles de <i>F .angustifolia</i> .	28
VII	Pourcentages d'inhibition de taux des MDA induits par le H ₂ O ₂ après traitement par les deux extraits de feuilles de <i>F .angustifolia</i> .	30

Liste des abréviations

AAPH: 2,2'-Azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride .

AGPI: Acides gras polyinsaturés.

BSA : Albumine du sérum de bovin.

CAT: Catalase.

EROs: Espèces réactives oxygénées

Eq.A.G. : Equivalent d'acide gallique.

Eq.A.T. : Equivalent d'acide tannique.

Eq.rut. : Equivalent de rutine.

Fe²⁺: Ions ferreux.

Fe³⁺: Ions ferriques.

G6PD : Glucose 6-Phosphate déshydrogénase.

GR : Globule rouge.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

MDA : malondialdéhyde.

RL: Radicaux libres.

SDS: Sodium Dodecyl sulfate

SOD: Superoxyde dismutase

T° : Température

Lors d'un stress oxydant les espèces réactives oxygénées (EROs) jouent un rôle important dans la physiopathologie. Elle participe à une production de quantités des EROs tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ainsi que d'antioxydants par le système de défense (**Favier, 2003**).

Les EROs participent dans la peroxydation des lipides membranaires érythrocytaires, et provoquent ainsi la lyse de ces membranes, qui conduit à la destruction des érythrocytes, puis la libération de l'hémoglobine qui peut mener à l'apparition des différentes pathologies hémolytiques, telles que les anémies hémolytiques (**Zhang et Lin, 2008**).

La recherche scientifique actuelle s'oriente vers la phytothérapie ; en effet, les plantes médicinales possèdent des métabolites secondaires, ces derniers sont doués de plusieurs activités biologiques, telles que les activités antioxydantes et anti-hémolytiques. *Fraxinus angustifolia* est une plante largement utilisée dans la pharmacopée traditionnelle pour le traitement de diverses maladies grâce à ses activités biologiques (**Falé et al., 2013**), et pour cela, ce travail est dédié aux tests de son effet préventif sur les érythrocytes, après traitement par le H_2O_2 .

Dans cette optique, ce travail a pour objectif d'évaluer le potentiel préventif anti-hémolytique des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, riches en antioxydants tel que les phénols totaux et flavonoïdes, des métabolites à puissance anti-peroxydante. Les tests de bioactivité était, *in vitro*, basés sur la capacité des deux extraits éthanolique et aqueux à stabiliser les membranes érythrocytaires, suite a leur traitement par un agent oxydant, le H_2O_2 .

Le présent manuscrit comportant l'étude théorique et l'étude pratique réalisée, est structuré comme suit ; une introduction décrivant la problématique, l'objectif du thème ainsi que la démarche globale choisie pour réaliser ce mémoire. Un premier chapitre comportant une synthèse bibliographique décrivant le stress oxydant, le mécanisme de peroxydation lipidique et les différentes pathologies liées, tel que l'hémolyse ; un deuxième chapitre décrivant la méthodologie suivie pour l'extraction et la quantification des composés phénoliques présents dans les extraits éthanolique et aqueux de feuilles de *F. angustifolia*, l'évaluation de l'activité anti-hémolytique et l'activité anti-peroxydation lipidique des deux extraits à inhiber les dommages induits par le peroxyde d'hydrogène sur les érythrocytes humains. Nous terminant par une conclusion, récapitulant les principaux résultats obtenus, leurs limites, impacts et les perspectives qui en découlent.

I- 1- Radicaux libres, stress oxydant et pathologies associées

I-1-1- Stress oxydant et radicaux libres

Le stress oxydant est l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives oxygénées (EROs) dans le statut intracellulaire, ce qui mène à un déséquilibre, soit par une production accrue de radicaux libres, ou bien une diminution de la capacité de défense antioxydante des cellules vivantes (**Favier, 2006 ; Widmer *et al.*, 2010**).

I-1-1-1- Les Espèces réactives oxygénées (EROs)

Une espèce réactive oxygénée (ERO) est un radical oxygéné ou une molécule pouvant produire des radicaux libres. Ces espèces chimiques instables et très réactives dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques, elles peuvent être radicalaires ou non radicalaires (**Goudable et Favier, 1997**), elles sont produites continuellement dans la cellule sous l'effet de facteurs endogènes ou exogènes par divers mécanismes, on parle donc de sources endogènes et exogènes (**tableau I**) (**Defraigne et Pincemail, 2008**). Ces espèces chimiques peuvent être dérivées de l'oxygène, ou d'autres atomes comme l'azote (**Berger, 2006**).

Les radicaux libres (RL) sont des molécules ou atomes comportant un électron célibataire sur leurs couches périphériques (**Haleng *et al.*, 2007**), ce qui confère à ces molécules une grande réactivité et la possibilité d'oxyder ou de réduire de nombreux composés, afin de stabiliser leur orbitale externe.

Tableau I : Les types des espèces réactives oxygénées et leurs sources

Classification des EROs	
Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
-Anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) -Radical hydroxyle (OH^{\bullet}) - Monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) (Goudable et Favier, 1997).	-Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) - Oxygène singulier (1O_2) -Acide hypochlorique ($HOCl$)
Les sources des EROs	
Endogène	Exogènes
-Par la fuite d'électrons à partir de la chaîne mitochondriale. -Par de nombreux systèmes enzymatiques, (Beaudeau <i>et al.</i>, 2006).	-Le tabac, la fumée de cigarette (Guerine <i>et al.</i>, 2005), consommation d'alcool, exposition prolongée au soleil, les radiations ionisantes, ainsi les rayonnements UV.

I-1-2-Les cibles moléculaires des EROs

L'accumulation des EROs dans les cellules vivantes entraîne des dommages qui peuvent mener à une perte de fonction, elles sont susceptibles d'endommager (oxydées) les acides gras polyinsaturés (AGPI), les protéines membranaires et d'ADN (**Iuchi, 2012**).

I-1-2-1- L'oxydation de l'ADN

L'ADN est très vulnérable à l'attaque par les radicaux libres et subit donc différents dommages oxydatifs. Tout d'abord, les bases azotées qui composent l'ADN sont sensibles au phénomène d'oxydation qui induit la modification de celles-ci. Les radicaux libres peuvent également altérer la liaison entre la base azotée et le désoxyribose, ou attaquer directement le sucre créant ainsi une coupure de la chaîne simple brin (**Favier, 2006**).

I-1-2-2- L'oxydation des protéines

La structure primaire, secondaire et tertiaire, et les fonctions des protéines sont altérées par les EROs, les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles à l'oxydation (**Pasquier, 1995 ; Iuchi, 2012**).

À proximité des sites de liaisons métaboliques peuvent se dérouler des réactions d'oxydation qui produisent des acides aminés altérés, certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules nuisant différentes activités biologiques (**Haleng et al., 2007**).

I-1-2-3- La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est issue de la biotransformation de certains composés en métabolites réactifs toxiques (RL), qui peuvent agir sur les lipides membranaires des cellules saines, ces derniers seront convertis en hydroxyperoxydes (**Favier, 2006 ; Iuchi, 2012**). En effet, les AGPI sont les cibles majeures des EROs tel que l'acide linoléique et l'acide arachidonique pour déclencher un enchainement de réactions radicalaires (**Pasquier, 1995**). Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des AGPI, la position d'un ou plusieurs groupements méthylène entre deux double-liaisons les rend particulièrement sensibles à l'oxydation par les EROs, donnant un radical peroxyde (ROO \cdot) qui va à son tour arracher un atome d'hydrogène sur la chaîne insaturée voisine pour générer un hydroperoxyde (ROOH) instable et un nouveau radical R, assurant la propagation du processus (**Therond, 2006 ; Haleng et al., 2007**).

L'oxydation des AGPI produit également des espèces réactives supplémentaires par exemple le 4-hydroxynonanal et malondialdéhyde (MDA), qui peuvent contribuer à la toxicité (**Fibach et Rachmilewitz, 2008**), ce qui tend à altérer la structure des membranes cellulaires, à perturber le fonctionnement de ces membranes, notamment leurs rôle de barrière, de transport et de récepteur (**Haleng et al., 2007**).

I-1-3- Implications pathologiques du stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications, c'est le résultat d'une concentration d'EROs très élevée persistante dans le temps. Ces dernières peuvent mener à l'apparition de diverses pathologies tels que, l'ischémie myocardique, maladie cardiovasculaires (**Baudin, 2006**), cancer (**Montagnier et al., 1998**), l'athérosclérose, l'Alzheimer, la maladie de Parkinson (**Desport et couratier, 2002**), et les anémies hémolytiques (**Mégarbane, 2008**).

I-2-Stress oxydant et pathologies hémolytiques

Les anomalies au niveau des globules rouges favorisent les dommages oxydatifs qui jouent un rôle dans l'accélération de l'hémolyse, ce qui conduit à l'apparition de différentes pathologies hémolytiques.

I-2-1- Les érythrocytes

L'érythrocyte, appelé aussi hématie ou globule rouge, est une cellule très simplifiée, à la forme d'une lentille biconcave, d'un diamètre de 7 μ m. Elle est douée d'une grande déformabilité qui lui permet de franchir les capillaires et le transport effectif d'oxygène (**Mohandas et Gallagher, 2017**). Les érythrocytes sont les cellules les plus abondantes dans le corps humain, possédant des caractéristiques physiologiques et morphologiques souhaitable. Les dommages oxydatifs associées à la membrane des érythrocytes (lipides/protéines) peuvent être impliqués dans l'hémolyse (**Kozlova et al., 2012**).

I-2-2-L'hémolyse

L'hémolyse est un phénomène irréversible par lequel les globules rouges sont détruits et libèrent leurs contenu hémoglobinique dans le plasma (**Vinchi et Tolozano, 2013**), il existe deux types d'hémolyse ; une hémolyse physiologique qui se caractérise par la destruction du globule rouge après une durée de vie de 120 jours par vieillissement, elle sera compensée

immédiatement par la moelle osseuse, sans répercussions cliniques ni biologiques. Cette hémolyse est essentiellement intra-tissulaire (**Rother et al., 2005**).

L'hémolyse intra-tissulaire (90%) désigne le processus par lequel les globules rouges âgés sont phagocytés par les macrophages de système de phagocytes qui a lieu dans la moelle osseuse, le foie et la rate, cette phagocytose porte sur des globules rouges dont le vieillissement se traduit par des modifications biochimiques, morphologiques et de la plasticité (**Aguilar, 2007**). En plus, 10% d'hémolyse intra-vasculaire se déroule même au sein de la circulation sanguine, il a été constaté que dans ce cas, l'hémoglobine est libérée dans le plasma où elle forme un complexe avec la protéine plasmatique haptoglobine, synthétisée dans le foie, ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est catabolisée (**Loustau et al., 2011**).

Un autre type d'hémolyse, c'est l'hémolyse pathologique qui se caractérise par la destruction précoce et exagérée des globules rouges circulants sous l'effet d'un processus hémolytique qui peut être intrinsèque (Hémolyse corpusculaire) ou extrinsèque (Hémolyse extra-corpusculaire) (**Fibash et Rachmilwitz, 2008**). Ce processus peut être congénital ou acquis, il affecte toujours un des constituants vitaux du globule rouge, de la membrane d'enzymes et d'hémoglobine. Une hémolyse d'origine corpusculaire, est due aux anomalies de globules rouges, c'est-à-dire la destruction des hématies, provenant de sa fragilité, déficit enzymatique par exemple si l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase fait défaut, les agents oxydants peuvent dénaturer l'hémoglobine et les lipides membranaires, favorisant ainsi la lyse des hématies (**Aguilar, 2007**).

Une hémolyse extra-corpusculaire, c'est l'agression extrinsèque des hématies qui est caractérisée par une agression directe de l'hématie par des toxines, de la rigidité anormale acquise de la membrane et de la rupture des hématies normales sur un obstacle (**Laustau et al., 2011**).

I-2-3-Mécanisme d'oxydation des érythrocytes par les EROs

Suite à un stress oxydatif accru les défenses antioxydantes peuvent être altérées aboutissant à la production des EROs, tel que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. La toxicité oxydatif de l'hémoglobine et des membranes érythrocytaires est principalement due à la production des radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) à travers la libération du fer.

En absence de la superoxyde dismutase et la catalase, l'oxyhémoglobine extracellulaire subit une oxydation spontanée (méthémoglobine) conduisant à la formation de radicaux superoxyde et fer ferrique (Fe^{3+}). Par ailleurs, la dismutation spontanée des radicaux superoxyde génère le peroxyde d'hydrogène, la présence des deux crée la possibilité pour la génération de radical hydroxyle (réaction Fenton) (**Guettiridge, 1983**), lui aussi, qui est un puissant oxydant qui en réagissant avec les AGPI des phospholipides membranaires peut initier la peroxydation lipidique et éventuellement provoque des lésions cellulaires, qui se termine par la production d'un produit terminal de la peroxydation lipidique, le malondialdéhyde (MDA) et l'instabilité de la membrane, contribuent à une hémolyse accélérée (**Iuchi, 2012**).

I-2-4- Les antioxydants

Les dommages significatifs à l'oxydation des érythrocytes sont évités par des systèmes antioxydants qui peuvent être définis comme toutes substances qui, sont présentes à de faibles concentrations par rapport au substrat oxydable dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires, exercent une inhibition de la production des EROs, et la peroxydation lipidique. Ils se manifestent aussi par la neutralisation des enzymes oxydantes et par chélation d'ions métaboliques ou-bien celles responsable à la production des EROs (**Fontaine et al., 2002**), il existe deux catégories des antioxydants :

I-2-4-1-Les systèmes antioxydants enzymatiques

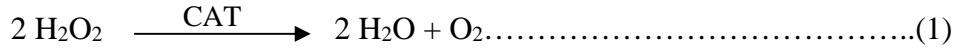
Les globules rouges sont très riches en enzymes antioxydantes on peut citer

- **Le superoxyde dismutase (SOD)**

La SOD, est une enzyme qui élimine l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, elle produit de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène (**Defraigne et Pincemail, 2008**). Cette enzyme existe sous deux formes : une cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (CuZnSOD) et l'autre mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur (MnSOD), (**Bonnefont-Rousselot et al., 2012**).

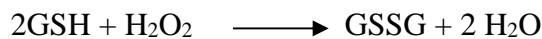
- **La catalase**

Elle catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ (1) généralement produit par la superoxyde dismutase. Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et du foie, (**Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2012**).



- **La glutathion peroxydase (GPX)**

Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (H₂O₂), et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène, (**Rees *et al.*, 2004**), selon la réaction suivante :



I-2-4-2-Les systèmes antioxydants non enzymatiques

La production des EROs peut être justifiée par d'autres molécules tels que l' α -tocophérol (vitamine E), dont son rôle est de capter les radicaux peroxydes lipidiques (RO₂[•]) qui propagent les chaînes de peroxydation, on trouve aussi l'acide ascorbique (vitamine C) (**Rees *et al.*, 2004**), qui est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés, puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles (OH[•]), mais aussi avec les radicaux superoxydes (O₂[•]).

Les aliments apportent de multiples bénéfices en flavonoïdes qui ont comme rôle de renforcer le système de défense. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes et des molécules très intéressantes puisqu'elles ont la capacité de prévenir les dommages induits par les EROs (**Esposito *et al.*, 2002**)

I-3-Prévention de l'oxydation et d'hémolyse dans la médecine traditionnelle

En médecine traditionnelle, plusieurs plantes sont utilisées grâce à leur efficacité dans les préventions de diverses pathologies, c'est la source d'inhibiteurs qui pourraient agir sur une grande variété des maladies tels que les anémies hémolytiques (**Kadali *et al.*, 2016**). Le tableau III présente quelques plantes médicinales qui ont une activité anti hémolytique et leurs concentrations inhibitrices d'hémolyse.

Tableau II : L'activité anti-hémolytique de quelques plantes médicinales.

Plante et partie utilisée	Type et dose d'extrait	Type d'étude	Oxydant	Effet antihémolytique	Références
<i>Coriandrum Sativum L.</i> (Fleurs)	500µg/ml méthanol	<i>In vitro</i> Erythrocytes humains	H ₂ O ₂ (100mM)	IC ₅₀ = 81,76µg/ml	Rajeshwar et al., 2012
<i>Arbutus unedo L.</i> (Feuilles)	100 µg/ml Eau distillée	<i>In vitro</i> Erythrocytes humains	AAPH (50mM)	IC ₅₀ = 62µg/ml	Mendes et al., 2011
<i>Allium ascalonicum L.</i> (Racines)	200µg/ml hexane	<i>In vitro</i> Erythrocytes humains	H ₂ O ₂ (100mM)	IC ₅₀ 87±64µg/ml	Leelarungrayub et al., 2004
<i>Senna singueana</i> (Feuilles)	120µg/ml Ethyl acétate	<i>In vitro</i> Erythrocytes de mouton	H ₂ O ₂ (100mM)	IC ₅₀ = 233 µg/ml	Mebrahtom, 2012
<i>Lazer trilobum.L</i> (Feuilles)	50µg/ml Ethanol / eau	<i>In vitro</i> Erythrocytes de rats	H ₂ O ₂ (40mM)	IC ₅₀ = 169,6 µg/ml	Ebrahimzadehl et al., 2010

I-4- *Fraxinus angustifolia*

La plante médicinale *Fraxinus angustifolia* appelée communément "le frêne oxyphylle", "Adardar" ou bien "Taslent" en kabyle (**Rameau et Dumé, 1989**) est présente dans région méditerranéenne, le sud de l'Europe, l'ouest de l'Asie (jusqu'à l'ouest de l'Iran) et dans le nord de l'Afrique (nord de l'Algérie et du Maroc) (**Caudullo et Durrant, 2016**).

Fraxinus angustifolia est une espèce de la famille des Oléacées commune dans les régions humides de tout le nord algérien. Ces feuilles sont opposées au nombre impaire et comportent de 5 à 13 folioles (**Younis et al., 2016**).

On compte plus de 65 espèces de genre *Fraxinus* dans le monde (**Wallander, 2008**) dont *Fraxinus angustifolia* a été placée dans la position taxonomique suivante :

Règne : Végétal

Sous-règne : Eucaryotes

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Astérides

Ordre : Oléales

Famille : Oléacées

Sous-famille : Oléoidées

Genre : *Fraxinus*

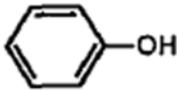
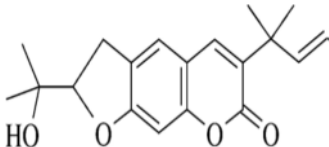
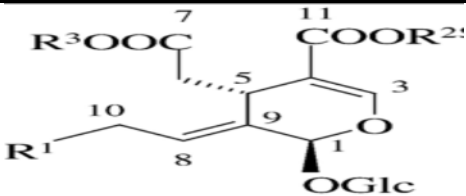
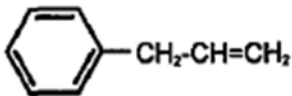
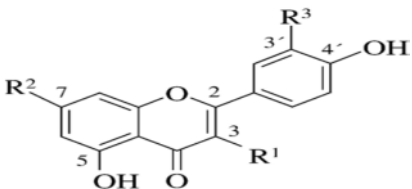
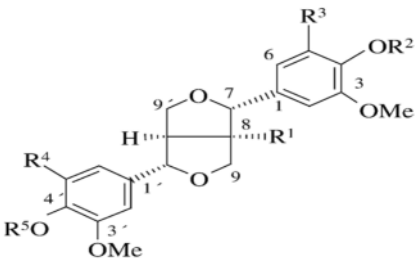
Espèce : *Fraxinus angustifolia*

I-4-1-Effets pharmacologiques et composés phénoliques de *F.angustifolia*

Différentes parties de la plante *F. angustifolia* ont été utilisées en médecine traditionnelle. Les feuilles sont employées comme remède anti-rumatismal, fébrifuge, (**Goodmann et Hobbs, 1988**), hypotensif et antiseptique (**Belakhdar et al., 1991**). Elles sont aussi utilisées comme analgésique (**Camejo-Rodregues et al., 2003**), hypocholestérolémiant (**Falé et al., 2013**) et anti-hémorroïdes (**Baba-Aissa, 1999**). Des investigations scientifiques ont appuyé ces usages par la mise en évidence de plusieurs bioactivités des extraits de cette plante. Elle a montré des effets antioxydant (**Atmani et al., 2009**), anti-inflammatoire et antidiabétique importants (**Medjahed et al., 2016**). Ces activités biologiques ont été attribuées par ces auteurs aux métabolites secondaires de cette plante, notamment son contenu en composés phénoliques.

Le tableau III illustre quelques exemples de composés phénoliques de *Fraxinus angustifolia*.

Tableau III : Quelques exemples de composés phénolique de *F. angustifolia*

Composés phénoliques	Structures	Quelques exemples de composés	Références
Phénols simple		6-O-caffeoyl-β-D-glucopyranoside	(Bravo, 1998)
Coumarins		Fraxine Fraxitine Fraxinol	(Kostova et Iossifova, 2007)
Secoiridoids		Fraxicarboside A Fraxicarboside B Fraxicarboside C Oleuropeine	(Wallander <i>et al.</i> , 2008) (Kostova et Iossifova, 2007)
Phényléthanoides		Verbascoside Calceolariosides	(Kostova et Iossifova, 2007) (Bravo, 1998)
Flavonoïdes		Quercétine Rutine apagenine Astragaline nicotiflorine	(Falé <i>et al.</i> , 2013) (Kostova et Iossifova, 2007)
Lignanes		Pinoresinol	(Bravo, 1998) (Kostova et Iossifova, 2007)

Le but de notre travail consiste à étudier le pouvoir anti-hémolytiques et anti-péroxydant de deux extraits éthanolique et aqueux de l'extrait de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

II-1- Matériel

II-1-1-Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, identifiée préalablement aux niveaux de laboratoire Biochimie Appliquée récoltées en mois de juillet 2016 dans la forêt d'Akfadou région de Chemini localisée à 70 km Ouest de la ville de Bejaia, dans un endroit naturel loin de perturbations humains. Les photographies de cet arbre est ces feuilles sont montrés dans la figure suivante :



Figure 1 : Photographies de l'arbre et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* (Originales)

II-1-2-Les érythrocytes

Pour évaluer les activités antioxydantes et anti-hémolytiques, *in vitro*, des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* sur un modèle membranaire des érythrocytes, cinq échantillons du sang humains ont été utilisés pour la préparation des suspensions érythrocytaires. Les poches de sangs ont été fournies par le Centre de Transfusions Sanguines de la Wilaya de Bejaia.

Pour effectuer cette étude la préparation des suspensions érythrocytaire a été nécessaire, elle a été faite par remplissage des tubes héparinés avec le sang a tester, puis centrifugation à 1500 rpm/ 10 min, élimination de surnageant, par la suite lavage trois fois du culot globulaire avec le tampon phosphate (**Banerjee et al., 2008**). Au final, le surnageant est jeté et puis prélèvement de 500µl du culot globulaire pour préparer une suspension érythrocytaire à hématocrite de 10%.

II-1-3-Equipement, verrerie et produits chimiques

La manipulation de ces échantillons sanguins a été réalisée au niveau du même centre, divers matériel et produits chimiques ont été utilisés durant la période d'expérimentation, ils sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau IV : Equipements, verreries et produits chimiques

Equipement et verreries	Produits chimiques
Balance analytique (RADWAG), agitateurs électromagnétique (VELP), bain marie (MAMMERT), tamiseur électrique (RETSH) avec un tamis (63µm), broyeur électrique (KIKA-WERK), vortex (VELP), centrifugeuse (SIGMA), congélateur -80°C (TELSTAR), pH-mètre (HANNA), Rota vapeur (HEIDOLPH), spectrophotomètre (SHIMADZU), lyophilisateur(CHRIST), laine de verre, Micropipettes (05µL-100µl, 100µl-1000µl), Ependorffs (1ml) ,Eprouvettes, barreau magnétique, ballons a fond plat, entonnoir, erlenmeyers, béchers, tubes a hémolyse tubes a essais, tubes falcons, tubes héparinés.	Folin-Ciocalteux (1N), Rutine, Acide Tannique, acide gallique. Chlorure d'aluminium (AlCl ₃),Chlorure de Sodium (NaCl), Hydrogène Phosphate de Sodium Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ di-hydrogène Phosphate de Potassium, Azide de Sodium (N ₃ Na), Chlorure Ferrique (FeCl ₃), Carbonate de Sodium (NaCO ₃), Acide thiobarbiturique (TBA), Trichloro-Acétique(TCA), Sodium Dodecyl sulfate (SDS), Triéthanolamine (TEA) , Albumine du sérum bovin (BSA), peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂), acide acétique (CH ₃ COOH), Hydroxyde de sodium (NaOH),HCl (chlorure d'hydrogène) Méthanol absolu , Ethanol (96%). *Les réactifs sont majoritairement de marque Sigma. *Les solvants et les acides sont de marque Biochem, Prolab. *L'eau distillée a été récupéré utilisant un distillateur (GFL 2104) au sein du laboratoire Biochimie Appliquée

II-2-Méthodes

II-2-1- Préparation des extraits à partir des feuilles de *F. angustifolia*

Les feuilles utilisées dans cette étude ont été soigneusement mises à sécher à l'abri de la lumière solaire et de la poussière. Elles ont été ensuite finement broyées à l'aide d'un broyeur électrique, le broyat obtenue à été tamisé par une tamiseuse électrique pour obtenir au final une poudre fine et homogène de diamètre inférieur à 63 μ m. Cette dernière a été conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité afin de réaliser deux types d'extraction à base de solvant organique (éthanol) et une décoction à l'eau distillée.



Figure 2 : Photographies de feuilles sèches et de poudre de *F. angustifolia* (Originales).

II-2-1-1- Procédure d'extraction éthanolique

Dans ce travail l'extraction éthanolique a été réalisée par épuisement (macération 3 fois) selon la procédure décrite dans **Ayouni et al. (2016)**. Elle consiste en une macération de la poudre fine obtenue dans l'éthanol avec un rapport de 1 :4 (m/v) pendant 24 heures sous agitation continue à température ambiante.

Le macérât a été laissé décanter pendant 12 heures, puis centrifugé et le surnageant a été séché au rota vapeur. L'extrait a été stocké à 4°C jusqu'à son utilisation.

L'extrait d'éthanol a été pesé pour calculer le rendement d'extraction comme suit :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \frac{\text{Poids de l'extrait sec (mg)}}{\text{Poids de la poudre initial (mg)}} \times 100$$

II-2-1-2 Procédure de préparation de la décoction

Dans un ballon en verre contenant 500 ml d'eau distillée bouillante, 50 g de poudre ont été progressivement ajoutés sous agitation continue et le mélange a été maintenu à 100°C. Par la suite, l'échantillon a été décanté pendant deux heures et le surnageant récupéré a été centrifugé filtré à travers la laine de verre puis surgelé à -80°C pendant une semaine, puis lyophilisé. Le lyophilisat est conservé dans un flacon en verre fermé à température ambiante.

II-2-2- Dosages des contenus phénoliques des extraits éthanolique et aqueux de feuilles de *F. angustifolia*

L'estimation de la quantité des composés phénoliques a savoir les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins présents dans les deux extraits éthanolique et aqueux de feuilles de *F. angustifolia* a été réalisé par des méthodes colorimétriques.

II-2-2-1- Le dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été réalisé selon le protocole de **Kahkonen et al. (1999)**, le réactif utilisé est celui de Folin Ciocalteu, constitué de polyhétérocycles qui seront réduits lors d'oxydation des phénols, ceci se traduit par la coloration bleu violacée et l'absorbance correspondante, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits testés. Expérimentalement les phénols totaux des deux extraits éthanolique et aqueux (dissous dans le DMSO) ont été quantifiés, selon la procédure décrite dans la figure suivante :

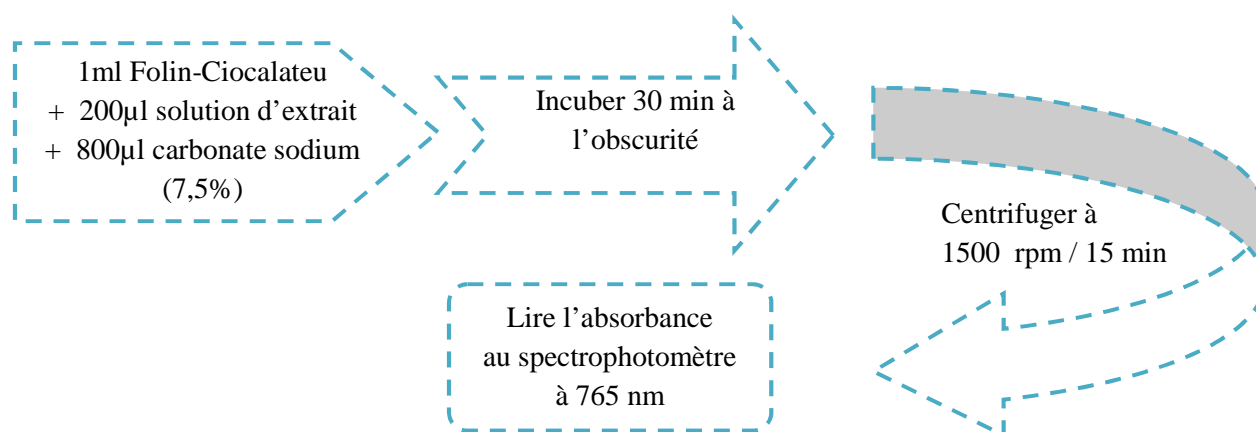


Figure 3: Procédure expérimentale de dosage des phénols totaux dans les extraits éthanoliques et aqueux de feuilles de *F. angustifolia*.

Les tests ont été répétés trois fois contre un blanc, ou la solution d'extrait a été remplacée par du méthanol pour l'extrait éthanolique et par l'eau distillée pour l'extrait aqueux. Une

courbe d'étalonnage (**Annexe 1**) a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme phénol de référence à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec **mg Eq.GA./g d'extrait**.

II-2-2-2- Le dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par colorimétrie selon le protocole de **Maksimovic et al. (2005)**, basé sur la formation d'un complexe à une coloration jaunâtre très stable entre le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et les groupements hydroxydes OH des flavonoïdes. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présents dans l'extrait.

Expérimentalement, la teneur en flavonoïdes des deux extraits éthanolique et aqueux a été quantifié comme récapitulé dans la figure 04 :

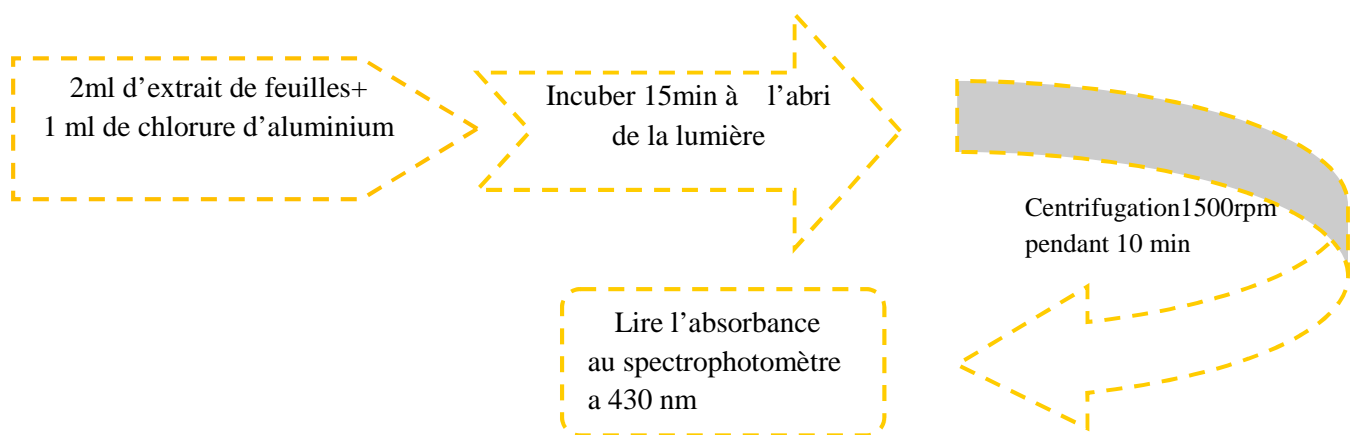


Figure 4: Procédure expérimentale de dosage des flavonoïdes dans les extraits éthanoliques et aqueux de feuilles de *F. angustifolia*.

La concentration des flavonoïdes dans les deux extraits a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (**Annexe 2**) établie dans les mêmes démarches expérimentales par différentes concentrations d'un flavonoïde de référence, la rutine. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent rutine par gramme d'extrait sec **mg Eq.Rut./g d'extrait**.

II-2-2-3- Le dosage des tanins

Le dosage des tannins a été réalisé selon le protocole de **Hagerman et Butler, (1978)**. Le principe de cette méthode consiste à faire précipiter l'Albumine du Sérum de Bovin (BSA) par les tannins présents dans l'extrait. La teneur du précipité en complexe tannins-protéines a été déterminée par spectrophotométrie, après hydrolyse alcaline (SDS/TEA) et réaction de l'hydrolysate avec le chlorure ferrique qui favorise l'apparition d'une couleur violette. Expérimentalement, le taux des tanins présents dans les deux extraits éthanolique et aqueux de feuilles de *F. angustifolia* a été quantifié par la procédure décrite dans le schéma ci-dessous :

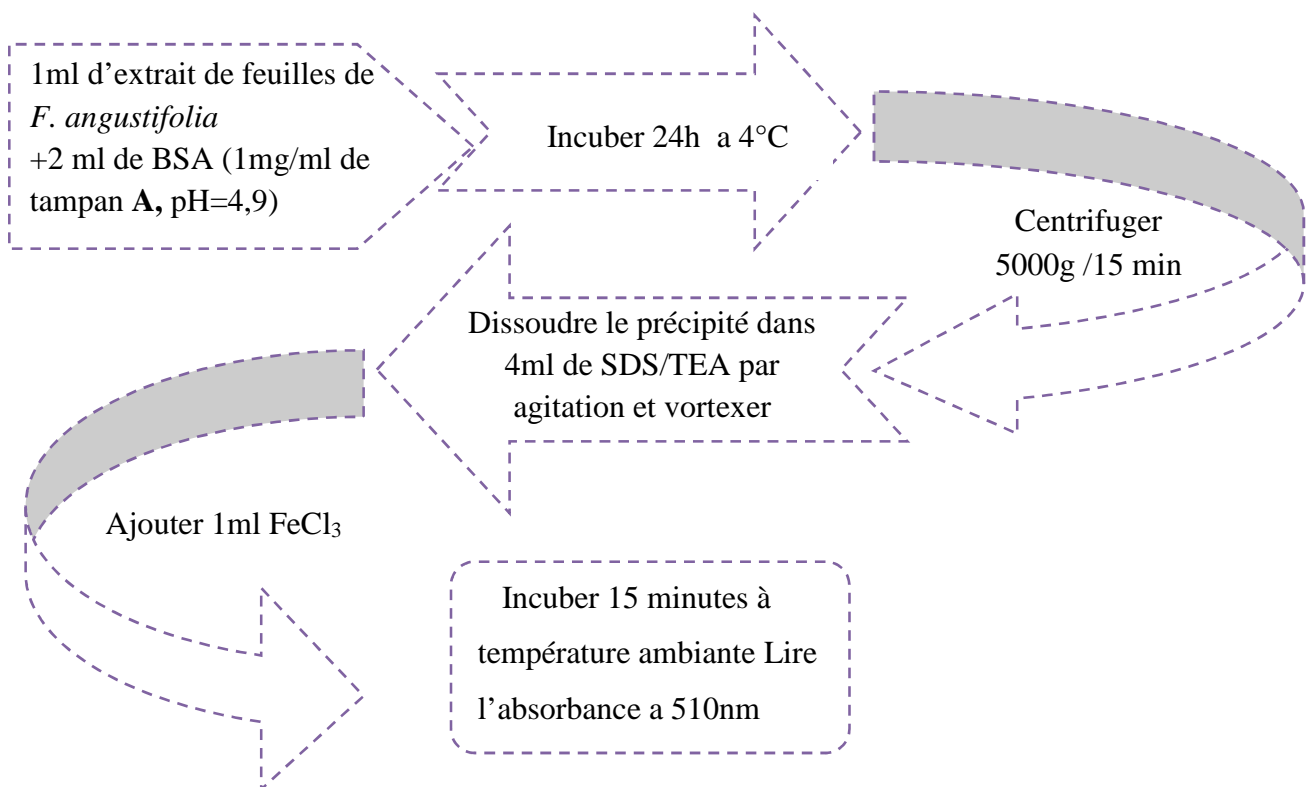


Figure 5: Procédure expérimentale de dosage des tanins dans les extraits éthanoliques et aqueux de feuilles de *F. angustifolia*

La courbe d'étalonnage (**Annexe 3**) a été réalisée en utilisant l'acide tannique comme référence. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide tannique par gramme de l'extrait sec **mg Eq AT/g d'extrait**.

II-2-3-Activités biologiques des extraits de feuilles de *F.angustifolia*

II-2-3-1-Tests d'hémolyse

L'effet hémolytique des extraits bruts éthanolique et aqueux de feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été réalisé, *in vitro*, sur des suspensions érythrocytaires de différents sangs humains, diluées dans un tampon phosphate salin (150mM de NaCl, 0,58mM de KH₂PO₄ et 3,4mM de Na₂HPO₄ à pH 7,4).

L'induction de l'hémolyse et la peroxydation lipidique a été induit par différentes concentrations de H₂O₂ (1mM - 100mM) qui ont été préparées par la solution mère de (100mM) avec du tampon phosphate salin (Włodek et Kusior, 2006).

II-2-3-2-Traitement des érythrocytes par le H₂O₂

Le test d'effet hémolytique de H₂O₂ a été réalisé selon le protocole de Rafat *et al.* (2009) décrit par Sundaram *et al.* (2011), effectué sur des suspensions érythrocytaires à hématocrite de 10%. Dans des tubes à hémolyse, 500µl de H₂O₂ à différentes concentrations (1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 12 mM, 14 mM, 16 mM, 18 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM)ont été ajoutés à 250µl de la suspension érythrocytaire puis incubés au bain marie à 37°C durant 3h. Les tubes ont été homogénéisés délicatement chaque 30 minutes et à la fin de l'incubation le volume totale a été ajusté à 4,5ml avec le tampon phosphate, puis directement centrifugé les tubes à 300rpm /10 minutes. Les absorbances des surnageants ont été enregistrées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible contre un blanc contenant du tampon phosphate au lieu de H₂O₂. Un autre tube a été préparé où le H₂O₂ a été remplacé par l'eau distillée afin d'induire une 'hémolyse maximale par osmose.

II-2-3-3- Evaluation des effets hémolytiques des extraits de feuilles de *F. angustifolia* sur les érythrocytes

L'évaluation du probable effet hémolytique des extraits de feuilles a été étudié selon le protocole de Rafat *et al.* (2009) décrit par Sundaram *et al.*, (2011), par la même démarche expérimentale citée précédemment. Les témoins ont été préparés, une hémolyse totale induite par l'eau distillée et une hémolyse optimale avec le H₂O₂ (8mM). Le volume du H₂O₂ a été remplacé par les différentes concentrations des deux extraits où une gamme allant de 10µg/ml à 2000µg/ml a été testée.

II-2-3-4- Evaluation des effets anti-hémolytiques des extraits de feuilles de *F. angustifolia* sur les érythrocytes

Suite à la réalisation de test hémolytique des extraits aqueux et éthanoliques, les concentrations n'ayant montré de toxicité significative, ont été sélectionnées pour des tests anti hémolytique et anti peroxydation lipidique par le H₂O₂ (8mM), par la même méthode de **Rafat et al., (2009)** décrite par **Sundaram et al. (2011)**. Sauf que le traitement des érythrocytes par le H₂O₂ s'effectue après 30 minutes de préincubation de la suspension érythrocytaire avec les différentes concentrations des deux extraits n'ayant pas exercé un effet hémolytique considérables.

II-2-3-5- Estimation de la peroxydation lipidique par la mesure des MDA

En parallèle à tous les tests d'hémolyse réalisés, la peroxydation lipidique a été suivie par le dosage des MDA en utilisant la méthode de **Okoko et Ere, (2012)**. La détermination de la peroxydation lipidique se fait par la mesure de ces dérivés malondialdéhyde (MDA), donc une révélation colorimétrique a été réalisée par l'ajout de TBA, qui forme en présence des MDA un complexe qui se traduit par une coloration rose claire.

Le contrôle positif consiste à mélanger 250µl de la suspension érythrocytaire, et 500µl d'eau distillée. Quant au contrôle négatif, 500µl de la solution tampon phosphate sont additionnées à 250µl de la suspension érythrocytaire.

Afin d'induire la peroxydation lipidique 250µl de suspension érythrocytaire, et 500µl de H₂O₂ (8mM) le peroxyde d'hydrogène a été introduit dans des tubes à essais. Le contenu à été incubé pendant 1h à 37°C. La réaction a été interrompue par l'addition de 2ml de réactif d'acide thiobarbiturique contenant de l'acide trichloracétique et du HCl (TBA 0,375%, TCA 15%, HCL 0.2M), la solution a été incubée au bain marie à 95°C pendant 1h. Après refroidissement, la solution a été centrifugée à 3000 rpm/10minutes. L'absorbance du surnageant a été mesuré à deux longueurs d'ondes différentes à 532 nm et 600 nm.

L'estimation de la peroxydation lipidique pour le test hémolytique et anti-hémolytique a été réalisée dans les mêmes démarches expérimentales citées précédemment.

III-1-Résultats et interprétations

III-1-1-Taux d'extraction

Les feuilles de *Fraxinus angustifolia* ont été récoltées en été, c'est la période durant laquelle la teneur en composés actifs est optimale. Deux méthodes d'extraction de composés phénoliques ont été utilisées, une extraction à l'éthanol choisie pour extraire le maximum de composés phénoliques, et une décoction à l'eau distillée pour imiter l'utilisation traditionnelle de cette partie de plante.

Les taux d'extraction ont été calculés par rapport à la poudre initiale, que ce soit pour l'extrait éthanolique ou bien l'extrait aqueux, ils varient en fonction des solvants et la procédure utilisés, les pourcentages d'extraction obtenus sont de 19,45 % pour l'extrait éthanolique et 9,7 % pour l'extrait aqueux, on constate que le rendement de l'extraction éthanolique a atteint une valeur deux fois supérieure à celui obtenu par l'extraction aqueuse, témoignant d'une extraction plus efficace à l'éthanol comparativement à la décoction par l'eau distillée.

III-1-1-1- Teneurs en composés phénoliques

L'étude phytochimique réalisée a permis de mettre en évidence qualitativement la présence de quelques types de métabolites secondaires au niveau des feuilles de *F.angustifolia*. Les quantités des phénols totaux, flavonoïdes et tannins ont été déterminées graphiquement par des méthodes colorimétriques et exprimées par référence aux molécules standards, acide gallique, rutine et acide tannique, respectivement. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau (V) :

Tableau V : Les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tanins dans les extraits éthanolique et aqueux des feuilles de *F. angustifolia*. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type. **ext**: extrait sec. **mg.Eq.AG/g d'ext.** : Milligramme équivalents acide gallique par gramme d'extrait sec. **mg.Eq.Rut/g d'ext.** : Milligramme équivalents acide gallique par gramme d'extrait sec. **mg.Eq.AT/g d'ext.** : Milligramme équivalents acide gallique par gramme d'extrait sec.

Extrait	Phénols totaux (mg Eq.A.G/g d'ext.)	Flavonoïdes (mg Eq.Rut./g d'ext.)	Tanins (mg Eq.A.T./g d'ext.)
Ethanolique	47,86 \pm 0,05	77,00 \pm 0,007	581,49 \pm 0,04
Aqueux	24,73 \pm 0,13	9,26 \pm 0,0019	22,22 \pm 0,006

D'après le **tableau VI** la teneur en phénols totaux dans l'extrait éthanolique ($47,86 \pm 0,05$) est presque deux fois plus élevée comparativement à celle obtenue dans l'extrait aqueux ($24,73 \pm 0,13$), de même une concentration largement plus élevée des flavonoïdes a été enregistrée pour l'extrait éthanolique ($77,00 \pm 0,007$) par rapport à l'extrait aqueux ($9,26 \pm 0,0019$). Les teneurs en tannins de l'extrait aqueux ($22,22 \pm 0,006$) sont relativement trop faibles par rapport à l'extrait éthanolique ($581,49 \pm 0,04$), ceci indique qu'à partir de la même matrice végétale les rendements des extractions ainsi que les teneurs des extraits en phénols totaux, flavonoïdes et tanins varient en fonction du solvant et la procédure d'extraction adoptée.

III-1-2-Traitement des érythrocytes par le peroxyde d'hydrogène

La méthode utilisée pour induire l'hémolyse des érythrocytes est basée sur l'oxydation des membranes érythrocytaires par le H_2O_2 , les résultats sont exprimés en pourcentage (%) montrés dans la **figure (6)** :

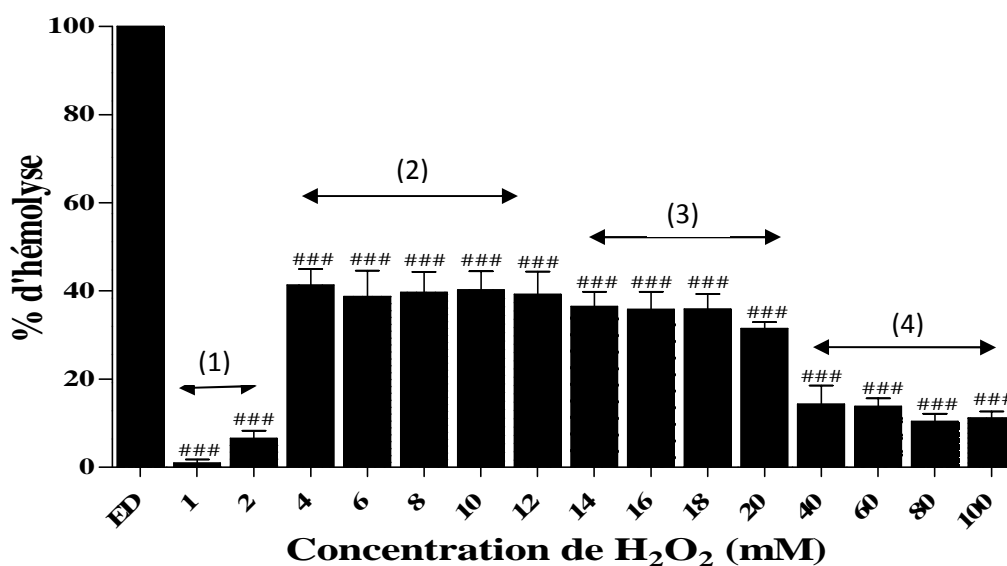


Figure 6 : Effet hémolytique de H_2O_2 sur des érythrocytes humains à différentes concentrations. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. ($n=4$), ### $P < 0,001$ indique une différence significative par rapport au contrôle ED: eau distillée, par un test *one way* ANOVA avec le post-test Dunnett du logiciel Graph Pad Prism 5.3. (1) : [1-2mM], (2) : [4-12mM], (3) : [14-20mM], (4) : [40-100mM].

Cette étude a démontré que le traitement des érythrocytes par le H_2O_2 à faibles concentrations (1mM et 2mM) n'induit qu'une faible hémolyse de 0,96% et 6%, respectivement (**Figure 6 (1)**), contrairement à celle observée à 4mM ou il a atteint un pourcentage très élevé de 41,31%, à partir de laquelle on remarque un plateau presque stable jusque à 12mM (**Figure 6 (2)**) avec des pourcentages ne dépassant pas les 40,23%

d'hémolyse. A des concentrations supérieures (14 mM-20mM) une légère diminution du pourcentage d'hémolyse a été observé (**Figure 6 (3)**). Enfin, pour de plus fortes concentrations (40mM à 100mM), une diminution importante d'hémolyse à été remarquée, elle varie entre 10,39% à 14,29% (**Figure 6 (4)**), ceci indique que le traitement des érythrocytes par le H₂O₂ a entraîné des dommages cellulaires avec une hémolyse maximale de 41,31%. Tous les taux d'hémolyse obtenus par les différentes concentrations du H₂O₂ restent significativement inférieurs à celle induite par l'eau distillée (###P <0,001).

III-1-2-1- Mesure des dérivés de la peroxydation lipidique (MDA)

Les marqueurs de la peroxydation lipidique dérivent de l'attaque de l'ensemble des acides gras polyinsaturés, le plus connu est un aldéhyde, le malondialdéhyde (MDA). Le dosage de ce dernier a été réalisé dans tous les tests des différentes concentrations H₂O₂ pour leurs pouvoir hémolytique et peroxydant. Les résultats sont exprimés en µmol/ml de suspension érythrocytaire, et représenté dans la **figure (7)** :

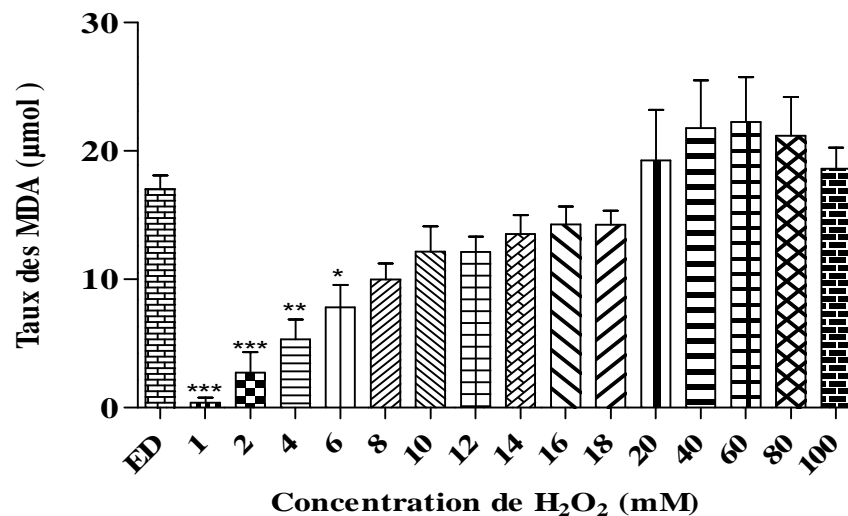


Figure7 : Taux de MDA marqueur de la peroxydation lipidique induite par le H₂O₂ sur des érythrocytes humains à différentes concentrations. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± S.E.M. (n=4), ###P <0,001 indique une différence significative par rapport au contrôle ED : eau distillée, par un test *one way* ANOVA, avec le post-test Dunnett du logiciel Graph Pad prism 5.3.

D'après l'histogramme, on constate une nette augmentation des taux de MDA en fonction de la concentration de H₂O₂, ceci est un indice d'une augmentation de la peroxydation lipidique. On remarque une augmentation proportionnelle de la concentration de H₂O₂, notamment dans la gamme de concentrations allant de 1 à 10 mM, suivi d'une stabilité des

taux de MDA entre 10 mM à 18 mM, puis une augmentation importante au delà de 20mM jusqu'à 100 mM .

Après l'analyse de ces résultats la concentration de H₂O₂ (8 mM) a été sélectionnée pour les tests anti-hémolytiques. C'est une concentration moyenne ayant donnée les mêmes résultats d'hémolyse avec la gamme de concentration 4 mM à 12 mM. De plus, à cette concentration l'effet de H₂O₂ s'est exprimé par un taux considérable de MDA. Ce taux de MDA est considérable pour les prochains tests d'inhibition.

III-1-3-Test de toxicité des deux extraits sur les érythrocytes en suspensions

Pour évaluer l'activité hémolytique, *in vitro*, des extraits éthanolique et aqueux des feuilles de *F. angustifolia*, différentes concentrations ont été testées sur des suspensions érythrocytaires à hématocrite de 10%. Les taux d'hémolyse sont indiqués dans la **figure (8)** :

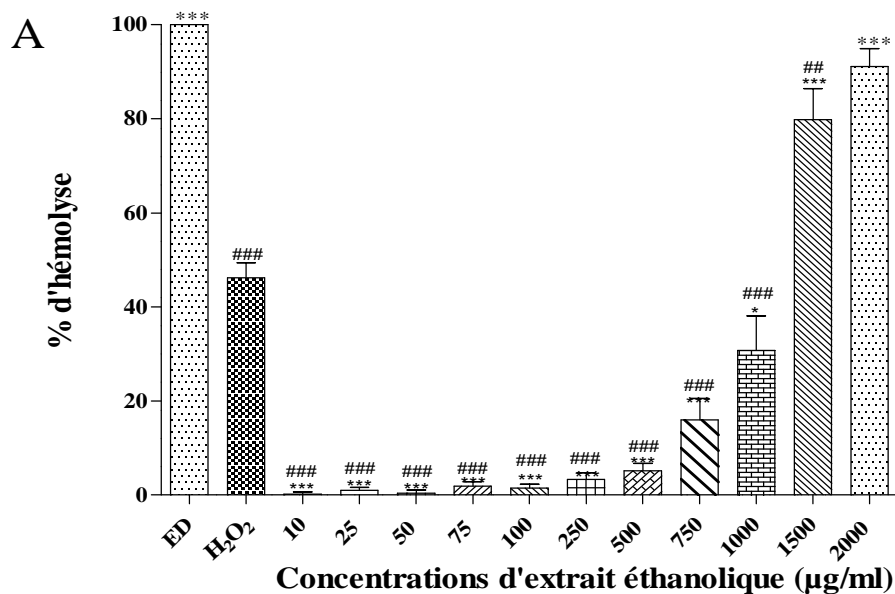


Figure 8(A): Test de toxicité de l'extrait éthanolique de feuilles de *F. angustifolia* sur les érythrocytes humaines. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.E.M.(n=4), ***P <0,001 indique une différence significative par rapport au contrôle (H₂O₂) et ###P <0,001 indique une différence significative par rapport au contrôle (ED : eau distillée), par un test *one way* ANOVA, avec le post-test Dunnett du logiciel Graph Pad Prism.5.3.

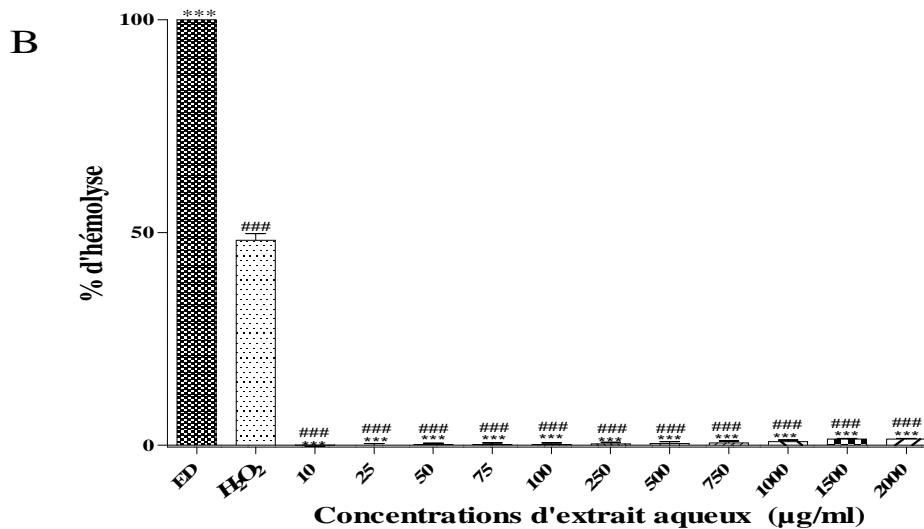


Figure 8 (B) : Test de toxicité de l'extrait aqueux de feuilles de *F. angustifolia* sur les érythrocytes humaines. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.E.M.(n=4), ***P <0,001 indique une différence significative par rapport au contrôle (H₂O₂) et ###P <0,001 indique une différence significative par rapport au contrôle (ED : eau distillée), par un test *one way* ANOVA, avec le post-test Dunnett du logiciel Graph Pad Prism.5.3.

D'après les résultats obtenus, l'extrait éthanolique ne présente pas de toxicité hémolytique significative (###P <0,001 et ***P <0,001) par rapport à celle présentées par les témoins eau distillée et H₂O₂, respectivement. L'analyse statistique a révélée que l'activité hémolytique de l'extrait éthanolique (A) est significativement (***P <0,001) réduite comparativement à celle induite par le H₂O₂, avec une hémolyse négligeable pour la gamme de 10µg/ml-500µg/ml. A partir de la concentration de 750µg/ml jusqu'à 2000µg/ml, on constate une augmentation de l'effet hémolytique pour atteindre une hémolyse maximale à 2000µg/ml, comparable à celle de l'eau distillée.

A partir de ces constatations la gamme de concentration de 10µg/ml à 500µg/ml a été retenue pour les tests anti-hémolytiques de l'extrait éthanolique contre l'hémolyse induite par le H₂O₂ (8 mM).

La figure (9 B), montre clairement que l'extrait aqueux a présenté de très faibles activités hémolytiques, voire négligeables comparativement à celle induite par le H₂O₂, même à la plus forte concentration testée (2000µg/ml). De ce faite, toutes ces concentrations ont été reprises dans les tests anti-hémolytiques.

III-1-3-1-Estimation des taux de MDA après traitement par l'extrait éthanolique et aqueux de *F. angustifolia*

Dans le but d'évaluer la peroxydation lipidique de l'extrait de feuilles de *F. angustifolia* sur les érythrocytes humains. Le malondialdéhyde, qui est un marqueur clé du phénomène de la peroxydation lipidique, a été dosé et les résultats sont résumés dans la **figure (9)** :

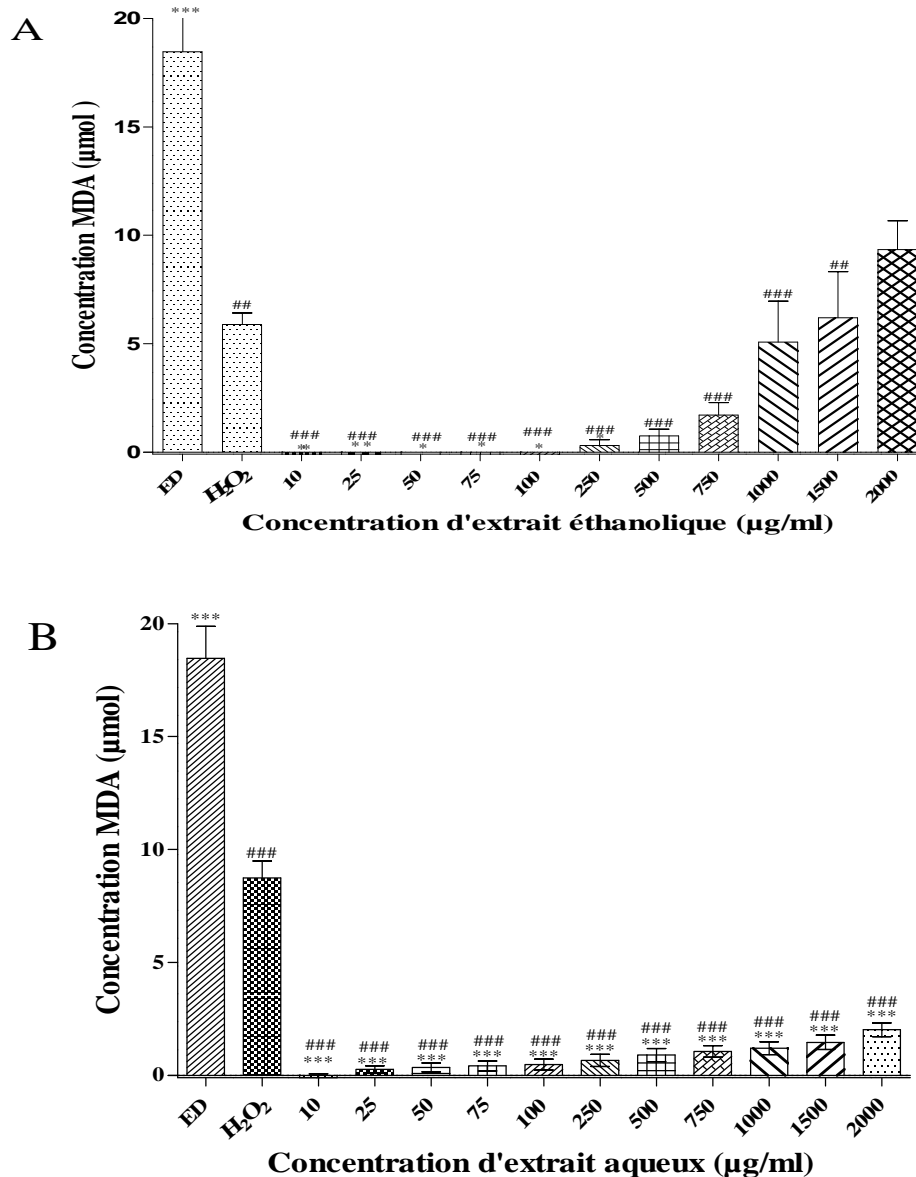


Figure 9 : Taux des MDA, marqueur de la peroxydation lipidique, obtenue par les traitements des érythrocytes humains par différentes concentrations l'extrait éthanolique (A) et extrait aqueux (B) de feuilles de *F. angustifolia*. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. (n=4). Les résultats sont considérés significatifs à (# P < 0,001) comparativement au contrôle eau distillée et (*P < 0,001) comparativement au traitement H₂O₂ (8mM), par un test *one way* ANOVA, avec post-test Dunnett du logiciel Graph Pad prism.5.3.

D'après l'histogramme, les taux de MDA induits par les différentes concentrations d'extrait éthanolique (A) présentent une allure comparable à celle représentée dans la **figure 8 (A)**. En effet, de 10 μ g/ml à 100 μ g/ml aucune production de MDA n'a été observée, et de faibles taux de MDA ont été remarqués à 250 μ g/ml et 500 μ g/ml, pour augmenter ensuite de façon dose dépendante à partir de 750 μ g/ml jusqu'à 2000 μ g/ml, avec un taux statistiquement non significatif comparativement au traitement par le H₂O₂.

D'autres parts, les MDA obtenus par les différentes concentrations de l'extrait aqueux (B) sont significativement (*P< 0,001), (#P< 0,001) inférieurs au taux des MDA obtenus au niveau des témoins eau distillée et H₂O₂.

III-1-4- Effet anti-hémolytique et anti-péroxydant de deux extraits

III-1-4-1- Evaluation des effets anti-hémolytiques des extraits de feuilles de *F. angustifolia* sur les érythrocytes

La capacité des extraits éthanolique et aqueux *F. angustifolia* à protéger les érythrocytes humains de la lyse cellulaire induite par le H₂O₂ (8mM), a été étudiée par préincubation, des érythrocytes avec ces extraits avant leur traitement par le H₂O₂. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hémolyse, illustrés dans les histogrammes (A) et (B) de la **figure (10)**, et en pourcentages d'inhibitions relatifs montrés dans le **Tableau VI**.

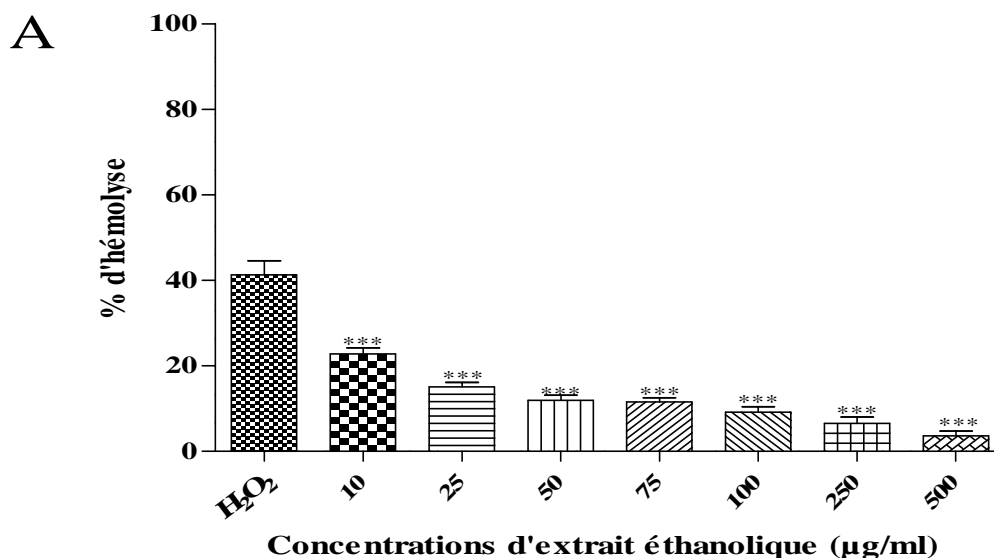


Figure 10 (A): L'effet anti-hémolytique de différentes concentrations d'extrait éthanolique de feuilles de *F. angustifolia* sur l'hémolyse induite par H₂O₂ (8mM) sur les érythrocytes humains. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. (n=4), ***P < 0,001 indique une différence significative par rapport au contrôle H₂O₂, par un test *one way* ANOVA, avec le post-test Dunnett du logiciel Graph Pad Prism5.3.

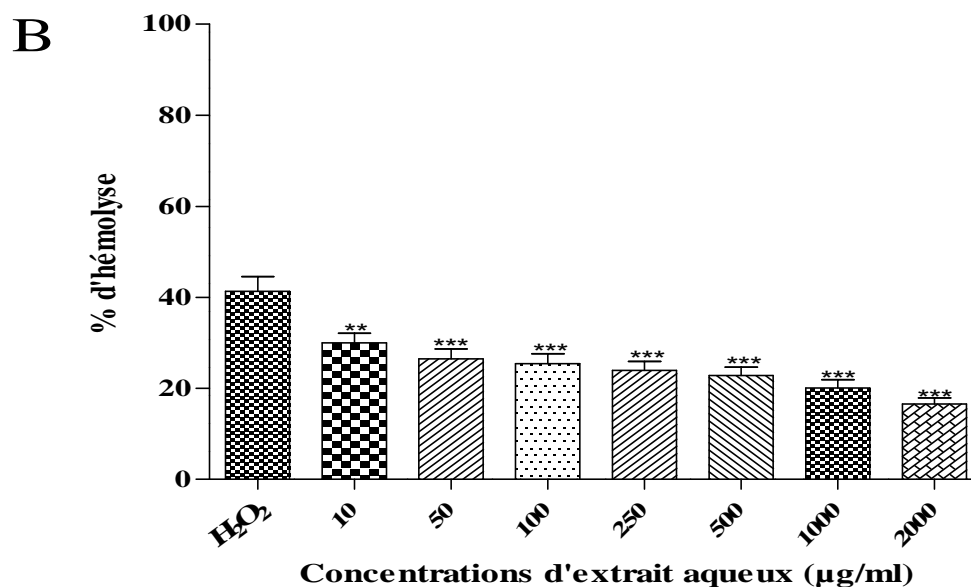


Figure 10 (B): L'effet anti-hémolytique de différentes concentrations d'extrait aqueux (B) de feuilles de *F. angustifolia* sur l'hémolyse induite par H₂O₂ (8mM) sur les érythrocytes humains. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± S.E.M. (n=4), ***P <0,001 indique une différence significative par rapport au contrôle H₂O₂, par un test *one way* ANOVA, avec le post-test Dunnett du logiciel Graph Pad Prism5.3.

L'analyse des effets anti-hémolytiques de différentes concentrations des extraits a révélé que l'extrait éthanolique a induit une diminution significative d'hémolyse (**P <0,001) par rapport à celle présentée par le témoin H₂O₂. Cette diminution indique un effet anti-hémolytique dépendant de la concentration d'extrait éthanolique (**Figure 10 (A)**) L'effet maximale a été obtenu à 500µg/ml avec un pourcentage d'hémolyse de 3,61% à une concentration de 500µg/ml. A cette concentration (500µg/ml), l'extrait éthanolique s'est avéré plus efficace comparativement à l'extrait aqueux (**Figure 10 (B)**) qui présente un pourcentage d'hémolyse considérable de (22,82%). L'effet anti-hémolytique de l'extrait aqueux s'est exprimé par de diminutions progressives en fonction de la concentration.

Les pourcentages d'inhibitions d'hémolyse érythrocytaire par les deux extraits sont illustrés dans le **tableau VI**:

Tableau VI : Pourcentages d'inhibition d'hémolyse induite par le H₂O₂ après traitement par les deux extraits de feuilles de *F. angustifolia*

Concentration d'extrait (µg /ml)	%d'inhibition d'hémolyse des érythrocytes par l'extrait éthanolique	%d'inhibition d'hémolyse des érythrocytes par l'extrait aqueux
10	44,49 ± 1,30	26,81 ± 3,55
25	63,21 ± 1,44	-NT-
50	70,99 ± 1,73	35,19 ± 6,15
75	72,06 ± 1,79	-NT-
100	77,86 ± 1,65	37,63 ± 5,61
250	84,11 ± 3,49	41,31 ± 4,83
500	91,25 ± 2,67	44,43 ± 3,17
1000	-NT-	50,98 ± 2,99
2000	-NT-	59,88 ± 1,826

MDA : Malondialdéhyde. NT: non testés

D'après le tableau ci-dessus, il est à noter que l'extrait éthanolique a présenté une gamme d'inhibition (44,49-91,25%) avec les concentration allant de 10 à 500µg/ml, comparativement à l'extrait aqueux qui présente des pourcentages d'inhibition de 26,81 à 59,88% avec une gamme de concentration allant de 10 à 2000µg/ml., induisant une efficacité anti-hémolytique plus importante en faveur de l'extrait aqueux.

Les pourcentages d'hémolyse en présence des extraits à toutes les concentrations testées sont significativement inférieurs (**P<0,001) aux % induit par le H₂O₂ (8mM).

III-1-4-2- Mesure de l'effet anti-péroxydant de deux extraits par le dosage des MDA

Les taux des MDA produits dans les tests hémolytiques du H₂O₂ (8mM) en présence des extraits éthanolique et aqueux à différents concentrations ont révélé des effets anti-péroxydants, illustrés dans les figures **11(A)** et **11(B)**. Une analyse statistique comparative des taux de MDA produits dans les tests anti-hémolytiques en présence de différentes concentrations des extraits de feuilles de *F. angustifolia* par rapport à celle du H₂O₂ (8mM) a été réalisée, les résultats sont présentés dans la **figure (11)** :

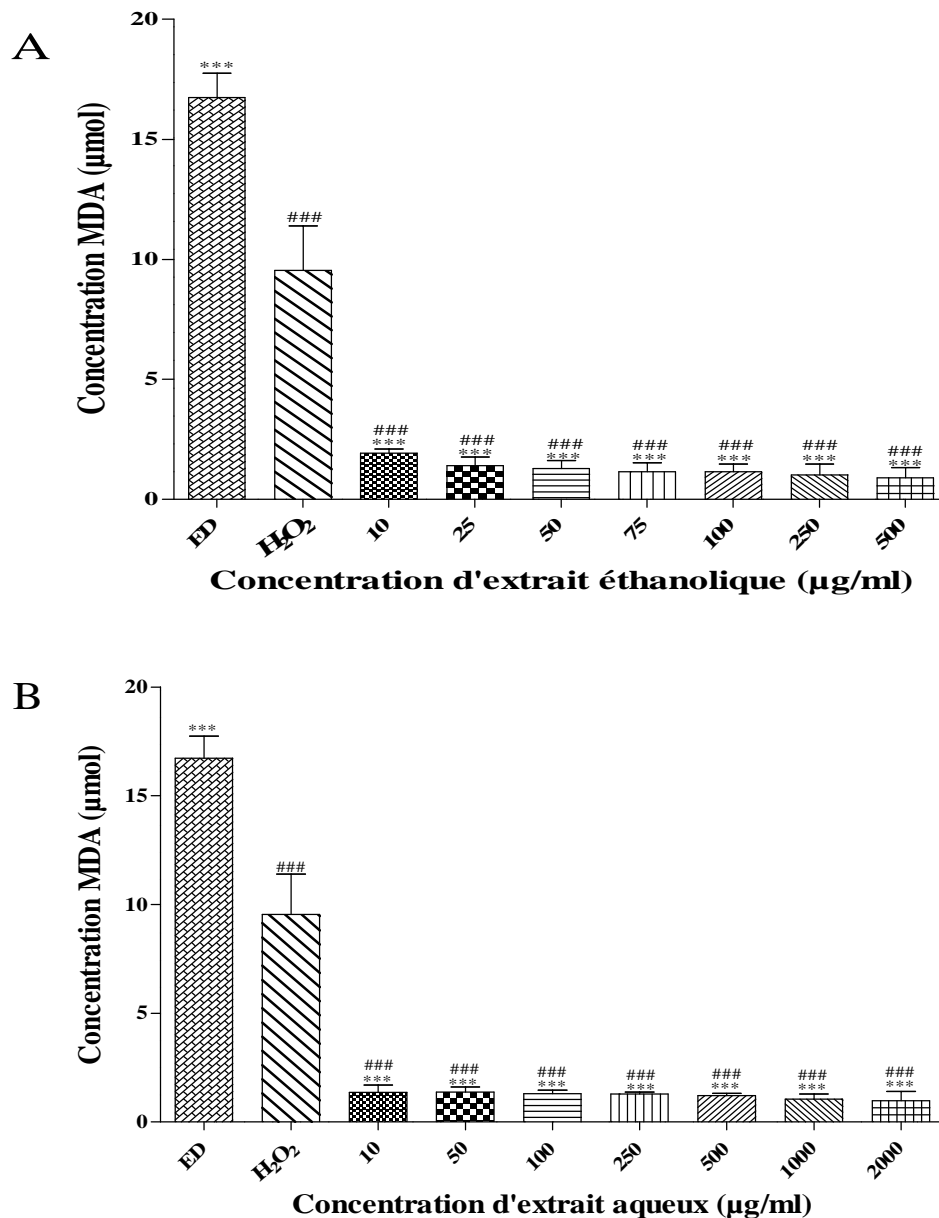


Figure 11 : Taux des MDA, marqueurs de la peroxydation lipidique traiter par l'extrait éthanolique (A) et extrait aqueux (B) de feuilles de *F. angustifolia* sur les érythrocytes humains. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm S.E.M. (n=4). Les résultats sont considérés significatifs à (# P< 0,001) comparativement au contrôle eau distillée et (*P< 0,001) comparativement au traitement par le H₂O₂, par un test *one way* ANOVA, avec le post-test Dunnett du logiciel Graph Pad prism5.3.

L'analyse statistiques des résultats représentés sur les histogrammes ci-dessus a révélé une diminution significative pour les taux des MDA produits par l'extrait éthanolique (A) et l'extrait aqueux (B) comparés à l'eau distillée (###p <0,001) et le H₂O₂ (8mM) (**p<0,001).

Les concentrations des MDA induits en présence de toutes les concentrations des deux extraits aqueux ont été presque semblables dans toutes les concentrations testées, aussi bien pour l'extrait éthanolique (A) ou bien l'extrait aqueux (B). Néanmoins, on remarque pour les

deux extraits que les fortes concentrations (500 μ g/ml et 2000 μ g/ml) ont donné les plus faibles taux des MDA, indiquant des effets anti peroxydant intéressants exprimés en % d'inhibition illustrés dans le tableau suivant :

Tableau VII : Pourcentages d'inhibition de taux de MDA produits après traitement par H₂O₂ en présence des deux extraits de feuilles de *F. angustifolia*

Concentration d'extrait (μ g /ml)	% d'inhibition de MDA pour l'extrait éthanolique	% d'inhibition de MDA pour l'extrait aqueux
10	67,76 \pm 2,95	77,41 \pm 5,88
25	76,60 \pm 6,15	-NT-
50	78,48 \pm 5,72	77,05 \pm 3,79
75	80,53 \pm 6,08	-NT-
100	80,62 \pm 5,31	78,21 \pm 2,74
250	82,76 \pm 7,41	78,39 \pm 1,34
500	84,91 \pm 7,15	79,82 \pm 1,98
1000	-NT-	82,49 \pm 4,05
2000	-NT-	83,66 \pm 7,23

MDA : Malondialdéhyde. NT: non testés

Le traitement par les extraits de feuilles de *F. angustifolia* à inversé partiellement la toxicité causée par le H₂O₂. En effet, toutes les concentrations ont garanti une bonne protection contre les altérations des membranes cellulaires induites par le H₂O₂, d'où leurs fortes inhibitions par les deux extraits. L'extrait éthanolique et aqueux ont présentés une meilleure activité anti-hémolytique, et anti peroxydation lipidique.

III-2- Discussion

Plusieurs expérimentations ont déterminé que le taux de métabolites secondaires tels que les composés phénoliques sont extraits des plantes médicinales, qui contiennent un pouvoir antioxydant grâce à leurs groupements hydroxyles, protègent contre les radicaux responsables de diverses pathologies.

Deux différentes extractions à partir des feuilles de *F.angustifolia* ont été réalisées, le taux de l'extraction éthanolique obtenue a été plus élevé par rapport à celui de l'extraction aqueuse. La différence dans les teneurs obtenues peut être expliquée par la nature des composé actifs extraits, la granulométrie de la poudre végétale qui peut augmenter la surface d'échanges entre le solvant et la poudre ainsi que les conditions d'extractions (**Bonnaillie et al., 2012**). On peut suggérer aussi que cette différence revient à la durée de la macération, au nombre d'épuisements effectués sur chaque échantillon, mais aussi la chaleur appliquée pour la préparation de la décoction.

De même des études ont montré que les taux d'extraction sont influencés par le type de solvant, ainsi il a été prouvé que l'éthanol est le meilleur solvant pour extraire le maximum de composés phénoliques (**Cowan, 1999**), il est connu pour sa capacité à extraire les composés polaires mais aussi apolaires, contrairement à l'eau distillée qui extrait que les substances fortement polaires (**Bonnaillie et al., 2012**).

Les composés phénoliques tels que les phénols totaux, flavonoïdes et tannins, forment les groupes de composés phytochimiques le plus important des plantes. Les résultats de dosage montrent que la teneur en tannins est plus élevée dans l'extrait éthanolique, cela peut être expliqué par la richesse de ces derniers en groupements hydroxyles OH (**Bravo, 1998**), ce qui favorisent leur solubilité dans les alcools tel que l'éthanol, néanmoins c'est une classe de composé à structure complexe vue leurs poids moléculaire élevée et le degré de leur polymérisation, ce qui limiterait leurs solubilité dans les phases aqueuses (**Mahmoudi et al., 2013**). Une étude menée par **Medjahed et al. (2016)** sur la même partie de plante a prouvé sa richesse en flavonoïdes (100,29 mg Eq rut./g E.) un taux comparable à celui obtenu pour l'extrait éthanolique (77 mg Eq rut/g E.) dans ce présent travail.

Une autre étude menée par **Berboucha et al. (2009)** sur la même plante présente une légère similitude dans les taux des composés phénoliques comparants avec les teneurs obtenues actuellement, essentiellement les phénols totaux, alors que pour les teneurs en flavonoïdes et

tannins elles sont est bien supérieures par rapport à la leur, ces différences peuvent être dues au reflet des facteurs climatiques et les régions de la récolte. Ces métabolites sont largement rapportés pour leurs activités biologiques, notamment anti-oxydantes par différents protocoles et modèles expérimentaux.

Le globule rouge, reste un modèle d'étude cellulaire intéressant car sa structure est simple et sa fonction de transport de l'oxygène et d'hémoglobine l'expose particulièrement aux attaques radicalaires (**Antonelou et al., 2010**). Il est ainsi vulnérable à l'oxydation à cause de son contenu riche en acides gras polyinsaturés, son environnement saturé en oxygène moléculaire, ainsi que la présence de métaux de transition tels que le fer et le cuivre (**Rocha et al., 2009**).

Le H_2O_2 est l'une des EROs les plus puissantes, elle exerce un effet sur les érythrocytes favorisant leur peroxydation lipidique, par conséquent la mort cellulaire (**Edwards et Fuller, 1996**). Selon les résultats obtenus, on a constaté que le H_2O_2 a exercé un pouvoir hémolytique à des concentrations considérables, ces résultats sont en accord avec ceux de **Clemens et Waller, (1987)**. Cette hémolyse est due à l'oxydation des érythrocytes par le H_2O_2 suite à sa diffusion à travers les membranes érythrocytaires, ce phénomène peut s'expliquer par la réaction de Fenton où l'oxygène se lie avec le peroxyde d'hydrogène dans le milieu intracellulaire qui favorise l'oxydation de l'hémoglobine à fer ferreux (Fe^{2+}) en méthémoglobine à fer ferrique (Fe^{3+}), puis formation du radical hydroxyle $\cdot OH$, qui agit sur les lipides membranaires érythrocytaires, provoquant ainsi une lyse des membranes érythrocytaires, puis la libération de l'hémoglobine (**Iuchi, 2012**), exprimant des taux d'hémolyse induit par le stress oxydatif.

L'intensité de la coloration rouge est proportionnelle au taux d'hémolyse. La diminution de taux d'hémolyse trouvé à des concentrations plus élevées de H_2O_2 , peut se justifier par l'action de polymérisation des globules rouges et donc la précipitation des hématies et la transformation du globule rouge en agrégats, mais aussi par l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine et en sous-produits radicalaires. L'hémoglobine dénaturée est due à la formation de liaisons transversales disulfures entre les chaînes des globines formant des corpuscules appelés corps de Heinz (**Chiu et Lubin, 1989**), puis la précipitation de ces derniers. Cette dénaturation de l'hémoglobine s'accompagne par la perte de sa configuration spatiale et du détachement de l'hème des globines (**Rother et al., 2005**).

L'hème libre s'intercale dans les lipides des membranes cellulaires et induit par peroxydation l'altération membranaire avec comme conséquence l'augmentation de la perméabilité membranaire (**Battacharia et al., 1997**). Par ailleurs, l'augmentation du taux de MDA est le résultat de l'augmentation de l'attaque du peroxyde d'hydrogène sur des acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire, provoquant la peroxydation lipidique (**Battacharia et al., 1997**).

Il est admis par l'ensemble des recherches que les activités biologiques sont dépendantes de la dose, ceci est de même pour la bioactivité et la toxicité d'une substance. Dans cette étude les doses utilisées pour les activités anti-hémolytiques ont été déterminées après une étude de toxicité des extraits étudiés, qui consiste à évaluer l'hémolyse et la peroxydation induites par les extraits eux mêmes.

Dans ce contexte les deux extraits ; éthanolique et aqueux de *Fraxinus angustifolia* ont été testés sur des érythrocytes humains. Les résultats indiquent que l'extrait éthanolique à de fortes doses (1000µg/ml -2000µg/ml) induit une hémolyse de (79-91%), respectivement, et ceci est en concordance avec la notion que toute substance biologiquement active est susceptible de produire des effets indésirables, voire nocifs à de fortes doses. La toxicité de cet extrait de feuilles de *F.angustifolia* à une concentration très élevée sur les globules rouges est probablement due à la richesse de cette plante en flavonoïdes qui se comporte comme pro-oxydant à de fortes doses (**Deker, 1997**).

L'extrait aqueux, par contre, n'a pas provoqué une hémolyse significative même à des doses élevées (1500µg/ml-2000µg/ml) est ceci peut être due à la nature des polyphénols extraits, à l'effet de la température qui favoriserait l'hydrolyse de substances à structures complexes impliquée dans cette toxicité, tel est le cas des tanins qui sont connus pour leurs toxicités à de fortes doses par des interactions non spécifiques (**Furlan et al., 2014**).

Cette hémolyse est accompagnée d'une peroxydation lipidique de la membrane des érythrocytes. Le marqueur de la peroxydation lipidique utilisé généralement en biologie est le malondialdéhyde (MDA), produit lors de la rupture des AGPI possédant au moins trois doubles liaisons. La réaction de son dosage repose sur la formation au milieu acide et à chaud d'un pigment rose entre les MDA et l'acide thiobarbiturique. Cette réaction colorée mesure non seulement les MDA dérivés de la réaction mais aussi ceux pré-existants, formés par la décomposition thermique. D'autres produits d'oxydation des acides gras et d'autres molécules réagissent également avec le TBA dans un milieu acide et à chaud (**Lefèvre et al., 1998**).

Le résultat obtenu indique une augmentation proportionnelle de taux de MDA avec les concentrations d'extrait qui se traduit par la capacité de ce dernier, à de fortes doses, de former des radicaux libres qui peuvent induire une peroxydation lipidique.

Les gammes de concentrations non toxiques des deux extraits ont été testées pour leurs effets anti-hémolytiques dans les marges de concentrations sélectionnées en présence d'inducteur de l'hémolyse (H_2O_2 8mM). D'après Les résultats obtenus, une diminution proportionnelle de taux d'hémolyse induit par H_2O_2 en présence des différentes concentrations des extraits a été notée, ce qui indique que les extraits ont pu protéger les érythrocytes contre les dommages induits par le H_2O_2 . La forte activité des extraits serait attribuée à leur contenu phénolique et teneurs en flavonoïdes qui caractérisent *F. angustifolia* (Kostova et lossifova, 2007).

Il en ressort que les polyphénols tels que les flavonoïdes des extraits de feuilles de *F. angustifolia* pourraient agir par le même mécanisme que les antioxydants pour assurer la stabilité membranaire des érythrocytes. L'efficacité des antioxydants à piéger les radicaux libres est hautement liée aux interactions électrostatiques, interactions hydrophobiques avec les chaînes d'acides gras, à la formation des ponts hydrogène avec les groupements polaires des phospholipides, à la géométrie moléculaire des phospholipides, et à la localisation subcellulaire des ligands à proximité des sites de production des EROs (Tsuchiya *et al.*, 2001; Sánchez-Gallego *et al.*, 2011).

Les antioxydants les plus apolaires s'insèrent plus profondément dans la partie hydrophobe de la bicouche lipidique de la membrane, tandis que les antioxydants de moyenne polarité se situent principalement plus près de la phase aqueuse polaire de la membrane (Hendrich, 2006). Ces composés peuvent par conséquent s'accumuler à la surface membranaire du côté extra et intra cellulaire quand une association à polarité variable est obtenue. Par cette interaction ces polyphénols pourraient agir sur le maintien de l'intégrité membranaire en réduisant l'accès aux molécules délétères à la double région hydrophobe.

Les acides phénoliques simples à savoir *P*-coumarique, caféique ont été étudiés pour leurs interactions avec un modèle de lipides membranaires, ceci dans le but de mieux comprendre leurs biodisponibilités et leurs activités biologiques obtenues par des tests *in vivo*. Les résultats ont montré que l'acide *P*-coumarique, étant le moins polaire, présente l'effet le plus élevé sur la structure de la membrane lipidique, cependant les acides caféique ont moins d'effets sur la rigidité et la dynamique des chaînes phospholipidiques (Ota *et al.*, 2011).

Le verbascoside, un dérivé de l'acide caféique, est un phenylpropanoïde glucoside soluble dans l'eau et majoritaire dans les extraits de *Fraxinus angustifolia* (Ayouni *et al.*, 2016). C'est un puissant antioxydant qui montre de fortes affinités aux membranes, assurant ainsi leurs protections contre l'oxydation et le maintien de leurs fluidités. Malgré son caractère hydrophile, le radical caffeoyl de verbascoside s'insère profondément dans le core hydrophobe de la membrane (Liu *et al.*, 2003 ; Funès *et al.*, 2010)

Une étude menée par Whang *et al.*, (2005) ont montré l'effet préventif de la fraxine qui est une coumarine caractéristique des espèces *Fraxinus* et ce par sa capacité de réduire la peroxydation des lipides et le niveau des espèces réactives de l'oxygène.

Une étude menée par Asgary *et al.*, (2005) a affirmé les propriétés antioxydantes de la quercitrine, présente parmi les flavonoïdes de *Fraxinus angustifolia* (Ayouni *et al.*, 2016), qui a inhibé l'hémolyse de 35,5% à la plus forte concentration (10 µg /ml), la quercitrine diminue l'hémolyse de manière dose-dépendante. Une autre étude menée par le même auteur sur autre flavonoïde, le kaempférol a inhibé la peroxydation lipidique et l'hémolyse de 26,9% à la concentration maximale (10 µg /ml). Ceci expliquerait les effets anti-hémolytiques exhibés par les extraits de *F. angustifolia*. Dans la même étude, la diminution des concentrations de kaempferol a entraîné des taux plus faibles d'inhibition de l'hémolyse, ainsi que l'inhibition de la peroxydation lipidique induite par H₂O₂, ce pouvoir antioxydant a été lié aux composés phénolique des extraits (Asgary *et al.*, (2005).

Furlan *et al.* (2014) ont étudié l'efficacité anti-oxydante des tannins du vin rouge sur un modèle membranaire contenant des phospholipides doubles insaturés. Une corrélation positive a été trouvée entre l'activité anti-oxydante et la localisation de ces tannins à l'interface de la membrane, inséré au niveau du squelette glycérol, une position clé pour prévenir les chaînes d'oxydation qui puissent se produire dans le core de la bicouche lipidique. Donc l'efficacité antioxydante des polyphénols ne peut pas être liée uniquement à leur activité scavenging de radicaux attribué à leurs fonctions hydroxyles, mais aussi à leur capacité de former une couche protectrice au niveau de la surface membranaire.

Cet ensemble de données bibliographiques constituent des arguments expérimentaux qui justifieraient les effets antioxydants et anti-hémolytiques obtenus par les deux extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

-A-

- Aguilar-Martinez, P. (2007).** H2-Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2-Faculté de Médecine Montpellier Nimes. <https://www.yumpu.com/fr/document/view/16839227/erythrocytes-faculte-de-medecin-de-montpellier/2>.
- Antonelou, M.H., Kriebardis, A.G., Papassideri, I.S. (2010).** Aging and death signaling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfusio*, 8: 39–47.
- Asgary, S., Naderi, G.H., Askari, N. (2005).** Protective effects of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Experimental Clinical Cardiology*, 10(2):88-90.
- Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112(2):303-309.
- Ayouni, K., Berboucha-Rahmani, M., Kim, H.K., Atmani, D., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2016).** Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of fraxinus angustifolia leaf and stem bark extracts. *Industrial Crops and Products, In Press, Corrected Proof*, 88:65-77.

-B-

- Baba-Aissa, F., (2011).** Encyclopédie des Plantes Utiles. *El-Maarifa*, 157-158.
- Banerjee, A., Kunwar, A., Mishra, B., Priyadarsini, K.I. (2008).** Concentration dependent antioxidant/ pro-oxidant activity of *curcumin* Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chimico-Biological Interactions*, 174: 134-139.
- Battacharaya, P., Chatterjee, D., Jacks, G. (1997).** Occurrence of Arsenic-contaminated groundwater in alluvial aquifers from delta plains, Eastern India: Options for safe drinking water supply. *Water Resources Development*, 13:79-92.
- Baudin, B. (2006).** Stress Oxydant et pathologies Cardiovasculaires. *cardiomyoplasty*, 2(1) :43-52.
- Beaudeau, J.L., Peynet, J., Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P., Delattre, J., Legrand, A. (2006).** Sources cellulaires des especes reactives de l'oxygene et de l'azote. *Annales Pharmaceutique Francaises*, 64 :373-381.
- Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C. (1991).** Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(2): 123-143.
- Berboucha, M., Ayouni, K., Atmani, D., Atmani, D., Benboubetra, M. (2009).** Kinetic Study on the Inhibition of Xanthine Oxidase by Extracts from Two Selected Algerian Plants

Traditionally Used for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Journal Of Medicinal Food*, 13 (4) :1–9.

-Berger, M.M. (2006). Manipulation nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolique*, 20 :48-53.

-Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., Saykova, I. (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pillicules d'arachides (*Arachis Hypogaea L.*). *Revue de génie industriel*, 7 :35-45.

-Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudeau, J.L., Thérond, P., Legrand, A., Delattre, J. (2012). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose Oxidative stress, vascular function and atherosclerosis. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 :260–267.

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

-C-

-Camejo-Rodrigues, J., Ascenao, L., Bonet, M.A., Vilès, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of " Serra de São Mamed " (Portugal). *Journal Ethnopharmacology*, 89:199-209.

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

-Clemens, M.R., Waller, H.D. (1987). Lipid Peroxidation in Erythrocytes. *Chemistry and physics of lipids*, 45:251-286.

-Cowan, M. (1999). Plant Product as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:564-582.

-Chiu, D., Lubin, B. (1989). Oxidative hemoglobin denaturation and RBC destruction: The effect of heme on red cell membranes, *Seminars in Hematology*, 26:128–135.

-D-

-Decker, E. (1997). "Phenolics: prooxidants or antioxidants?". *Nutrition review*, 55:396-398.

-Defraigne, J.O. et Pincemail, J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue Medicale de Liège*. 63 :10-19.

-Despoort, J.C., Couratier, P. (2002). Nutrition et stress oxydant : Oxydative stress in neurodegenerative diseases. *Nutrition clinique et métabolique*, 16 :253-259.

-E-

-Ebrahimzadeh1, M.A., Nabavi1, S.M., Nabavi1, S.F., Eslami, B., Rahmani, Z. (2010). Antioxidant and Antihaemolytic Activities of the Leaves of *Kefe cumin* (*Laser trilobum* L) Umbelliferae. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9 (5): 441-449.

-Edwards, C.J., Fuller, J. (1996). Oxidative Stress in Erythrocytes. *Comparative Haematology International*, 6:24-30.

-Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M., Algeri, S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*, 23:719-735.

-F-

-Falé, P.L., Ferreira, C., Rodrigues, A.M., Cleto, P., Madeira, P.J.A., Florêncio, M.H., Frazão, F.N., Serralheiro, M.L.M. (2013). Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastro intestinal digestion. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7:1370-1378.

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

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

-Fibach, E., Rachmilewitz, E., (2008). The Role of Oxidative Stress in Hemolytic Anemia. *Current Molecular Medicine*, 8:609-619.

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

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

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

-G-

-Goodmann, S.M., Hobbs, J.J. (1988). The ethnobotany of the Egyptian eastern desert. A comparison of common plant usage between two culturally distinct Bedouin groups. *Journal of Ethnopharmacology*, 23:73-89.

-Goudable, J., Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11:115-120.

-Guerin, J.-C., Leophonte, P., Lebas, F.-X., Liard, F., Terrioux, Ph., Boulanger, P. (2005). Le stress oxydatif en pathologie bronchopulmonaire: apport de la N-acétyl-cystéine (NAC). *Revue Pneumologie clinique*, 61:16-21.

-Gutteridge, J.M.C. (1983). Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron-and copper-dependent oxygen radical formation. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 157:37-40.

-H-

-Hagermen, A.E., Butler, L.J. (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food chemistry*, 26:809-812.

-Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant, 62(10): 628-638.

-Hendrich, A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27 (1): 27-40.

-I-

- Iuchi, Y. (2012). Anemia Caused by Oxidative Stress, *Intechopen*, 50-62.

-K-

-Kadali, V.N., Ramesh, T., Pola, S.R., Sandeep, B.V. (2016). Assessment of phytoconstituents composition and anti hemolytic activity of *Psidium guajava* Leaf extract against H₂O₂ Induced hemolysis in Chicken Erythrocytes. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 27-30.

-Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:3954-3962.

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

-Kozlova, E.K., Chernysh, A.M., Moroz, V.V., Kuzovlev, A.N. (2012). Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *MIicron*, 44:218-227.

-L-

-Leelarungrayub, N., Chanarat, N., Rattanapanone, V. (2004). Potential Activity of Thai Shallot (*Allium ascalonicum*) Extract on the Prevention of Hemolysis and Glutathione Depletion in Human Erythrocyte From Oxidative Stress. *Chiang Mai University*, 3(3):225.

-Lefèvre, G., Beljean-Leymarie, M., Beyerle, F., Bonnefont-Rousselot, D., Cristol J. P., Thérond P. and Torreilles J. (1998) Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Annales de Biologie Clinique*, 56 :305-319.

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

-Loustau, V., Guillaud, C., Garcon, L., Godeau, B., Michel, M. (2011). Anémie hémolytique chez l'adulte : principales causes et démarche diagnostique. *Hématologie-Transfusion*, 40:470-485.

-M-

-Mahmoudi, S., Khali, M., Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénolique de différente partie de la fleur d'artichaut (*cynara scolymus L*). *Nature and technologie*, 9:35-40.

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

-Mebrahtom, G. (2012). *In vitro* Erythrocyte Haemolysis Inhibition Properties of *Senna singueana* Extracts. *Momona Ethiopian Journal of Science (MEJS)*, 4(2):16-28.

-Medjahed, Z., Atmani-Kilani, D., Fauconnier, M-L., Richard, G., Atmani, Dj. (2016). Hepatoprotective and antidiabetic activities of *Fraxinus angustifolia* Vahl extracts in animal models: characterization by high performance liquid chromatography analysis. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46: 910-920.

-Mégarbane, B. (2008). Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase : quand y penser et quelles précautions prendre ? Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Réanimation*, 17: 399-406.

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

-Mohandas¹, N., Gallagher, P.G. (2017). Red cell membrane: past, present, and future. *American Society of Hematology*, 112:3939-3948.

-Montagnier L., Olivier R., Pasquier C. (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases, *Marcel Dekker, New York*.

-O-

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

-Ota, A., Abramovic, H., Abram, V., Ulrih, N.P. (2011). Interactions of *p*-coumaric, caffeic and ferulic acids and their styrenes with model lipid membranes. *Food Chemistry*, 125:1256-1261.

-P-

-Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*. 276:87-92.

-R-

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

-Rajeshwari, C.U., Shobha, R.I., Andallu, B. (2012). Antihemolytic activity of various fractions of methanolic extract of coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves and seeds: A comparative study. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 22(1):1-6.

-Rameau, J.C., Dumé,G.(1989). Flore forestière française : Tome 1. Plaines et collines. *Institut pour le développement forestier*, 457-459.

-Rees, J.-F., Zal, F., Thomé, J.-P. (2004). Enfer et Paradis: la toxicité de l'oxygène chez les organismes abyssaux. *Océanis*, 30(3):277-291.

-Rocha, S., Costa, E., Coimbra, S., Nascimento, H., Catarino, C., Rocha-Pereira, P., Quintanilha, A., Belo, L., Santos-Silva, A. (2009). Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 43: 68–73.

-Rother, R.P., Bell, L., Hillmen, P., Gladwin, M.T.(2005). Conséquences cliniques de l'hémolyse intravasculaire et de la présence d'hémoglobine extracellulaire dans le plasma. *Journal of American Medical Association*, 293:1653-1662.

-S-

-Sánchez-Gallego, J.I., Lopez-Revuelta, A., Henández-Hernández, A., Sandina, J.L., López-Ruano, G., Sánchez-Yagüe, J., Llanillo, M. (2011). Comparative antioxidant capacities of quercetin and butylated hydroxyanisole in cholesterol modified erythrocytes damages by tert-butylhydroperoxide. *Food and Chemical Toxicology*, 49:2212-2221.

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

-T-

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

-**Tsuchiya, F., Ikedo, K., Tsulsumi, O., Hiroi, H., Momoeda, M., Taketani, Y., Muramatsu, M., Inoue, S. (2001).** Molecular Cloning and Characterization of Mouse EBAG9, Homolog of a Human Cancer Associated Surface Antigen: Expression and Regulation by Estrogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284:2-10.

-V-

-**Vinchi, F., Tolosano, E. (2013).** Therapeutic Approaches to Limit Hemolysis-Driven Endothelial Dysfunction: Scavenging Free Heme to Preserve Vasculature Homeostasis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2-11.

-W-

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

-**Whang, W.K., Park, H.S., Ham, I., Oh, M., Namkoong, H., Kim, H.K., Hwang, D.W., Hur, S.Y., Kim, T.E., Park, Y.G., Kim, J.R., Kim, J.W. (2005).** Natural compounds, frixin and chemicals structurally related to fraxin protect cells from oxidative stress. *Experimental and molecular medicine*, 37(5): 436-446.

-**Widmer, C.C., Pereira, C.P., Gehrig, P., Vallelian, F., Schoedon, G., Buehler, P.W., Schaer, D.J. (2010).** Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Forum Original Research Communications*, 12(2):185-198.

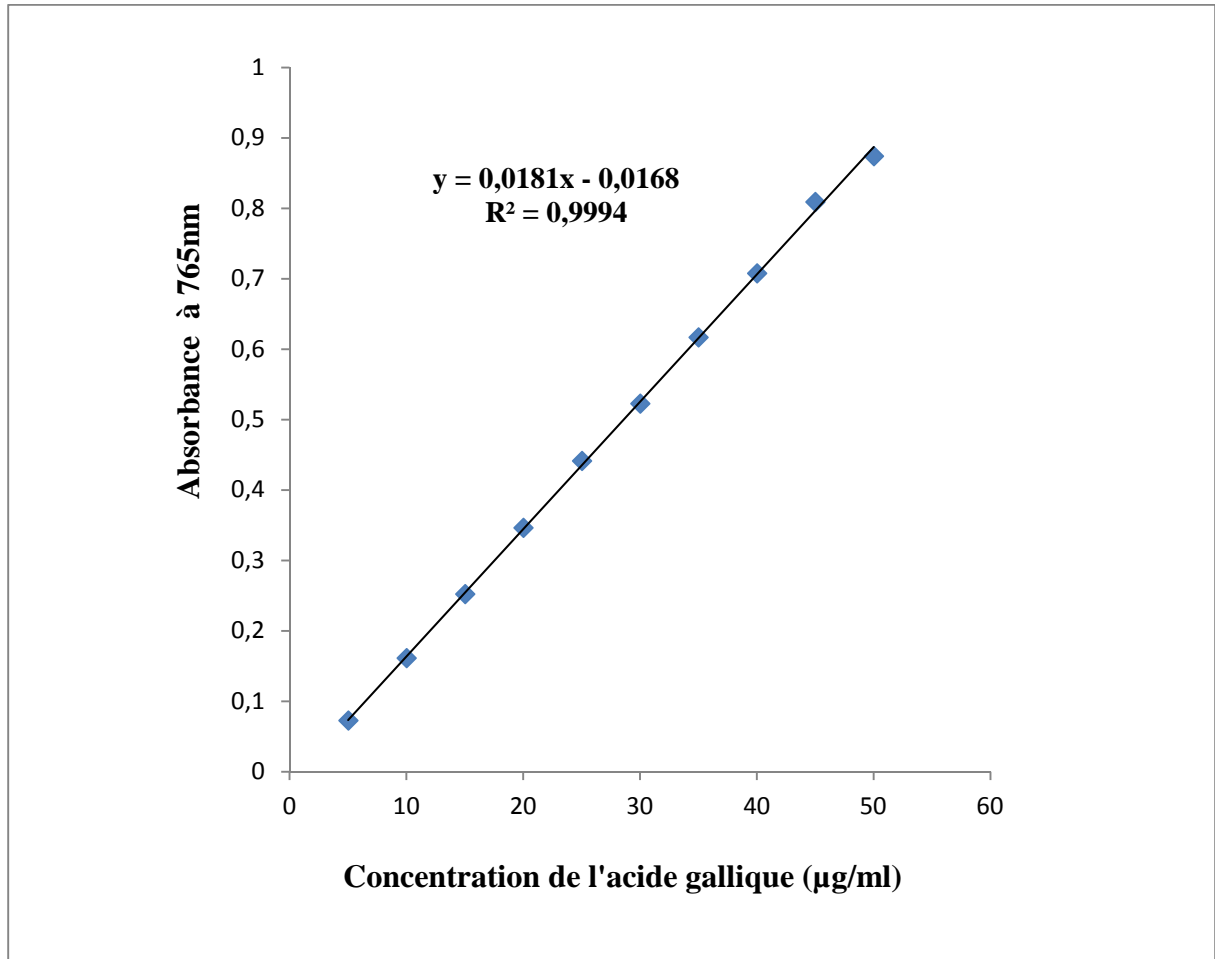
-**Wlodek, L., Kusior, D. (2006).** Oxidative Hemolysis of Erythrocytes. *BAMBED*, 34(6):438-443.

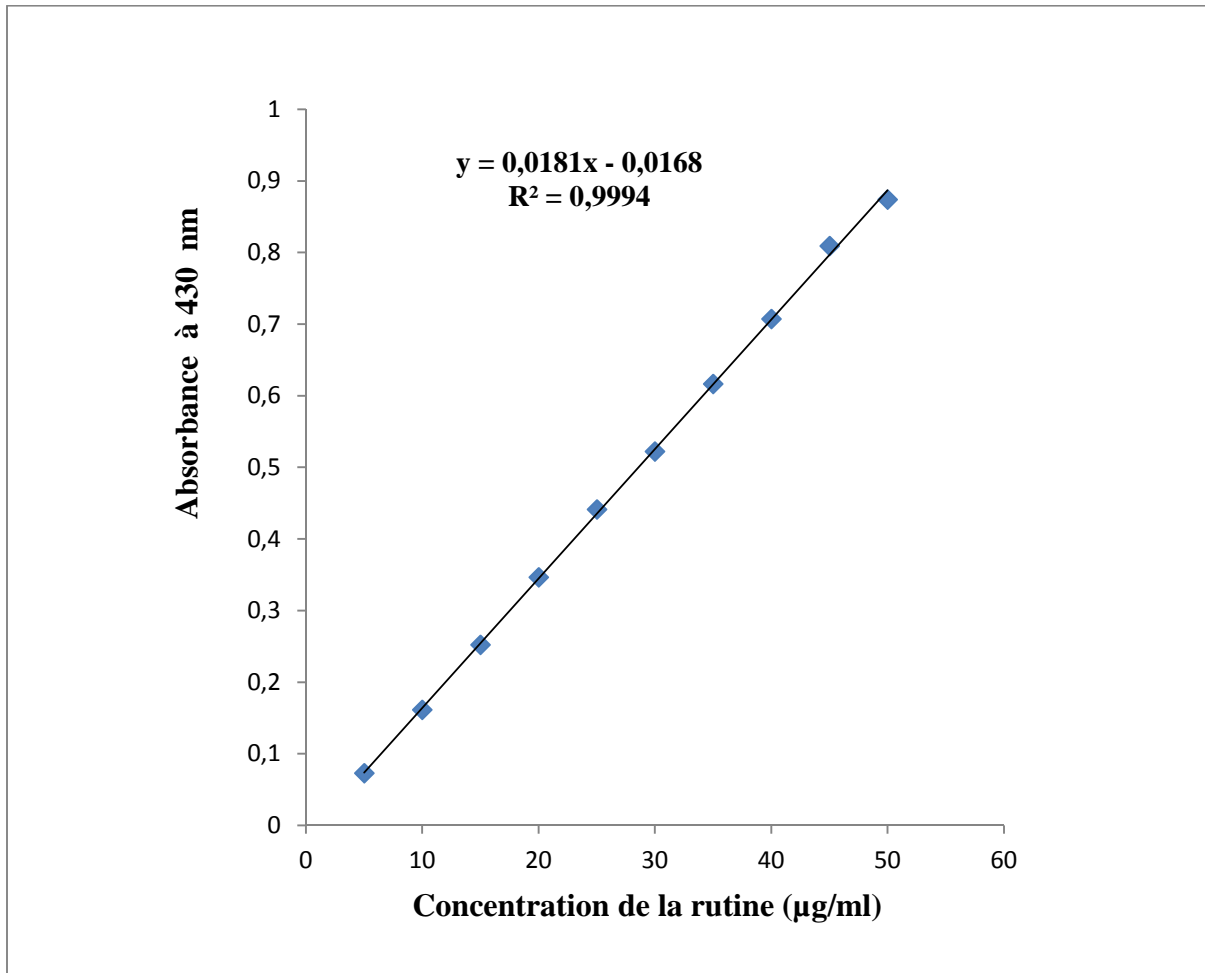
-Y-

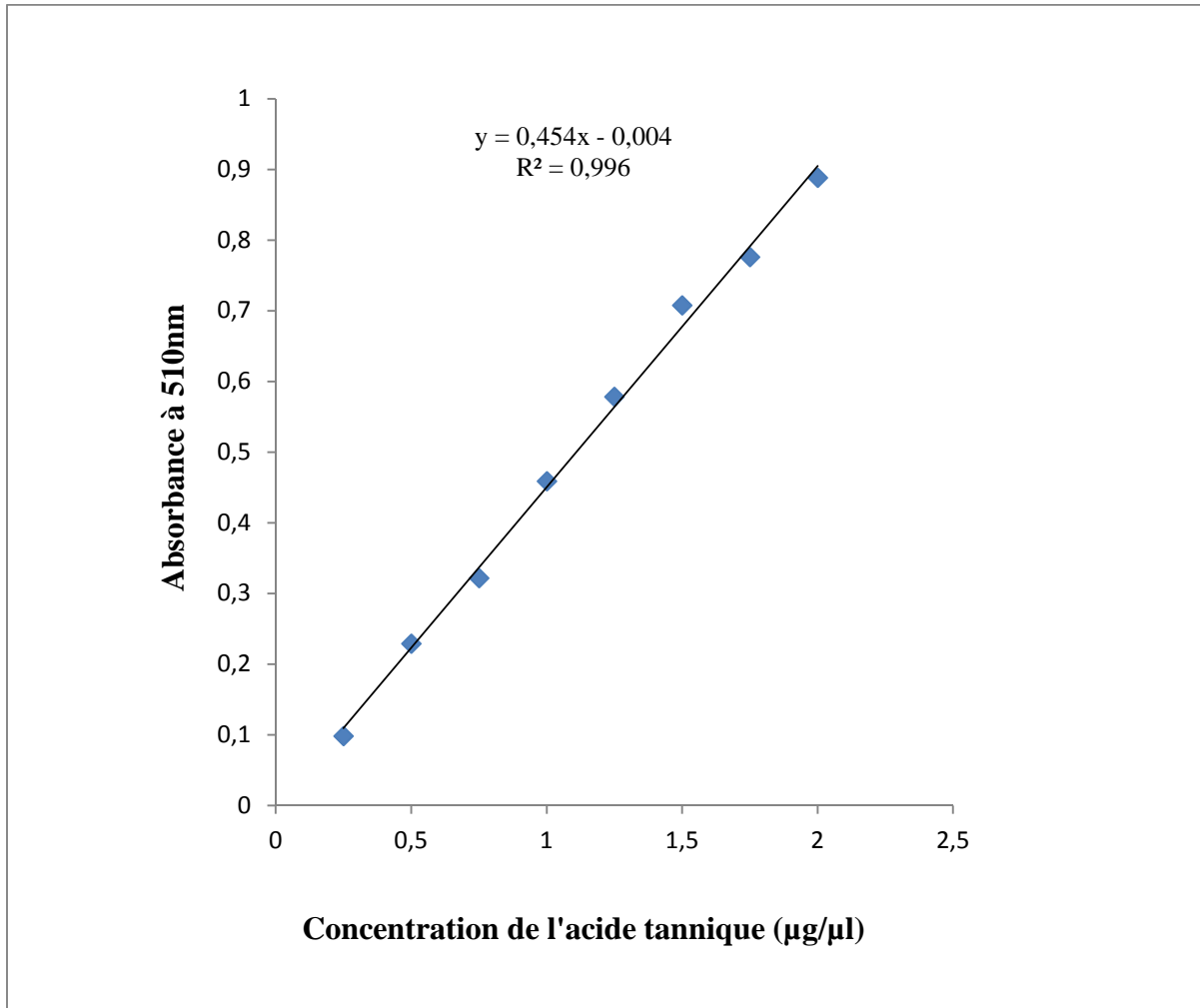
-**Younis, T., Khan, M.R., Sajid, M. (2016).** Protective effects of fraxinus xanthoxyloides (Wall) leaves against CCl₄ induced hepatic toxicity in rat. *Biology Medicin Central*, 16:407.

-Z-

-**Zhang, L.L., Lin, Y.M. (2008).** Tannins from Canarium album with potent antioxidant activity. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9:407-415.

Annexe 1: Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour dosage des phénols totaux.

Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de la rutine pour dosage des flavonoïdes.

Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour dosage des tannins.

Introduction

Sommaire

I. Synthèse
Bibliographique

II. Matériel

et

Méthodes

III. Résultats

Et

Discussion

Conclusion

Références
Bibliographiques

Annexes

L'utilisation d'une plante en toute sécurité nécessite une connaissance non seulement de ces effets bénéfiques mais aussi des complications graves que peut engendrer son utilisation non contrôlée.

Le présent travail, consiste à réaliser une étude phytochimique, une recherche d'effet anti-hémolytique et évaluation de l'activité anti-péroxydant d'une plante connue traditionnellement pour ses valeurs et propriétés médicinales ; *Fraxinus angustifolia*.

Les tests phytochimiques effectués sur ses extraits éthanoliques et aqueux ont révélé la présence en quantités relativement importantes de métabolites secondaires d'intérêt biologique et thérapeutique : les phénols totaux, flavonoïdes et les tanins. En effet, l'extrait éthanolique montre des teneurs de l'ordre de 47,86 mg.Eq.AG/g d'extrait, 77,00 mg.Eq.rut/g d'extrait et 581,49mg.Eq.AT/g d'extrait, respectivement, et l'extrait issu par décoction a montré des teneurs de 24,73 mg.Eq.AG/g d'extrait, 9,26 mg.Eq.rut/g d'extrait, et 22,22 mg.Eq.AT/g d'extrait, respectivement.

Il est retenu de l'analyse biologique in vitro effectuée sur les érythrocytes isolés à partir de sang humain traités par les différentes concentrations de l'extrait éthanolique que les feuilles de *F.angustifolia* sont toxiques à une concentration de 2000 µg/ml avec un taux d'hémolyse de 91,14%, contrairement à l'extrait aqueux qui présente un taux trop faible d'hémolyse 1,37%.

L'activité anti-hémolytique des concentrations non toxiques des différents extraits de *F.angustifolia* vis-à-vis du traitement des érythrocytes par le H₂O₂ a été évaluée. L'extrait éthanolique possède une activité anti-hémolytique la plus élevée (91,25 %) par rapport à l'extrait aqueux (44,44 %). La mesure de l'activité anti-péroxydante a été évaluée vis-à-vis du dosage des MDA, un pourcentage d'inhibition de taux des MDA était de 84,91 % pour l'extrait éthanolique, une valeur supérieure à celle obtenue par l'extrait aqueux 79,82%.

D'après les résultats on peut suggérer que cette espèce peut constituer une source de composés naturels à usage biologique et thérapeutique intéressants dans la prévention de différentes pathologies hémolytiques, pour cela, la réalisation d'autres études complémentaires seraient nécessaires, des investigations mériteraient d'être développées et approfondies en faisant appel à des méthodes d'études de caractérisation qualitatives et quantitatives de ces métabolites bioactifs. Faire des études de fractionnement des extraits pour l'identification des molécules responsables du pouvoir anti-hémolytique et anti-péroxydant, en utilisant des techniques d'identification performantes.

Il serait également judicieux de confirmer le potentiel anti-hémolytique obtenu par les extraits aqueux et éthanoliques de feuilles de *F.angustifolia* par sa caractérisation par d'autres méthodes biochimiques et de l'optimiser en termes de paramètres expérimentaux.

Résumé

Fraxinus angustifolia est une plante médicinale appartenant à la famille des Oléacées, elle est très répandue dans le bassin méditerranéen et largement utilisée comme anti-inflammatoire et antioxydant. Notre travail repose sur le dosage des composés phénoliques des extraits éthanoliques et aqueux de feuilles de *F. angustifolia*, ainsi que l'évaluation *in vitro* de leur activité anti-hémolytique et anti-peroxydante, en présence du peroxyde d'hydrogène (8mM). L'analyse phytochimique a révélé la présence des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et surtout les tannins dans l'extrait éthanolique une teneur bien supérieure à celle obtenue dans l'extrait aqueux. La recherche de l'effet hémolytique à différentes concentrations des deux extraits a montré que l'extrait aqueux à des concentrations trop élevées (2000 µg/ml) présente un effet hémolytique négligeable de 1,37%. Pour le test de l'activité anti-hémolytique, l'extrait éthanolique a présenté un pourcentage d'inhibition de 91,25 % de l'hémolyse induite par le H₂O₂ par rapport à l'extrait aqueux 44,44 %, alors que le pouvoir anti-peroxydant a démontré un pourcentage d'inhibition des taux de MDA produit de 84,91 % et 79,82%, respectivement. Les résultats obtenus prouvent le potentiel bénéfique de feuilles de *Fraxinus angustifolia* dans la prévention des pathologies hémolytiques associées à un stress oxydant

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

Summary

Fraxinus angustifolia is a medicinal plant belonging to the family of Oleaceae, it is widespread in the Mediterranean basin and widely used as anti-inflammatory and antioxidant. Our work is based on the determination of the phenolic contents of the ethanolic and aqueous extracts of *F. angustifolia* leaves, as well as the *in vitro* evaluation of their anti-hemolytic and anti-peroxidant activities in the presence of hydrogen peroxide (8 mM). Phytochemical analysis revealed the presence of phenols, flavonoids and mainly tannins with higher levels in the ethanolic extract than in the aqueous one. The investigation of the hemolytic effect at different concentrations of the extracts showed that the aqueous extract at higher tested concentrations (2000 µg / ml) showed no significant hemolytic effect of 1.37%. Anti-hemolytic activity test, the ethanolic extract showed an inhibition rate of 91.25% of the optimal hemolysis induced by H₂O₂ compared to a moderate activity of the aqueous extract (44.44%), while the anti-peroxidant power demonstrated an inhibition percentage of produced MDA 84.91% and 79.82%, respectively. The results obtained show the beneficial potential of leaves of *Fraxinus angustifolia* in the prevention of oxidative stress associated hmolysis pathologies.

Key words: *Fraxinus angustifolia*, hemolytic effect, anti-hemolytic, anti-peroxidant, hydrogen peroxide.

ملخص

Fraxinus angustifolia نبات رفيع الأوراق ينتمي إلى عائلة Oeleacea ويستخدم على نطاق واسع في منطقة البحر الأبيض المتوسط، كمضاد للالتهابات ومضاد للاكسدة. يستند عملنا على تحديد المركبات الفينولية في المستخلص المائي والكحولي لأوراق *F. angustifolia* وفي تقييم المختبر من نشاطهم في مكافحة انحلال الدم ومكافحة الاكسدة في وجود بيروكسيد الهيدروجين (8 ملم). لقد كشف التحليل الكيميائي النباتي وجود الفينولات الكلية، الفلافونويد والعفص خاصة في مستخرج الإيثانول أكثر من تلك التي حصلت في المستخلص المائي.

أظهرت النتائج تأثيراً لمستخلص الانحلالي بتركيزات مختلفة أن المستخلص المائي لتركيزات عالية 2000 ميكروغرام / مل يقدم لها تأثير الانحلال بنسبة ضئيلة 1.37%. اختبار النشاط المضادة للانحلال، أثبت ان مستخرج الإيثانول يثبط نسبة 91.25% من انحلال الدم الناجم عن H₂O₂ مقارنة مع المستخلص المائي 44.44%، في حين أن اختبار المضاد للاكسدة أظهر القدرة على تثبيط في مستويات المنتج MDA 84.91% و 79.82% من المئة على التوالي. النتائج المتحصل عليها تدعم الامكانيات المفيدة لـ *Fraxinus angustifolia* للوقاية من الأمراض المرتبطة بالاكسدة و انحلال الدم .

كلمات البحث: *Fraxinus angustifolia*, تأثير الانحلالي، تأثير مضاد للانحلالي، بيروكسيد الهيدروجين