

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحي

Université de Mouhammed saddik benyahia -Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de Biologie Moléculaire et cellulaire

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme :
Master académique en biologie

Option : **Biochimie**

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de
Fraxinus angustifolia par des approches analytiques
CCM et CG-MS**

Soutenu le: **02 Juil 2018**

Membre de jury:

Présenté par :

Président : Mme. HASSIBA ROUIBAH

ABBADD Hakima

Promotrice : Mme. ZINB MEDJAHED

BOUSSIS Abla

Examineur : Mme. SALIHA HIRECHE

Année Universitaire: 2017/2018



Remerciements

*On remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*On tient particulièrement à remercier notre promotrice, Dr **MDJAH D ZINEB**, enseignante à l'université de Jijel et Bejaia pour avoir accepté la charge d'être rapporteuse de ce mémoire, on la remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'elle a consentie durant la réalisation de ce travail. Ce dernier est un témoignage de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et notre respect.*

On tient aussi à remercier vivement l'université Mohammed Saddek Ben Yahia Jijel, et voudrait remercier également tout le personnel du Département de biochimie.

De nous avoir accueillies dans le Laboratoire de Biochimie, pour ses conseils avec beaucoup de sympathie.

Notre reconnaissance va également aux Professeurs et les doctorantes de biochimie, Pour leurs aide et leurs gentillesse.

Un remerciement particulier pour l'ensemble des membres de laboratoires de Biologie Moléculaire, de la Biologie et biochimiques.

Nous ne pourrons achever ce mémoire sans exprimer notre gratitude à tous les enseignants pour leurs dévouements et leurs assistances tout au long de nos études universitaires.

On adresse, enfin et surtout, notre plus profonde gratitude et tout notre amour à nos familles, qui ont su nous faire confiance et nous soutenir en toutes circonstances, ainsi qu'à tous nos proches amis qui nous ont toujours soutenus et encouragés même dans les périodes difficiles.

*Merci**





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A la mémoire de mes parents Mama et Papa, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère soeur : Marieme, Rahma mes chers frères : Bassame et Assause aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve envers vous, Puisse ce travail être la récompense de vos soutiens moraux et sacrifices.

Que Dieu le tout puissant vous préserve et vous procure santé et longue vie afin que je puisse à mon tour vous combler.

A tous mes Mes grands-pères et ma grand-mère et toutes familles de BOUSSIS et AISSOUSS.

A mon binôme :Hakima.

Ainsi qu'à tous mes amies et camarades.

ABLA



Dédicaces

Je dédie cet humble travail:

À mes chers parents:

Je ne peux pas exprimer les mots de gratitude et d'amour que je leur donne: Qui m'a permis de voir la lumière, ceux qui m'ont suivi pas à pas à travers ce chemin, ceux qui sont toute ma vie

Mon cher père Hasane et ma chère mère Baya

À mon mari sincère, mon compagnon et Nur Derby, qui m'a soutenu avec patience et soutient moi et ses conseils constants et amour généreux.

Cher et merveilleux frère: Hamid

À mes soeurs: Khadija, Sabrina, Hamida, et surtout Wahiba, qui était une deuxième mère pour moi, et ma soeur Soumia

Aux enfants de toutes mes soeurs sans exception

Pour mes chers amis.

Ce qui m'a soutenu jusqu'à la fin de l'année.

Pour toutes les personnes qui ont participé à ce travail

A ma très chère binôme Abba qui m'a supportée jusqu'à la fin de l'année

HAKIMA

Sommaire

I. Introduction.....	02
Chapitre 01 : Fraxinus angustifolia	
I.1.Généralités sur les oléacées	03
I.2.Genre fraxinus	03
I.3.Classification scientifique	03
I.4.Noms vernaculaires	03
I.5. Habitat et Répartition géographique	04
I.6.Caractéristiques morphologiques	05
I.7.Espèces de la plante	06
I.8.Effets thérapeutiques de la plante	07
I.8.1.Utilisation en médecine traditionnelle.....	07
I.8.2.Donnés phytochimiques	07
I.8. 3.Donnés pharmacologiques	08
I.8.3.1.Effet antioxydant	08
I.8.3.2.Effet anticancéreux	09
I.8.3.3.Activité anti-inflammatoire	10
I.8.3.4. Activité antimicrobienne	11
I.8.3.5. Activité neuro-protectrice :	11
I.8.3.6. Activité antifongique	11
I.8.3.7. Anti hypertensif	11
I.8.3.8. Antimalarial	11
I.8.3.9. Anti toxoplasmose	12
I.8.3.10. Anti vieillissement.....	12
I.8.3.11. Activité antidiabétiques	12
I.8.4. Donnés toxicologies	12
Chapitre 02 : systèmes antioxydant	
II. systèmes antioxydant	14
II.1. Généralités.....	14
II.2. Définition de stresse radical libre	14
II.3. Principaux radicaux libres	15
II.3.1. Anion super oxyde	15

II.3.2. Peroxyde d'hydrogène	15
II.3.3. Radical hydroxyle HO [•]	16
II.3.4. Radicaux alkyles R [•] et peroxy ROO [•]	16
II.3.5. Oxygène singlet (O ₂)	17
II.3.6. Monoxyde d'azote NO.....	17
I.4. Antioxydants	17
II.4.1. Définition	17
II.4.2. Types des antioxydants	17
II.4.2.1. Antioxydants primaires	18
II.4.2.2. Antioxydants secondaires	18
II.4.3. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant	18
II.4.4 . Mécanismes d'action des antioxydants	19
II.5. Systèmes de défenses antioxydants	19
II.5.1. Système antioxydant enzymatique	20
II.5.1.1. Superoxydes dismutases	21
II.5.1.2. Catalase	21
II.5.1.3. Glutathions peroxydase (GPX)	21
II.5.2. Système antioxydant endogène non enzymatique	22
II.5.2.1. Glutathion	22
II.5.2.2. Acide urique	22
II.5.2.3. Bilirubine	22
II.5.2.4. Acide lipoïque	22
II.5.3. Système antioxydant exogène	22
II.5.3.1. Vitamine E	23
II.5.3.2. Vitamine C	23
II.5.3.3. β carotène	23
II.5.3.4. Sélénium	23
II.6. Polyphénols	23
II.6.1. Biosynthèse de polyphénol	24
II.6.1. Biosynthèse de polyphénol	24
II.6.1.2. voie de acide acétique	24
II.6.2. Classification.....	24
II.6.2.1. Acides phénoliques.....	25

II.6.2.2. Flavonoïdes.....	26
II.6.2.3. Tanin	27
II.6.2.3. 1.Tanin Condensé	27
II.6.2.3.2.tanins hydrolysable.....	27
II.6.3. Propriétés biologiques des polyphénols	28
Chapitre 3 : méthode caractéristique	
III. Méthodes de caractérisation	29
III.1.Méthodes chromatographiques.....	29
III.1.2. Différents types de chromatographie	29
III.1.2.1. Chromatographie liquide haute performance.....	29
III.1.2.1. 1. Définition	29
III.1.2.1. 2. principe	29
III.1.2.1. 3. Appareillage	30
III.1.2.2.Chromatographie sur couche mince CCM.....	30
III.1.2.2.1. Définition	30
III.1.2.2.2. Principe	31
III.1.2.2.3. Appareillage.....	31
III.2. Méthodes spectrales	32
III.2. 1. Différents types des méthodes spectrales	32
III.2. 1.1. Spectrophotométrie de masse	32
III.2. 1.1.1. Définition	32
III.2. 1.1.2. Appareillages.....	34
III.2. 1.1.3. Analyseurs de masse	34
III.2. 1.2.Résonance magnétique nucléaire	35
III.2. 1.2.1.Principe	36
III.2. 1.2.2.Appareillage	36
III.2. 1.3. Spectrométrie infrarouge	36
III.2. 1.3.1.Principe	37
III.2. 1.3.2.Appareillage.....	37
Partie expérimentale.	
I. Matériel et méthodes.....	38
I.1.Préparation du matériel végétal.....	38
I.1.1. Récolte.....	38

I.1.2. Broyage et tamisage.....	38
I.2. Extraction.....	38
I.2.1. Procédure.....	38
I.3. Screening chimique.....	38
I.3.1. Dosage des phénols totaux.....	38
I.3.1.1. Principe.....	38
I.3.1.2. Procédure expérimentale.....	39
I.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	39
I.3.2.1. Principe.....	39
I.3.2.2. Procédure expérimentale.....	39
I.3.3. Dosage des tanins.....	40
I.3.3.1. Principe.....	40
I.3.3.1. Procédure expérimentale.....	40
I.4. Evaluation de l'activité anti-radicalaire.....	41
I.4.1. Test de DPPH.....	41
I.4.1.1. Principe.....	41
I.4.1.2. Procédure expérimentale.....	41
I.4.2. Test de l'ABTS.....	42
I.4.2.1. Principe.....	42
I.4.2.1. Procédure expérimentale.....	42
I.5. Evaluation de l'activité antioxydant.....	42
I.5.1. Activité antioxydant contre le monoxyde d'azote.....	42
I.5.1. Principe.....	42
I.5.2. Procédure expérimentale.....	44
I.5.3. Activité antioxydant contre le radical superoxyde.....	44
I.5.3.1. Principe.....	44
I.5.3.2. Procédure expérimentale.....	44
I.6. Caractérisation des extraits des feuilles et d'écorce.....	44
I.6.1. Analyses chromatographiques.....	44
I.6.1.1. Chromatographie sur couche mince(CCM).....	44
I.6.1.1.1. Principe.....	44
I.6.1.1.2. Procédure expérimentale.....	44
I.6.1.2. Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	45

I.6.1.2.1. Principe.....	45
I.6.1.2.2. Procédure expérimentale.....	45
II.7. Analyse statistique.....	45
III. Résultats et discussion.....	46
III.1. Taux d'extraction.....	46
III.2. Dosage des composés phénoliques.....	48
III.3. Evaluation de l'activité anti radicalaire.....	49
III.3.1. Evaluation de l'activité anti DPPH.....	49
III.3.2. Effet scavenger contre le monoxyde d'azote.....	51
III.3.3. Effet scavenger de radical superoxyde.....	52
III.3.4. Effet scavenger de radical ABTS.....	53
III.4. Analyse chromatographique.....	54
III.4.1. Chromatographie sur couche mince.....	54
III.4.2. CG-MS.....	55
III.4.3. Résultats CG-MS.....	56
conclusion.....	62
Référence bibliographique.....	65
Annexe	

A: Absorption.

AA : Acide ascorbique

ABTS^{o+}: l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

ANOVA : Analyse de la variance

BSA : Albumine de sérum bovine

BHA: butylhydroxyanisole.

BHT: butylhydroxytoluène

C: concentration

CCM : Chromatographie sur couche mince

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CHCl₃ : Chloroforme

CoQ₁₀ : CoenzymeQ₁₀

COX : Cyclooxygénase

CPG : Chromatographie de phases gazeuse

°C : degré.

DO: Densité optique

D : nombre de dilution

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil.

ED : Eau distillée

Eq.A.G. : Equivalent acide gallique

Eq.A.T. : Equivalent acide tannique

Eq.Rut. : Equivalent Rutine

EROs : Espèces réactives de l'oxygène

EC 50: concentration efficace de 50%.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

H₃PW₁₂O₄₀: d'acide phosphotungstique .

H₃PM₁₂O₄₀: d'acide phosphomolybdique.

HPLC: chromatographie liquide à haute performance

I%: pourcentage d'inhibition.

IC 50 : Concentration Inhibitrice 50%

m : masse.

M : molaire.

mg/ml : milligramme par millilitre.

ml: millilitre.

min : minute.

Mo8O23: molybdène

mg EAG/ g de MS: milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche.

mg ER/g de MS: milligramme équivalent de rutine par gramme matière sèche.

mg EC/g de MS: milligramme équivalent de catéchine par gramme matière sèche.

mg EAA/g de MS: milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche.

Mg EQ /g de MS: équivalent de Quercitaine par gramme de matière sèche.

mg EAT/ g de MS: milligramme équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche.

NO•: L'oxyde nitrique.

nm : nanomètre.

O₂•: L'anion -radical superoxyde.

¹O₂: L'oxygène singulet.

NO: L'oxyde d'azote.

ONOO⁻: Le peroxydinitrite.

OH : groupement hydroxyle

O•H : Radical hydroxyle

NADPH oxydase: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase.

PH: Ptentielle d'hydrogène.

R : rendement.

RE: rendement d'extraction en pourcentage.

Rt: Temps de rétention.

PBE: poids des boîtes pleines après séchage
(contient l'extrait brut) en gramme.

PBV: poids des boîtes vides en gramme.

PPV: poids des poudres végétales utilisés en
gramme.

UV: Ultraviolet.

R: Résistant.

Rdt : rendement

S: Sensible

SDS: Sodium Dodecyl sulfate

SEM : Somme des écarts moyens.

SM : Spectrophotométrie de masse

TCA: Acide trichlorure acétique.

TEA : Triethanolamine.

Tris :(hydroxyméthyl)

aminométhanehydrochloride.

W8O23: tungstène.

µl: Microlitre

VC : vitamine C ou acide ascorbique

φ : phase.

% : pourcentage.

Liste des figures

Numéro	Description	Page
01	Photographie des feuilles de <i>Fraxinus anagustifolia</i>	4
02	Photographie de l'écorce <i>Fraxinus angustifolia</i>	7
03	Différentes activité biologiques de <i>Fraxinus angustifolia</i>	8
04	Composés biologiques actifs isolés de <i>Fraxinus angustifolia</i>	8
05	Diagramme représentant les cibles moléculaires et le mécanisme d'action de Fraxinus pour les activités : chimio préventive, anti-inflammatoire, et antioxydants.	9
06	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	14
07	les systèmes de défense contre les radicaux libres	17
08	Déséquilibre Antioxydant /Oxydant	19
09	Action de l'antioxydant au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène	19
10	Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques	20
11	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	20
12	Principales étapes de production de l'espèces réactives de l'oxygène	21
13	Structure de acide phénolique	26
14	structure chimique de six classes de flavonoïdes	26
15	structure de tanin condensé.	27
16	structure de tanin hydrolysable.	27
17	Propriétés des polyphénols	28
18	Exemple d'une chromatographie liquide haute performance	30
19	Exemple chromatographie planaire.	31
20	Principe d'ionisation d'ESI	33
21	Analyseur quadripôle	34
22	Analyseur piège à ions	35

23	Analyseurs à temps de vol	35
24	Modèle simplifié de Spectrométrie infrarouge	37
25	Procédure expérimentale de dosage des phénols totaux dans les extraits méthanoliques de feuilles et d'écorces de <i>F. angustifolia</i>	39
26	Procédure expérimentale de dosage des flavonoïdes dans les extraits méthanoliques de feuilles et écorces de <i>F. angustifolia</i>	39
27	Procédure expérimentale de dosage des tanins dans les extraits éthanoliques de feuilles et d'écorces de <i>F. angustifolia</i>	40
28	Réaction de réduction du DPPH	41
29	Réaction de réduction d'ABTS	42
30	préparation des plaques de CCM	44
31	Teneurs en polyphénols totaux, Flavonoides et tannins des extraits des feuilles et d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	48
32	Activite anti-radicalaire des extraits du de feuilles ET l'écorce de <i>Fraxines angustifolia</i> et l' acide ascorbiques	49
33	Pourcentages d'inhibition de radicale DPPH en fonction des concentrations	50
34	Pourcentage d'inhibition d'anions superoxydes désmutases par des extraits feuilles et d'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> et de la vitamine C	52
35	Activité antiradicalaire (ABTS) Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-.	53
36	Chromathogramme de <i>extraites feuilles et écorces de fraxonus angustifolia</i> comparée a Cinq standardantioxydants(A,B) (A,B) sur CCM a long d'ondes de 255 nm.	54
37	A,B Chromathogramme de <i>extraites feuilles et écorces de Fraxinus angustifolia</i> comparée à Cinq standard antioxydants(A,B) sur CCM a la longueur d'ondes de 366nm.	55

Liste Des Tableaux

Némoreaux	Titre	Page
Tableau I	Différentes espèces de <i>Fraxinus angustifolia</i>	06
Tableau II	Différentes activités et Molécules active de <i>Fraxinus angustifolia</i>	09
Tableau III	Principales classes de composés phénoliques	25
Tableau IV	Quelques méthodes chromatographiques	32
Tableau v	le pourcentages de rendements et humiditié du l'extraits Feuilles et écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	46
TableauVI	Lateneur des composée phénoliques de polyphénols dans l'extraits Feuilles et écorces du <i>Fraxinus angustifolia</i>	47
Tableau VII	les pourcentages de rendements et humiditié du l'extraits Feuilles et écorces de <i>Fraxinus angustifolia</i> .	50
Tableau IX : B	Composés identifiés dans l'extrait de <i>Fraxinus angustifolia</i> utilisé dans cette étude.	60
Tableau IX : B	Composés identifiés dans l'extrait de <i>Fraxinus angustifolia</i> utilisé dans cette étude.	61

Introduction

Plus de 200000 espèces végétales sur les 300000 recensées à nos jours sur l'ensemble de notre planète poussent dans les pays tropicaux d'Afrique et d'ailleurs. Parmi les utilisateurs potentiels de ces plantes, la médecine et la pharmacopée traditionnelles viennent en tête avec ceux qui les pratiquent, à savoir 70% des populations du tiers monde (**Sofowara, 1982**).

Ces plantes médicinales possèdent des effets bénéfiques pour la santé et plusieurs activités biologiques aussi selon la composition chimique de chaque plante. Environ 80% de la population mondiale dépend des principes actifs des plantes médicinales (**Sen et Samanta, 2015**). Au fil des siècles, les produits naturels issus des plantes ont prouvé leurs efficacités en tant que principale source de nouveaux produits chimiques ayant un potentiel thérapeutique (**Rasul et al, 2013 ; Harvey, 2015**).

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

Fraxinus angustifolia appelée couramment le frêne oxyphille, de la famille des oléacées est considéré comme une plante polyvalente à activités biologiques et pharmacologiques. Elle a fait preuve de plusieurs effets thérapeutiques tel que, anticancéreux, anti-inflammatoire, antioxydant, antimicrobien et neuroprotecteur, ses composés phytochimiques bioactifs sont utilisés dans l'industrie cosmétique et comme agent anti-âge prometteurs (**Sarfraz et al, 2017**). Les coumarines, les flavonoïdes, les tanins...etc. sont les composés majoritaires de frêne (**Kostova et Iossifova, 2006**), néanmoins, leur répartition entre les différentes espèces et les différentes parties de la plante fait preuve de leur efficacité.

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (**Gauche et Hauswirth, 2006**). Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (**Aurousseau, 2002**); des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées (**Milane, 2004 ; Van Antwerpen, 2006**); ainsi que l'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, la pollution, les UV, la fumée de cigarette et les rayonnements (**Tamer, 2003**). Un déséquilibre entre la production de radicaux libres et le

système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (Pincemail et al, 2000). Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre le système de défenses des antioxydants et la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Sayre et al, 2008; Bloomer et al, 2008; Power et al, 2010) Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense des antioxydants est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies suite à une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants

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

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydant de l'extrait des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*, par plusieurs méthodes, pour ce travail on a procédé comme suit :

On a commencé par une synthèse bibliographique, qui est divisée en 3 chapitres dont on a parlé dans le premier chapitre sur les plantes médicinales plus précisément *Fraxinus angustifolia*, pour le deuxième chapitre on a abordé le stress oxydatif et l'activité antioxydant, et finalement dans le troisième chapitre on a cité quelques méthodes de caractérisation des poly phénols. La deuxième partie de ce travail, est basée sur le travail personnel qu'on a effectué, qui se présente comme suit, on a commencé par l'extraction des polyphénols, puis le dosage des différents groupe de poly phénol, par la suite on est passé a l'évaluation de différentes activités antioxydants tel que, l'inhibition de radical anion superoxyde, le monoxyde d'azote, ABTS, et le DPPH, ces activités ont été suivie d'une caractérisation par chromatographie sur couche mince et une CG-MS, afin d'identifier les molécules bioactives, les résultats par la suite ont été traités par le logiciel Graph Pad Prism pour une analyse statistique.

Chapitre I: *Fraxinus angustifolia*

I. *Fraxinus angustifolia*

I.1. Généralités sur les oléacées

La famille des Oléacées est la plus primitive du groupe des Lamiales. C'est la famille de l'Olivier, comprenant des plantes ligneuses (800 espèces) des régions tropicales et tempérées (Heymonet, 2013). L'Oléacée est le niveau de la sous-famille est abandonné, la famille est divisée en 5 tribus et le genre *Fraxinus* de 40-50 espèces est placé dans la sous-tribu *Fraxininae* de la tribu *Oleaceae* (Kostova et Iossifova, 2006).

I.2. Genre *Fraxinus*

Le frêne est un grand arbre de la méditerrané, qui couvre le centre-sud Europe et nord-ouest de l'Afrique, jusqu'au Caucase (Caudullo, Houston Durrant, 2016), de 30 à 40 m de haut très répandu en France, dans les plateaux ou en montagne, bordant les rivières ou composant des forêts. Il se reconnaît à ses gros bourgeons noirs veloutés qui donneront des feuilles composées de 9 à 15 folioles et à ses petites fleurs brunes rougeâtre, dépourvues de pétales. Son fruit est une samare pendante, renfermant une graine allongée. La classification systématique de genre *Fraxinus*, selon la classification APGIII, appartient à :

- la classe des Angiospermes,
- la sous-classe des Triporées,
- classe de des Astéridées,
- l'ordre des Lamiales,
- la famille des Oléacées (Heymonet, 2013).

Le frêne *oxyphyll* ou *Fraxinus angustifolia* connu sous le nom de frêne à feuilles étroites ou frêne de désert est un, arbre de taille moyenne avec un large éventail. Le genre *Fraxinus*, comprend environ 40 espèces d'arbres et d'arbustes tempérés occupant divers habitats dans l'hémisphère nord, représente un modèle utile pour étudier le frêne, il est connu et utilisé en médecine populaire depuis les temps les plus anciens. Les feuilles, l'écorce sont les parties les plus consommées (Fig. 1 et 2) (Hinsinger et al, 2013).

I.3. Classification scientifique

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Lamiales

Famille : Oléacées

Genre : *Fraxinus*

Espèce : *Fraxinus angustifolia* (Rameau et Dumé, 1989).



Figure 1 : Photographie des feuilles de *Fraxinus angustifolia*.



Figure 2 : Photographie de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

I.4.Noms vernaculaires

Les noms vernaculaires de *Fraxinus angustifolia* sont multiples. Elle est appelée communément frêne à feuilles étroites, oxphylle, en anglais *narrowleavedash*, *southernash*, en arabe *Derdar* et en amazigh *Aslen*, *Thaslent* (Rameau et Dumé, 1989).

I.5. Habitat et Répartition géographique

Sa répartition couvre l'Europe centrale et le méridionale et l'Afrique du Nord-Ouest, jusqu'au Caucase (Caudullo et Durrant, 2016), se trouve en Asie du Nord-Est, en

Amérique du Nord, dans l'est et l'ouest de la France, en Chine, dans le nord du Pakistan, en Inde et en Afghanistan (Sarfraz et al., 2017).

Le genre *Fraxinus* L., comprend 43 espèces, se produisant dans les régions tempérées et subtropicales de l'hémisphère nord. Les deux principales zones de distribution sont Amérique du Nord (20 espèces) et Asie de l'Est (20 espèces). Trois espèces sont présentes en Europe et en Asie occidentale. *Fraxinus* est l'un des 24 genres existants d'*Oleaceae* (la famille des oliviers) et seul membre de la sous-tribu *Fraxininae* (Wallander, 2008).

Les espèces de *fraxinus* sont parmi les arbres les plus répandus dans les forêts de l'est de l'Amérique du Nord où elles constituent un élément important de nombreux types de forêts et servent de nourriture et d'habitat à de nombreux oiseaux, mammifères et arthropodes (Nielsen et al., 2017).

En raison de variations morphologiques, le statut taxonomique de cette espèce n'est toujours pas clair. Cependant, on reconnaît trois sous-espèces géographiques sur la base des données moléculaires et morphologiques: l'arbre à feuilles étroites (*Fraxinus angustifolia* subsp. *angustifolia*) dans le sud-ouest Europe et Afrique du Nord-Ouest, l'arbre du Caucase (*Fraxinus angustifolia* subsp. *oxycarpa*) en Europe centrale, dans les Balkans et la région de la mer Noire et l'arbre syrienne (*Fraxinus angustifolia*) dans le sud-est de l'Anatolie (Caudullo et Durrant, 2016).

I.6. Caractéristiques morphologiques

C'est un arbre à feuilles caduques ou rarement à feuilles persistantes. Les feuilles sont impaires, pennées, opposés ou rarement verticillées aux sommets des branches, le pétiole et le pétiolule sont souvent épaissis à la base. Les inflorescences sont terminales ou axiale vers la fin des branches, ou latéral sur les branches de l'année précédente, paniculé bractées linéaires à lancéolées, caducées ou absent. Elles sont composées de forme ovale, minces, brillantes, vertes et longues avec 3-8 cm de longueur et de 1-1,5cm de largeur (Kostova et Iossifova, 2006). La couronne est dense en forme de dôme, et irrégulière avec des pousses courtes (Caudullo et Durrant, 2016). La face externe de son écorce est de couleur grise, la face interne est de couleur brune et lisse. L'écorce à une saveur amère et sans odeur (Hinsinger et al., 2013). Les fleurs sont pollinisées et se développent en automne sans pétales (Caudullo et Durrant, 2016), unisexuées, bisexuelles ou polygames. Le calice est à 4 dents ou irrégulièrement lobé, parfois absent. La corolle est blanche à jaunâtre, 4-lobée,

divisée en base ou absente. Les étamines sont deux, insérées à la base de la corolle les lobes; les filaments sont courts, exsert à l'anthèse. Les ovules sont deux dans chaque locule (Kostova, Iossifova, 2006). Le fruit est une samare de 3-4cm de longueur aplatie en état de maturation en fin de l'été (Caudullo et Durrant, 2016), *Fraxinus* montre une grande diversité dans la morphologie florale, avec des taxons (Hinsinger et al, 2013). *F. angustifolia* donne du bois blanc de haute qualité et est préféré dans le placage et l'industrie du meuble (Cicek et al., 2006).

1.7. Espèces de la plante

Il existe plus d'une quarantaine espèce pour *Fraxinus*, les plus importantes sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau I : Différentes espèces de *Fraxinus angustifolia* (Lene et al., 2017).

Espèce	Section	Distribution naturelle
Excelsior	F	Nord et Centre de l'Europe au nord de la Russie et autour de la mer Noire
Angustifolia	F	Sud et Ouest de l'Europe, Afrique du Nord-Ouest
Angustifolia subsp. Syriaca	F	Turquie vers l'Asie centrale
Mandshurica	F	Chine, Japon, Corée, Est de Russie
Nigra	F	Est USA et Sud-Est du Canada
chinensis subsp. Chinensis	O	Chine, Crée, Vietnam, Thaïlande
chinensis subsp. Rhynchophylla	O	Nord Chine, Corée, Japon, Sud-Est Russie
Lanuginosa	O	Japon
Sieboldiana	O	Chine, Japon, Corée
Ornus	O	Centre et Est Méditerranée, Asie du Sud-Ouest
Paxiana	O	Himalaya, Chine
Platypoda	U	Chine, Japon
Quadrangulata	D	Centre et Est USA, Centre Canada
Albicans	M	Texas, Oklahoma (États-Unis)
Americana	M	Est des USA et Sud-Est du Canada
Latifolia	M	Ouest des États-Unis, Sud-ouest du Canada
Pennsylvanica	M	Centre et Est des États-Unis, Sud du Canada
Profunda	M	Est des États-Unis et Canada

I.8.Effets thérapeutiques de la plante

I.8.1.Utilisation en médecine traditionnelle

Au fil des siècles, les produits naturels issus des plantes ont prouvé leurs efficacités en tant que principale source de nouveaux produits chimiques ayant un potentiel thérapeutique (Rasul et al, 2013 ; Harvey, 2015). Environ 80% de la population mondiale dépend de plantes médicinales (Sen et Samanta, 2015). Différentes études menées par des chercheurs ont rapporté que les produits naturels sont anticancéreux antibactériens, antifongique antiviral antioxydant activités anthelminthiques et anti-inflammatoires (Fig. 3) (Sarfraz et al, 2017).

On trouve une gamme des produits naturels obtenus à partir de plantes médicinales qui sont devenues proéminentes dans la pharmacothérapie moderne comme agents anticancéreux y compris secoiridoids, phényléthanoïdes , lignanes, flavonoïdes et coumarine, ces composé sont été isolés de la plante de *Fraxinus* (Kostova et Iossifova, 2006).

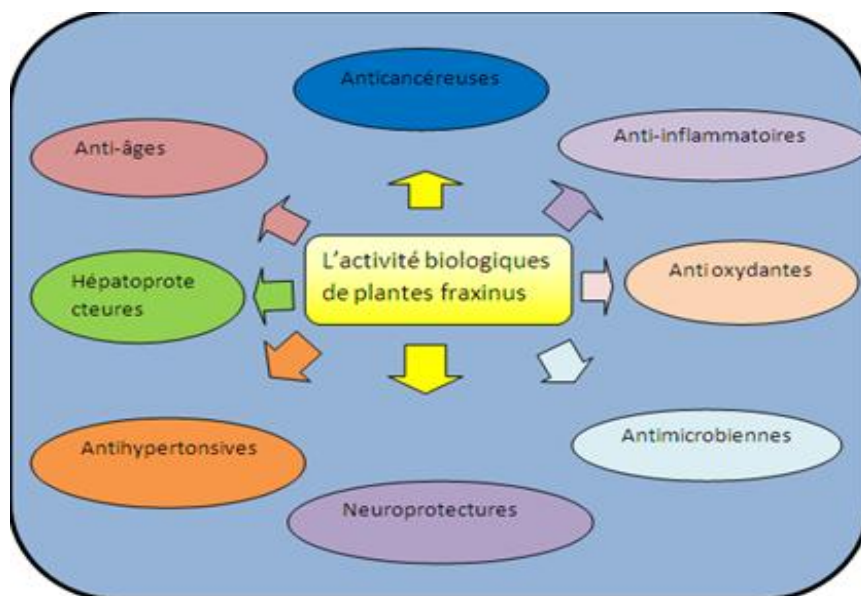


Figure 3 : Différentes activités biologiques de *Fraxinus angustifolia* (Sarfraz et al, 2017).

I.8.2.Donnés phytochimiques

L'esculétine, l'esculine, la fraxine et la fraxétine font partie des composants pharmacologiquement actifs isolés de différentes espèces de *Fraxinus* (Fig.4). Esculetin a été largement utilisé dans la phytothérapie chinoise en raison de ses vastes activités pharmacologiques telles qu'antioxydant, anticancéreux, antibactérien et anti-inflammatoire (Kostova et Iossifova, 2006).

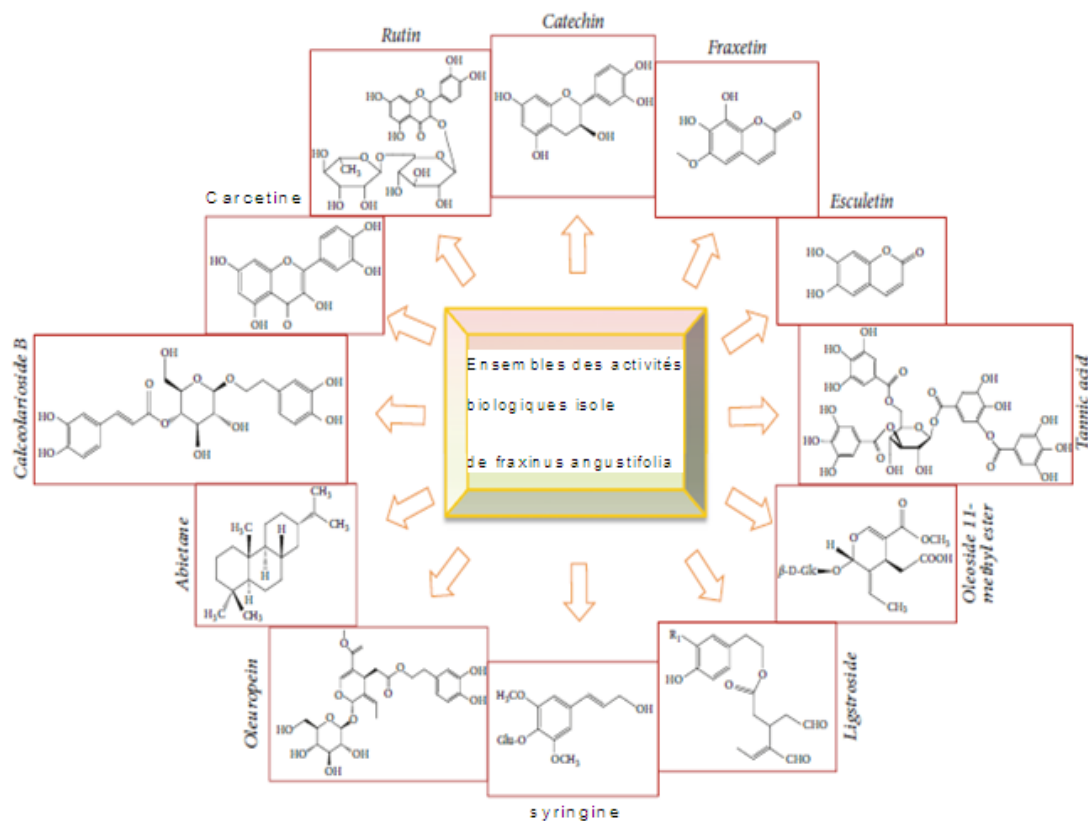


Figure 4 : Composés biologiques actifs isolés de *Fraxinus angustifolia* (Sarfraz et al , 2017).

I.8.3.Donnés pharmacologiques

Le frêne est considéré comme une plante polyvalente a activités biologiques et pharmacologiques. Elle a fait preuve de plusieurs effets thérapeutiques tel que : anticancéreux, anti-inflammatoire, antioxydant, antimicrobien et neuro-protecteur, ses composés phytochimiques bioactifs sont utilisés dans l'industrie cosmétique et comme agent anti-âge compétent (Sarfraz et al, 2017). Les molécules isolées à partir des feuilles et de l'écorce de fraxinus représentent des candidats médicamenteux efficaces qui devraient être utilisé pour la découverte de médicaments à l'avenir (Sarfraz et al, 2017).

I.8.3.1.Effet antioxydant

Les radicaux libres tel que l'oxygène singulier¹O₂, l'anion superoxyde O₂⁻, l'hydroxyle d'oxygène OH[•]et peroxyde d'hydrogène H₂O₂ sont connus pour avoir des effets délétère sur les fonctions cellulaires et par conséquent l'apparition de plusieurs maladies (Younis et al, 2016). Les radicaux libres ont la capacité d'interagir avec des composants cellulaires et causants ainsi des dommages à l'ADN.L'extrait méthanolique des feuilles de *Fraxinus floribunda* a prouvé un effet anti-inflammatoires in vivo chez un modèle de rat (Sarfraz et

al, 2017). Plusieurs autres études ont liés l'effet hépato-protecteur contre le tétrachlorure de carbone (CCl₄) des extraits de *Fraxinus xanthoxyloides* à leurs pouvoirs antioxydant (Younis, 2016), liant cet effet à la production excessive de radicaux libres par l'organisme qui bloque le système de protection naturel causant des lésions hépatiques (Chen et al, 2013).

I.8.3.2.Effet anticancéreux

Diverses études ont révélés que la plante *Fraxinus* est un candidat biologique notable de médicament, grâce à sa capacité d'inhiber la cancérogenèse en ciblant diverses protéines de réseaux de signalisation associée à la multiplication des cellules tumorales. (Fig.5) (Sarfranz et al, 2017).

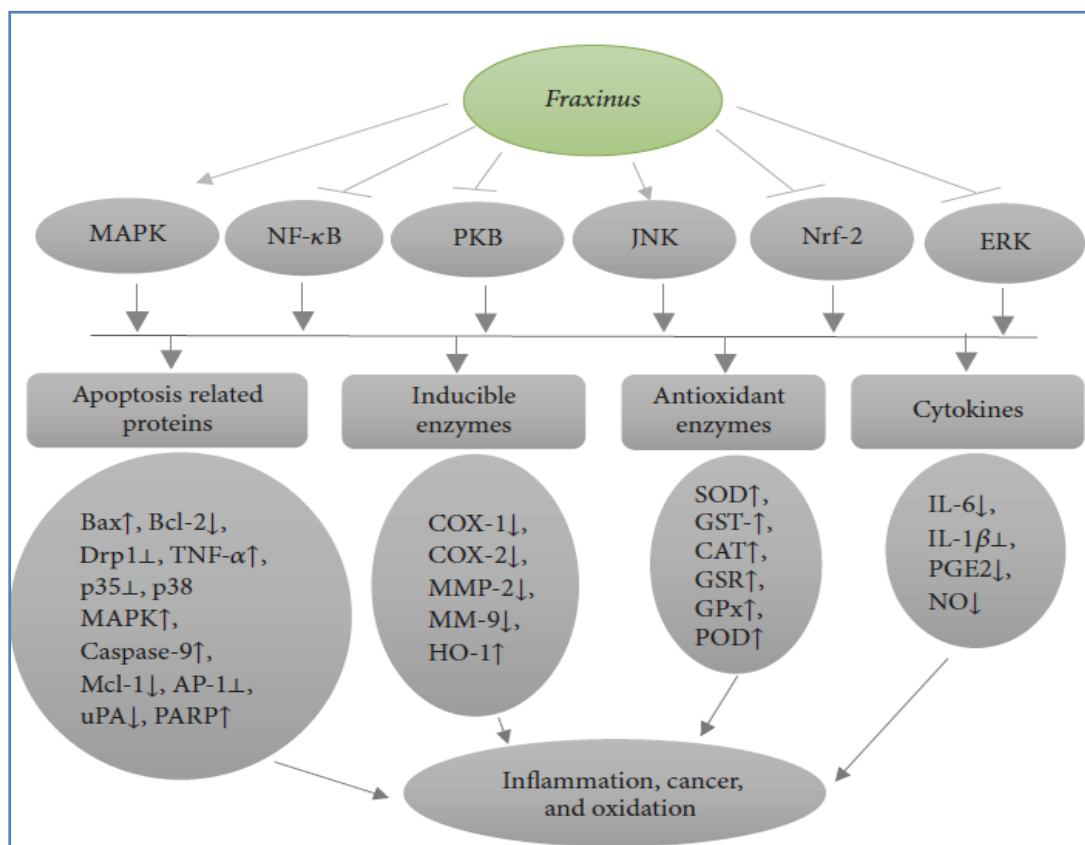


Figure 5 : Diagramme représentant les cibles moléculaires et le mécanisme d'action de *Fraxinus* pour les activités : chimio préventive, anti-inflammatoire et antioxydants.

(Sarfranz et al, 2017).

Tableau II : Différentes activités et Molécules active de *Fraxinus angustifolia* (Sarfraz et al, 2017).

Activités étudiées	Molécules actives (extraite)	Plantes médicinales	Références
anti-inflammatoires sur BV-2 cellules microgliales	Oleuropéine(composé phénolique isolé des feuilles)	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	(Packer et al, 2001).
régule la production de médiateurs	Extrait méthanolique brut des feuilles	<i>Fraxinus Xanthoxyloides.</i>	(Younis et al, 2016)
Anti-inflammatoires	La 5-methoxyl aesculetin (MOA) de l'écorce	<i>Fraxinus rhynchophylla</i>	(Wang et al, 2014)
Anti-inflammatoire	d'extraits de feuilles méthanoliques	<i>Fraxinus floribunda</i>	(Lingadurai, 2007)
anti-inflammatoire	extrait éthanolique aqueux	<i>Fraxinus excelsior</i>	(Smith et al, 1996)
Inhibiteur de la cholinestérase (agent neuro-protecteur de la maladie d'Alzheimer)	Galanthamine	Galanthusnivalis L.	(Sarfraz et al ,2017)

I.8.3.3. Activité anti-inflammatoire

Le mécanisme de la réponse inflammatoire varie en fonction des pathologies, la production des prostaglandines est la principale cause des inflammations, ils sont formées à partir d'arachidonate par l'action des iso enzymes de la cyclo-oxygénase (COX) (Sarfraz et al, 2017). Les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) provoquent des effets nocifs rénaux et gastriques, d'où le besoin alternative aux inhibiteurs cyclo-oxygénases naturels (Lingadurai et al, 2007).

L'Oleuropéine, un composé phénolique isolé des feuilles de *Fraxinus rhynchophylla*, a montré des effets anti-inflammatoires sur BV-2 cellules micro gliales par suppression de la réponse pro-inflammatoire par l'inhibition efficace de la fission mitochondriale dépendant de *DRP1* (Wasik et Antkiewicz., 2017).

I.8.3.4. Activité antimicrobienne

Les scientifiques ont découvert une variété de métabolite secondaire, connus pour présenter des activités antimicrobiennes. La résistance aux antibiotiques demeure un problème pour les traitements anti infectieux, jusqu'à la découverte d'agent antibactériens naturel (**Lee et al, 2011**). Les mécanismes d'action antimicrobien associés à La *fraxétine* indique l'inhibition du topo isomérase-1 et topo isomérase-2 et une augmentation remarquable de la perméabilité membranaire des macromolécules telles que l'ADN, L'ARN et les protéines (**Wang et al., 2014**).

I.8.3.5. Activité neuro-protectrice

Le mécanisme neuro-protecteur des composés naturels dépend de leur capacité de piéger les radicaux libres générés par la neurotoxine et le processus oxydative induits dans les cellules nerveuses (**Wasik et Antkiewicz., 2017**). Le glutamate en tant que neurotransmetteur provoque l'activation des récepteurs du glucose et surcharge de calcium neuronal (Ca^{2+}), qui conduit à une lésion neuronale (**schin et al, 1998**).

La plupart des études se concentre sur quelques constituants chimiques, et les données sur la pharmacocinétique de l'extrait végétal entier sont limitées (**Sarfraz et al, 2017**).

I.8.3.6. Activité antifongique

Les produits de protection proviennent de substances naturelles provenant principalement de plantes comme alternative aux *fongicides synthétiques*. Les agents antimicrobiens naturels sont moins coûteux et ils ont un potentiel antifongique prometteur (**Sarfraz et al, 2017**).

I.8.3.7. Anti hypertensif

Les chercheurs ont décrit une variété de composés bioactifs trouvés dans des substances naturelles qui jouent un rôle vital dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires maladies causées par la vasodilatation et l'hypertension (**Sarfraz et al, 2017**).

I.8.3.8. Antimalarial

Une situation alarmante de résistance contre les médicaments antipaludiques conduit à l'exigence de prix abordable du traitement à base de plantes médicinales (**Kaushik et al, 2015**). Les scientifiques ont décrit le potentiel anti plasmodium des extraits de plante.

Plusieurs études in vitro ont été mis en œuvre pour vérifier l'effet de l'extrait aqueux et organique de l'écorce de *Fraxinus excelsior* sur la croissance de *Plasmodium falciparum*, les scientifiques suggèrent qu'il possède des effets inhibiteurs importants sur le développement des stades asexués de *Plasmodium falciparum* (Sarfraz et al, 2017).

I.8.3.9. Anti toxoplasmose

La toxoplasmose, infection à protozoaires causée par *Toxoplasme gondi*, est généralement asymptomatique, mais a des manifestations cliniques graves chez les individus immunodéprimés (Sarfraz et al, 2017), l'extrait de *fraxinus* a montré un effet important dans la régulation de l'immunité, et peut servir comme médicament efficace et sûr contre la *toxoplasmose* (Sarfraz et al , 2017).

I.8.3.10. Anti vieillissement

Les plantes médicinales sont très riches en composés polyphénoliques et ont été largement utilisés dans les cosmétiques pour leurs propriétés antiviellissement (Mizutani et Masaki, 2014). L'extrait de *Fraxinus chinensis* a entraîné des effets protecteurs contre le vieillissement via la régulation négative de l'ARNm de la MMP-1 en fonction de la dose, les composant de cette espèce agit comme agent anti radicalaire (Sarfraz et al, 2017).

I.8.3.11. Activité antidiabétique

L'étude des effets de l'extrait de *Fraxinus excelsior* L. sur la glycémie postprandiale chez les personnes normaux montre la baisse de la glycémie (Mizutani et Masaki, 2014). L'activité hypoglycémiant a été évaluée chez le rats diabétiques induit par la streptozotocine (STZ), et les résultats ont été prometteurs d'où une diminution de la glycémie de 60% induite par les feuilles de *F.angustifolia* (Medjahed et al., 2016), d'autres part aucune preuve clinique n'existent à cet égard (Kaushik et al, 2015). Par conséquent, les stéroïdes glycosides présents dans les graines de *Fraxinus excelsior* .L ont prouvé un effet stimulateur sur la sécrétion d'insuline (Sarfraz et al, 2017) et améliore la résistance à l'insuline (Schin et al, 1998). Les graines de *Fraxinus excelsior* L. ont été reconnus comme agents hypoglycémiant par plusieurs guérisseurs traditionnels qui l'utilisent contre le diabète de type 1 et de type 2 (Medjahed et al., 2016).

I.8.4. Donnés toxicologies

Les antioxydants sont des molécules en général faiblement toxiques. Pourtant, pour certains d'entre eux, leur utilisation à forte dose n'est pas dénuée de danger. Par exemple, le radical α -tocophérol (α -TO.) stabilisé par mésomérie, peut initier des réactions d'oxydation avec les acides gras mono et poly insaturés des phospholipides membranaires (LH, LOOH) à l'origine de radicaux libres, et peut ainsi contribuer à la phase de propagation des réactions radicalaires survenant dans la peroxydation lipidique. Ce rôle pro oxydant de l' α -tocophérol en tant qu'initiateur des réactions radicalaires n'est néanmoins possible que si le radical α -tocophérol est présent en forte concentration dans les membranes et que la vitamine C n'assure pas sa régénération (**Pastre et Priymenko, 2007**).

Chapitre II: Les systèmes antioxydant

II. systèmes antioxydant

II.1. Généralités

Les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non enzymatiques qui suffisent à neutraliser le stress oxydant, résultant du métabolisme aérobie, appelé antioxydant (Wassmann et al, 2004). Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable à concentration relativement faible d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Mates, 1999 ; Droge, 2002).

II.2. 1. Définition de radical libre

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne (Janssen ,2007). Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, on peut distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie, radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (*radical peroxy* ROO^{\bullet} , *radical alkoxyle* RO^{\bullet}), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule(Fig.6) (Novelli, 1997 ; Goudable et Favier, 1997 ;Favier, 2003).

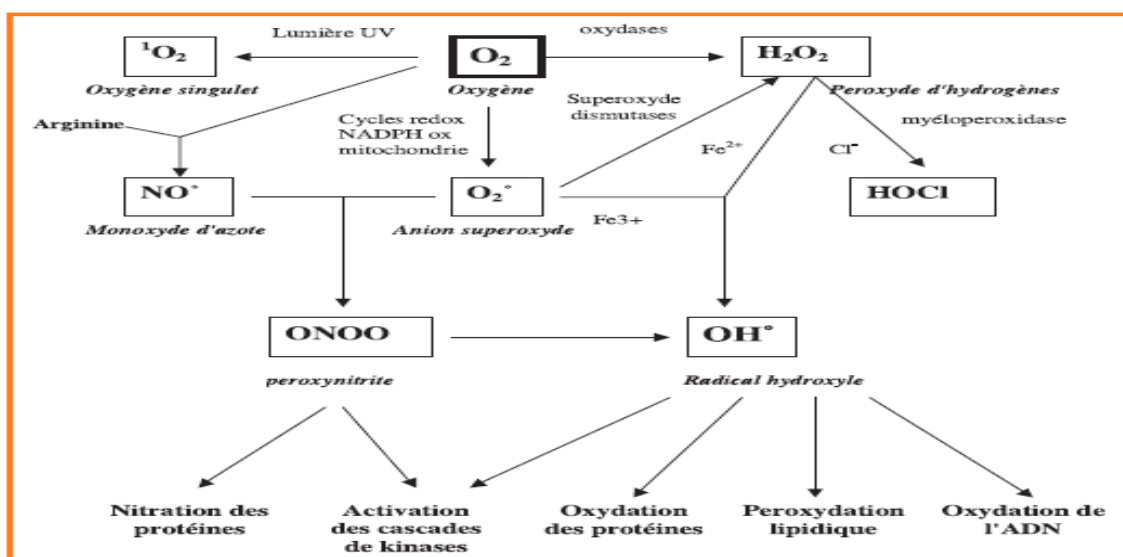


Figure 6 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

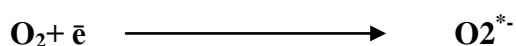
II.2.2. Définition de stress oxydant

Le stress oxydant c'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 antioxydant des cellules vivantes (**Favier,2003; Widmer et al,1996**). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (**Favier,2003**).

II.3. Principaux radicaux libres

II.3.1. Anion superoxyde

Il est considéré comme le type le moins réactif des *ERO* et le radical le plus fréquemment produit dans l'organisme ou par la fumée de cigarette ou les radiations ionisantes particulièrement impliquées dans les pathologies pulmonaires (**Ames et al, 1993**). Il est chargé négativement et généré par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire (**Lacolley et al , 2007**). Cette réaction semble surtout catalysée par des NADPH oxydases membranaires (**Ames et al, 1993**).

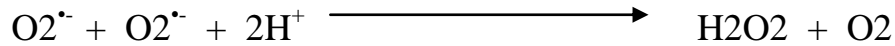


Dans des conditions physiologiques et physiopathologiques, l' $\text{O}_2^{\bullet -}$ peut également être formé dans certains organites cellulaires (**Gardès et Jore, 2005**), tels que les peroxysomes, via la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique, catalysée par la xanthine oxydase (**Helliwell, 1989**).



II.3.2. Peroxyde d'hydrogène

Le Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui n'est pas un radical libre, peut être formé secondairement à la dismutation de $\text{O}_2^{\bullet -}$ par le superoxyde dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases, notamment *l'acyl CoA* déshydrogénase, la NADH déshydrogénase, la xanthine oxydase, l'uricase, la mono-amine oxydase...etc (**Helliwell, 1989**).

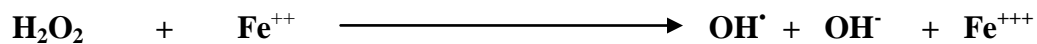


En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l' H_2O_2 donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO^{\cdot} hautement réactif (**Wardman et Andeias, 1996**).

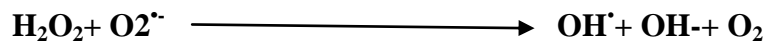
Contrairement à l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est capable de traverser les membranes des cellules et des organites cellulaires pour engendrer des dommages loin de son site de production (**Halliwell et Gutteridge, 1996**).

II.3.3. Radical hydroxyle HO^{\cdot}

Le radical hydroxyle est l'oxydant le plus réactif et le plus puissant. (**Favier, 2003**). Le peroxysome grâce à des oxydases spécifique représente l'une des sources productrices les plus importantes de ce radical (**Pastre et priymenko, 2007**). Parmi les voies conduisant à la formation de ce radical on peut citer celle qui implique les métaux de transition, le cuivre et le fer sous leur forme réduite par la réaction de fenton (**Favier, 2003**).



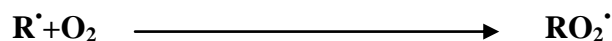
L' H_2O_2 peut aussi réagir avec le radical superoxyde, aboutissant à la production du HO^{\cdot} , ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (**Sorge, 2004**).



Le HO^{\cdot} est capable de réagir avec la plupart des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les sucres et les lipides membranaire (**Delattre et al., 2005**).

II.3.4. Radicaux alkyles R^{\cdot} et peroxy ROO^{\cdot}

Les radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés R^{\cdot} .



Les radicaux R^{\cdot} sont généralement issus de l'action des radicaux hydroxydes sur les substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons) (**Delattre et al., 2005**).



II.3.5. Oxygène singlet (O_2)

Il correspond à une forme excitée de l'oxygène O_2 , il possède la même structure électronique que l'oxygène, mais «agencée» différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état «excité» lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène (Bonnefont *et al.*, 2003).

II.3.6. Monoxyde d'azote NO

Le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique) est un radical libre ubiquitaire synthétisé dans la cellule endothéliale à partir de l'arginine et l' O_2 grâce à l'action de NO synthase (Bonnefont *et al.*, 2003; Vincent et Martin, 2008).

II.4. Antioxydants

II.4.1. Définition

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS (Favier, 2003). Un antioxydant peut retarder ou empêcher l'oxydation des substances biologiques, ce sont alors des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent inoffensifs (Vincent et Martin, 2008).

II.4.2. Types des antioxydants

Il existe deux types d'antioxydants qui se distinguent par leur mécanisme d'action (Fig.7)

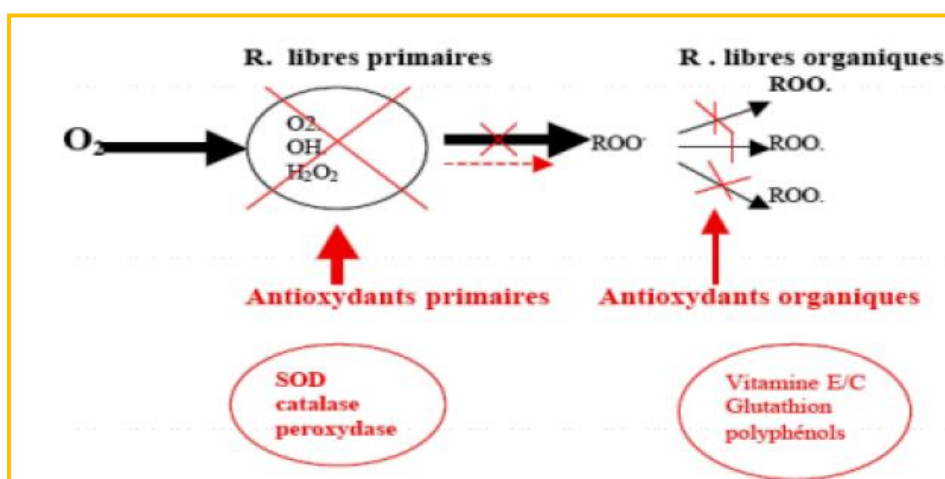
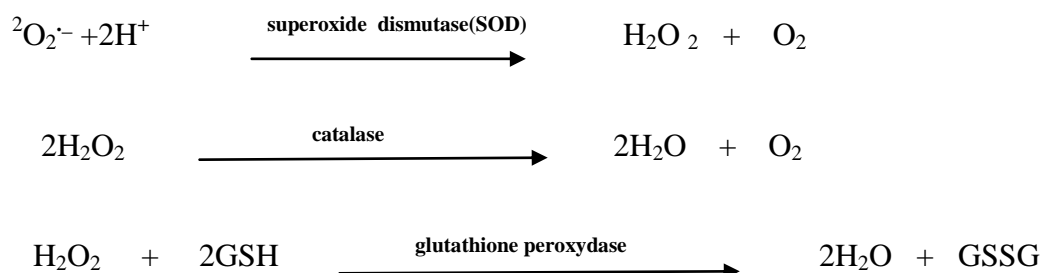


Figure 7 : les systèmes de défense contre les radicaux libres (Kohen et Nyska, 2002).

II.4.2.1. Antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydants qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (Favier, 2003). Ces enzymes antioxydants permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes (Favier, 2003).



II.4.2.2. Antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes, contrairement aux enzymes antioxydants, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Kohen et Nyska, 2002).

II.4.3. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Les ROS ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (Favier, 2003). Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès, on dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution ...) ou d'une diminution des capacités antioxydants (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense (Fig. 8) est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (Kohen et Nyska, 2002).

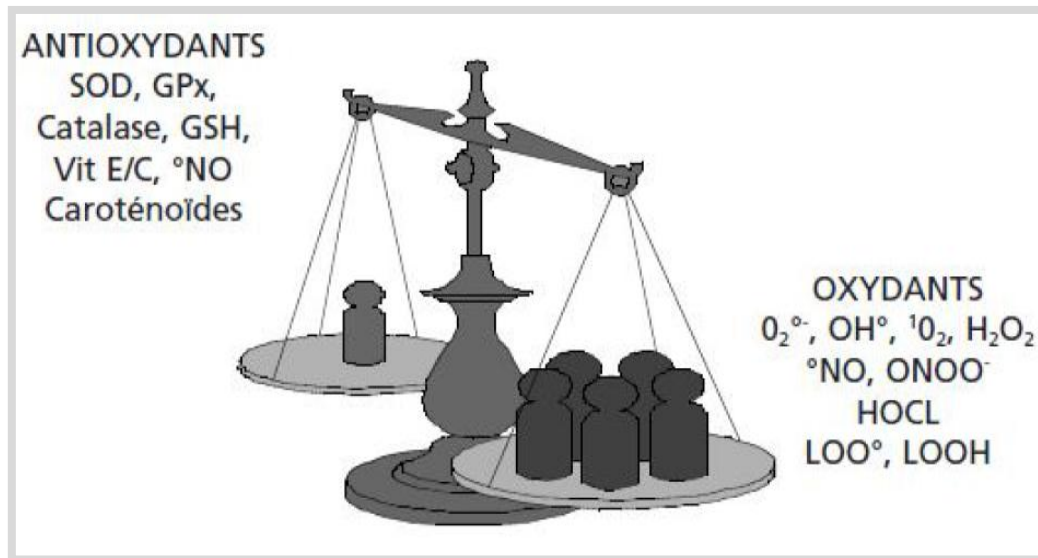


Figure 8 : Déséquilibre Antioxydant /Oxydant (Vincent et Martin, 2008).

II.4.4 .Mécanismes d’action des antioxydants

Les mécanismes d’action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l’oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d’addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Fig.9) (Favier, 2006 ; Cano et al,2007).

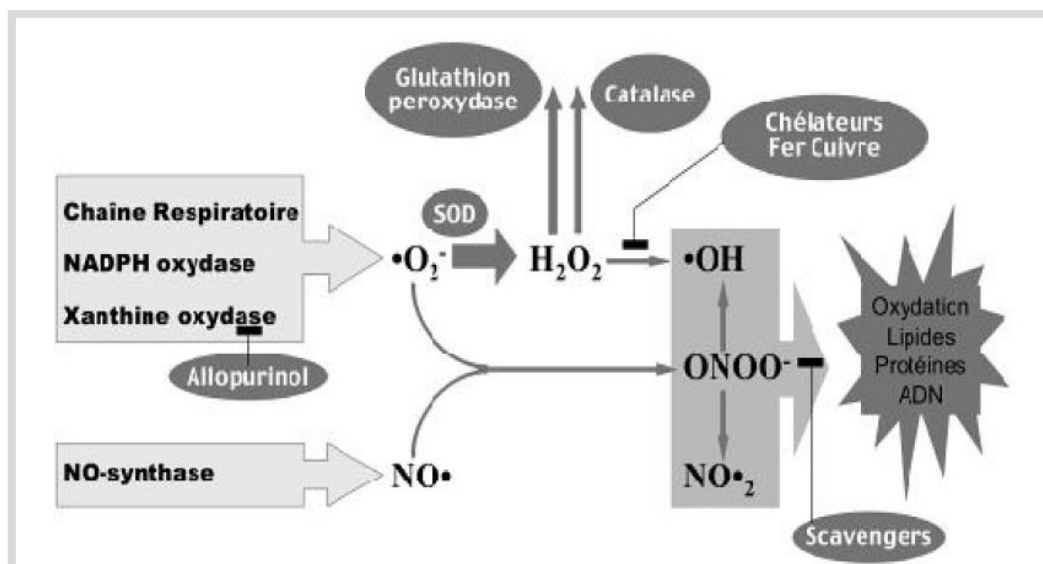


Figure 9: Action de l’antioxydant au cours du métabolisme des dérivés réactifs de l’oxygène (Cano et al. 2007).

II.5. Systèmes de défenses antioxydants

Les systèmes antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine, ils comprennent des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques (**Fig.10**). Mais aussi des petites molécules hydro ou liposolubles (**Droge, 2002; Delattre et al., 2005**).

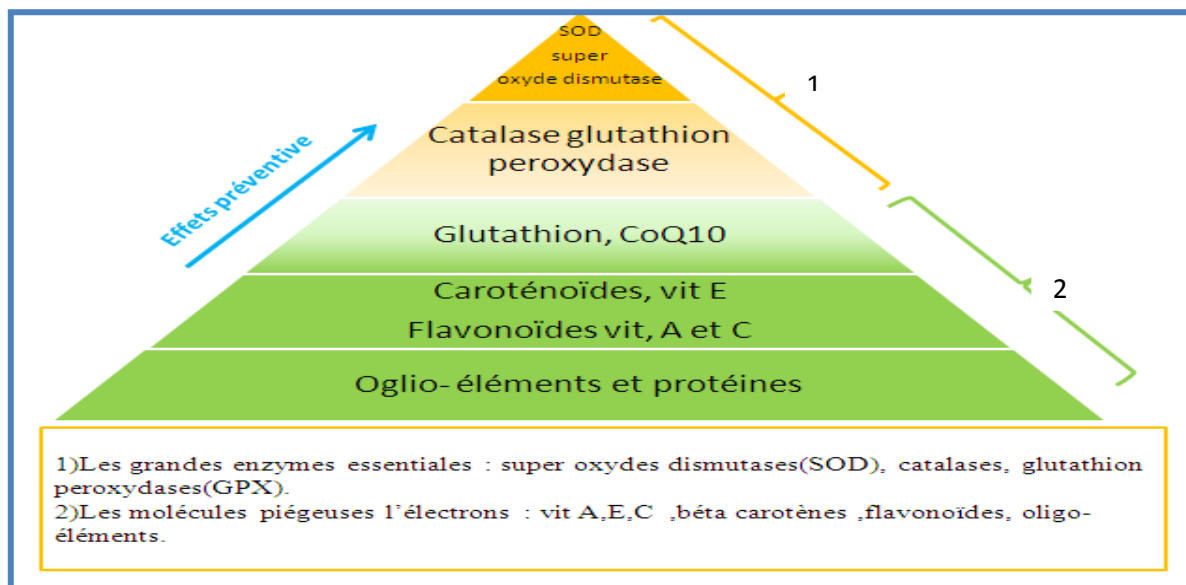


Figure 10: Antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (**Menvielle. 2005**).

II.5.1. Système antioxydant enzymatique

Les protéines enzymatiques antioxydants constituent la première barrière de la défense antioxydants, qui est constituée de trois métallo-enzymes essentielles: les superoxydes dismutase, la catalase et les glutathions peroxydases. Leurs activités et leurs localisations dans la cellule sont complémentaires et assurent l'élimination des anions superoxyde et du peroxyde d'hydrogène dans tous les compartiments intracellulaires (**Fig. 11**) (**Favier, 2003**).

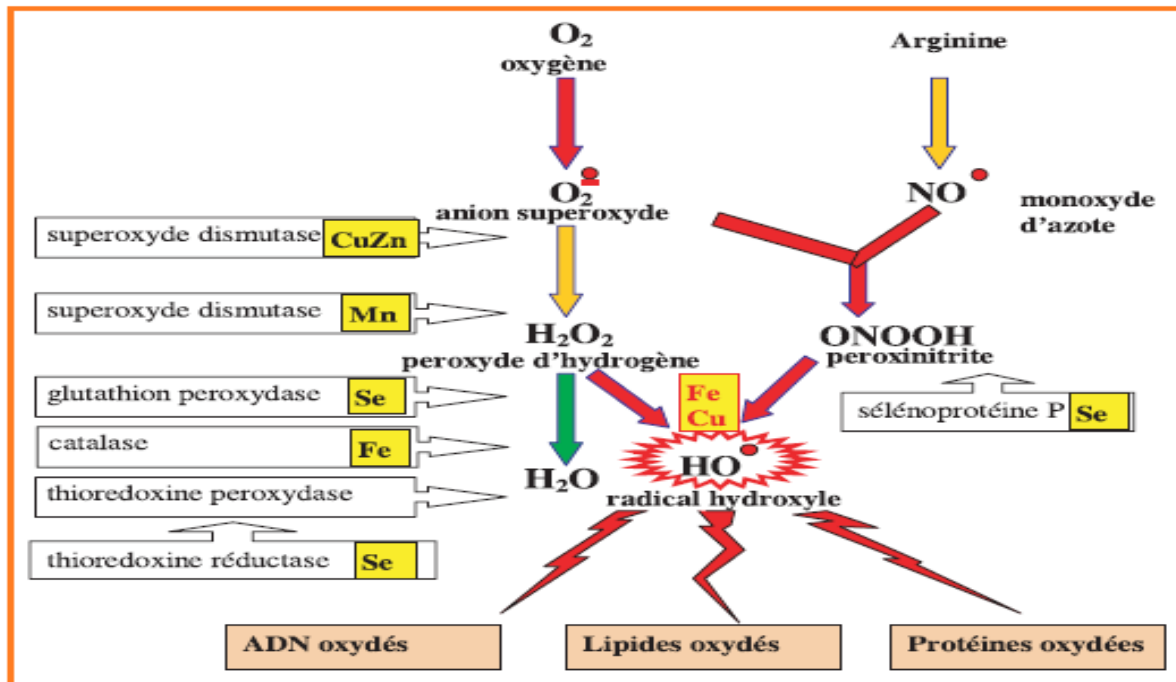
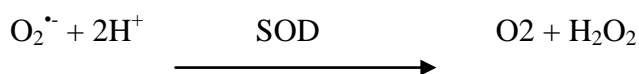


Figure 11 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

II.5.1.1. superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutase ou SOD sont des antioxydants enzymatiques ubiquitaires. Ces métalloprotéines représentent l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant en assurant l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire (Fig12) selon la réaction suivant: (Halengat *al*, 2007).



II.5.1.2. Catalase

La catalase est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans la condition physiologique (Niki *et al*, 2007). Elle est localisée principalement dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (Lindau *et Shaffer*, 1993).



II.5.1.3. Glutathions peroxydase (GPX)

Le glutathion peroxydase permet de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne, en réduisant les peroxydes instables en acide gras hydroxylés. Ce système ne fonctionne que

si le GSSG formé est continuellement réduit en GSH, ce qui est assuré par la glutathion réductase en présence de NADPH. (Fig 10) (Matés et al, 1999; Fisher et al, 1999; Delattre et al, 2005 ;Lacolley et al , 2007).

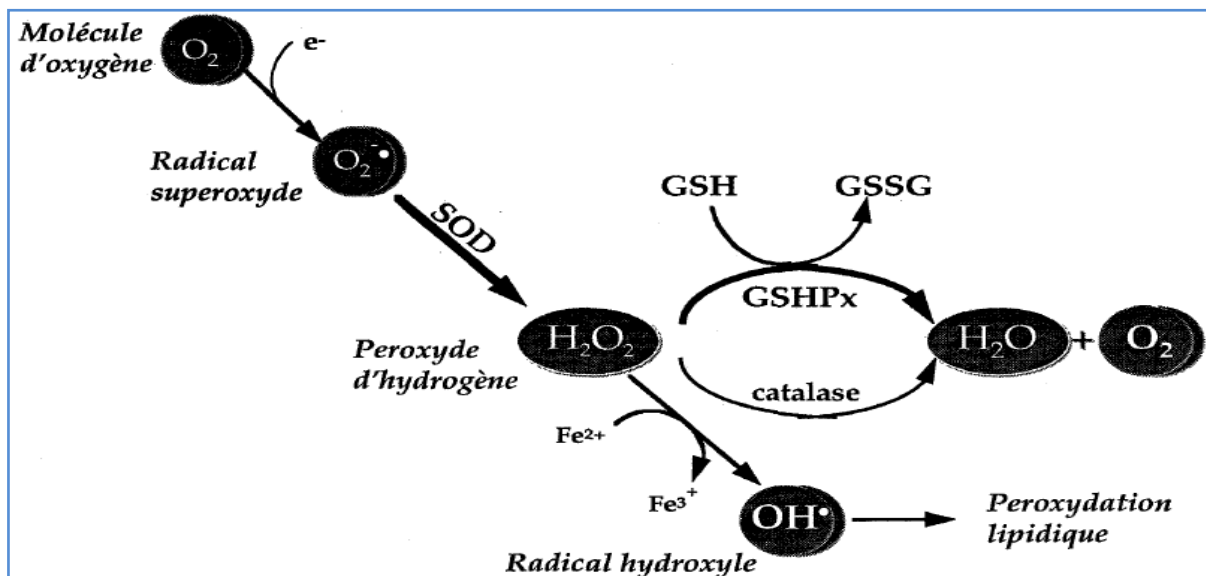


Figure 12: Principales étapes de production de l'espèce réactive de l'oxygène (Goudable et Favier, 1997).

II.5.2. Système antioxydant endogène non enzymatique

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q.

II.5.2.1. Glutathion

GSH est un tripeptide (Lγglutamy-l-cystéinyl-glycine) impliqué dans de nombreux processus au niveau intracellulaire. Son rôle dans la détoxification de xénobiotique (Beaudeau et Geneviève, 2011) et dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation a été bien établi (Stamler et Slivka, 1996). Le glutathion agit également comme Co-substrat d'enzymes antioxydants telles que la glutathion peroxydase, glutathion réductase et transférase (Ravi et al, 2004).

II.5.2.2. Acide urique

L'acide urique s'accumule comme produit final de catabolisme des purines, et est présent en quantité importante dans le plasma humain avant d'être éliminé par voie rénale (Lacolley et al, 2007 ; Haleng et al, 2007).

II.5.2.3. Bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales. Ce composé liposoluble est capable de piéger les radicaux peroxy, l'oxygène singulet et le radical hydroxyle, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (**Algeciras S et al, 2007 ; Halliwell et G, 2007**).

II.5.2.4. Acide lipoïque

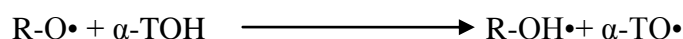
C'est un antioxydant puissant qui peut régénérer d'autres antioxydants tels que les vitamines C et E (**David, 2015**). Il est capable de piéger le HO^\bullet , ROO^\bullet , HOCl^\bullet et $^1\text{O}_2$ (**Packer et al, 2001**), de chélater les métaux lourds, réduire la glycation. Produit en petite quantité par le foie, il se trouve également dans certains aliments (la levure, la viande de bœuf, l'épinard, le brocoli...) (**Médart, 2009**).

II.5.3. Système antioxydant exogène

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des *ERO*, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (**Kœchlin-Ramonatxo, 2006**).

II.5.3.1. Vitamine E

La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, cette famille comprend 4 substances (α , β , γ , δ), α -tocophérols est la forme la plus active (**Cuvelier et al, 2003**). Cette vitamine est située dans les lipoprotéines et dans les membranes, elle est capable d'une part, de piéger l'oxygène singulet en s'oxydant en quinone, et d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle HO^\bullet . Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxy ROO^\bullet pour former un radical tocophérol (**Dellatre, 2005**).



II.5.3.2. Vitamine C

La vitamine C Appelée aussi l'acide L-ascorbique, c'est un antioxydant hydrosoluble, qui se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire. Elle peut piéger directement l'anion

superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le radical hydroxyle HO^{\cdot} , l'oxygène singulet et réduit le peroxyde d'hydrogène en eau via l'ascorbate peroxydase (Evans, 2000; Ohla et al, 2005).

II.5.3.3. β carotène

Le β -carotène est capable de piéger les radicaux hydroxyles HO^{\cdot} et peroxydes ROO^{\cdot} et ainsi d'inhiber les chaînes de peroxydations lipidiques, il neutralise également l'oxygène singulet 1O_2 .

(Evans, 2000; Ohla et al, 2005).

II.6. Polyphénols

Les poly phénols sont des pigments végétaux dont les propriétés antioxydants, les plus importants sont les flavonoïdes (Médart, 2009). Ils sont naturellement capables de piéger l'oxygène singulet 1O_2 et le radical anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en le dismutant en H_2O_2 (Chen et al, 2003). Leur effet protecteur est notamment connu dans le système cardiovasculaire où ils préviennent l'oxydation des protéines (Lehucher et al, 2001).

II.6.1. Biosynthèse de polyphénol

Les voies de biosynthèses des composés phénoliques sont maintenant connues dans leurs grandes lignes, La voie de l'acide shikimique et acétique (Macheix, 2013).

II.6.1.1. Voie de l'acide shikimique

Voie du shikimate, est issu du phosphoénol pyruvate (PEP) (produit final de la glycolyse) et du D-érythrose-4-phosphate issu de la voie des pentoses phosphates ou du cycle de Calvin via une aldolase (Lacampagne, 2010). La première étape clé dans la voie de l'acide shikimique est la condensation de érythrose-4-phosphate du pentose phosphate, elle conduit à la formation de trois acides aminés aromatiques, le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. La production de composés phénoliques est catalysée par la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL), par lequel. PAL est une enzyme clé de la passerelle dans le secondaire voie métabolique menant à la synthèse de phénol (Ghasemzadeh, 2011).


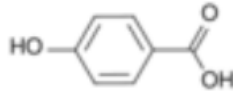
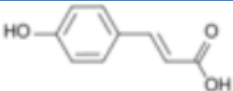
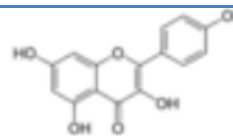
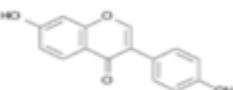
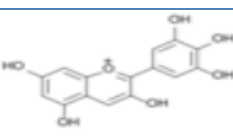
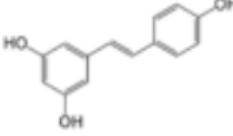
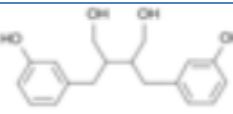
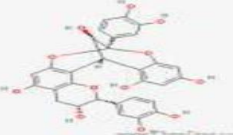
II.6.1.2. Voie de l'acide acétique

Voie de l'acétate provient essentiellement de la glycolyse où sous l'action de l'acétyl-CoA-carboxylase, il est transformé en malonyl-CoA (Lacampagne, 2010), les esters CoA sont à leur tour à l'origine de la plupart des classes de composés phénoliques (Macheix, 2013).

II.6.2. Classification des polyphénols

On distingue différentes classes des polyphénols, en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base (**Tableau III**).

Tableau III : Principales classes de composés phénoliques (**Macheix,2013**) .

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine	Structure
C ₆	Phénol simples	Hydroquinone	Busserole	
C ₆ -C ₁	Acide hydroxybenzoïque	β hydroxybenzoïque	Epice ,fraise	
C ₆ -C ₃	Acide hydroxycinnamique	Acide caféïque Acide férulique	Pomme de terre, pomme ,citrusse	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides	Quercitine	Fruit,légumes	
	Isoflavonoides	Cyandine diadzéine	Fleure,soja,pois	
	Anthocyanes	Dalphinol	Dalbergia sissoa	
C ₆ C ₂ C ₆	Stilbenes	Resvératol Hydrongénol Pinosylvine	Vigne	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinurisinol Matairésinol	Pin	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensé	Aesculitanins	Marroniere d'inde vigne	

II.6.2.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des métabolites secondaires présents dans tout le règne végétal. Ces composés forment un groupe diversifié qui comprend les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (Fig.13) (Ghasemzadeh, 2011).

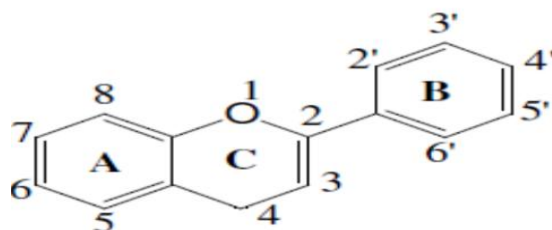


Figure 13 : Structure de l'acide phénolique (Ghasemzadeh, 2011)

II.6.2.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques biosynthétisés à partir de la voie des phénylpropanoïdes à partir de phénylalanine (Dornas, *et al*, 2008; Ghasemzadeh, 2011). Les principales sources des flavonoïdes sont les fruits et les légumes (Dornas, 2008). Ils jouent des rôles importants dans la croissance, la protection contre les pathogènes. (Ghasemzadeh, 2011). Tous les flavonoïdes partagent le squelette de base C6-C3-C6, composé de deux cycles C6 aromatiques (A et B) et d'un noyau hétérocyclique (C) qui contient un atome d'oxygène. Ils ont été classés en six sous-groupes (Macheix, 2013)

1. Flavones (lutéonine, apigénine, tangeritine).
2. Flavonols (quercétine, kaempférol, myricétine, isorhamnétine, pachypodol).
3. Flavanones (hespéridine, naringénine, eriodictyol).
4. Flavan-3-ols: catéchines et épicatechines.
5. Isoflavones (génistéine, daidzéine, glyciteine).
6. Anthocyanidines (cyanidine, delphinidine, malvidine, pélagonidine, peonidine, pétonidine). (Fig 14) (Ghasemzadeh, 2011).

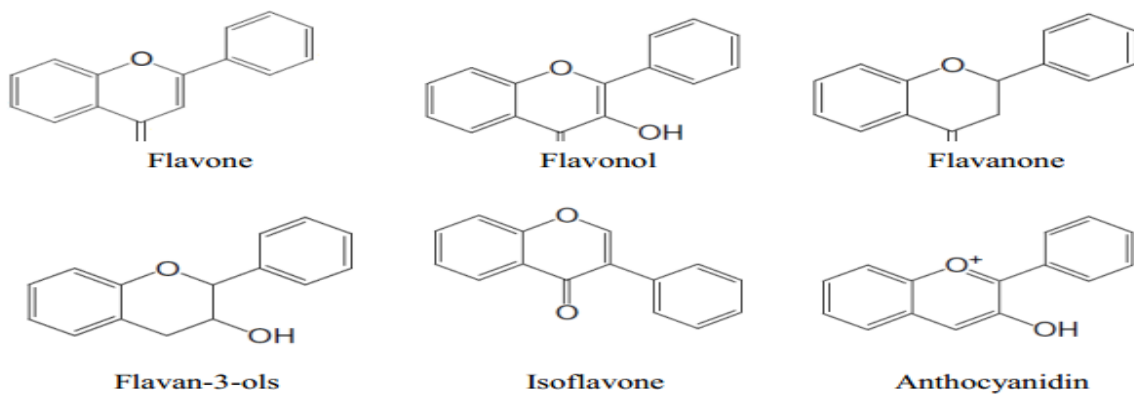


Figure 14 : Structure chimique de six classes de flavonoïdes. (Ghasemzadeh, 2011)

II.6.2.3. Tanin

Les tanins sont présents dans les feuilles, l'écorce, les fruits et les graines de nombreuses plantes. Leur principal fonction est de fournir une protection contre les agents pathogènes microbiens, nocifs (Furlan, 2010). Les tannins ont été classés en fonction de leurs caractéristiques structurales et propriétés chimiques en deux grandes classes à savoir les tanins condensés et les tannins hydrolysable (Furlan, 2010).

II.6.2.3.1. Tanins Condensés

Tanins Condensés connus également sous le nom de proanthocyanidine, sont des oligomères et polymères de flavonoïdes, en particulier flavan-3-ols (Fig 15) (Shahidi et Nacz, 2006).

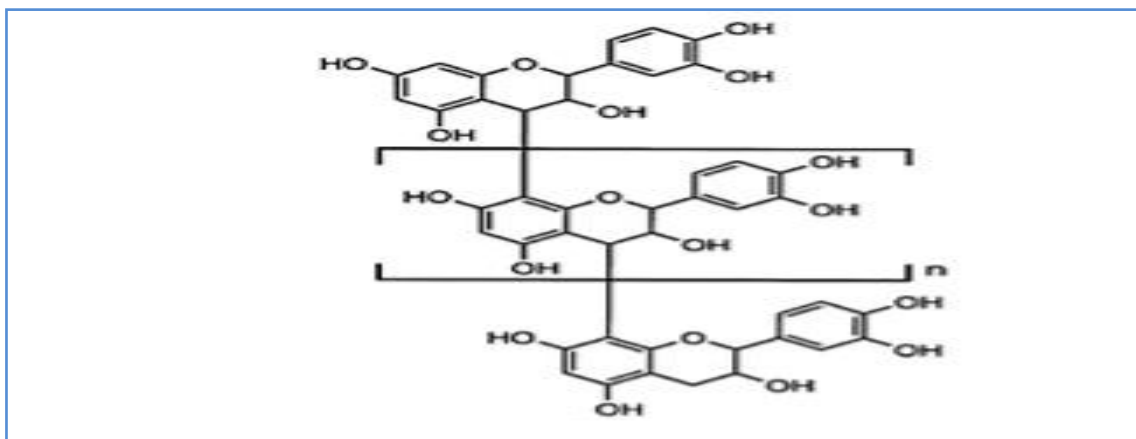


Figure 15 : Structure de tanins condensés. (Shahidi et Nacz, 2006).

II.6.2.3.2. Tanins hydrolysable

Les tanins hydrolysables sont des acides galliques glycosylés, sont liés à des molécules de sucre. Les poids moléculaires de tanins hydrolysables vont de 500 à 2800 Da ou plus. Sur la base de leurs produits d'hydrolyse, les tanins hydrolysables comprennent les gallotannins et les élagitannins. (Fig. 16) (Shahidi et Naczk, 2006).

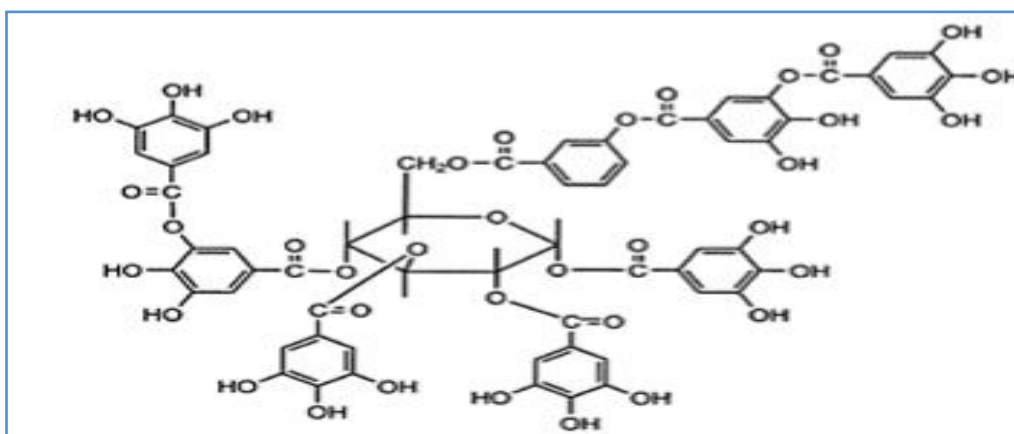


Figure 16: Structure des Tanins hydrolysables. (Shahidi et Naczk, 2006)

II.6.3. Propriétés biologiques des polyphénols

Les composés phénoliques ont divers activités bénéfiques pour l'organisme humain, à savoir des activités anti oxydantes, anti-inflammatoires, antiviraux, antimicrobiennes, et anticancéreuses...ect. (Fig. 17) (Massaux, 2012).

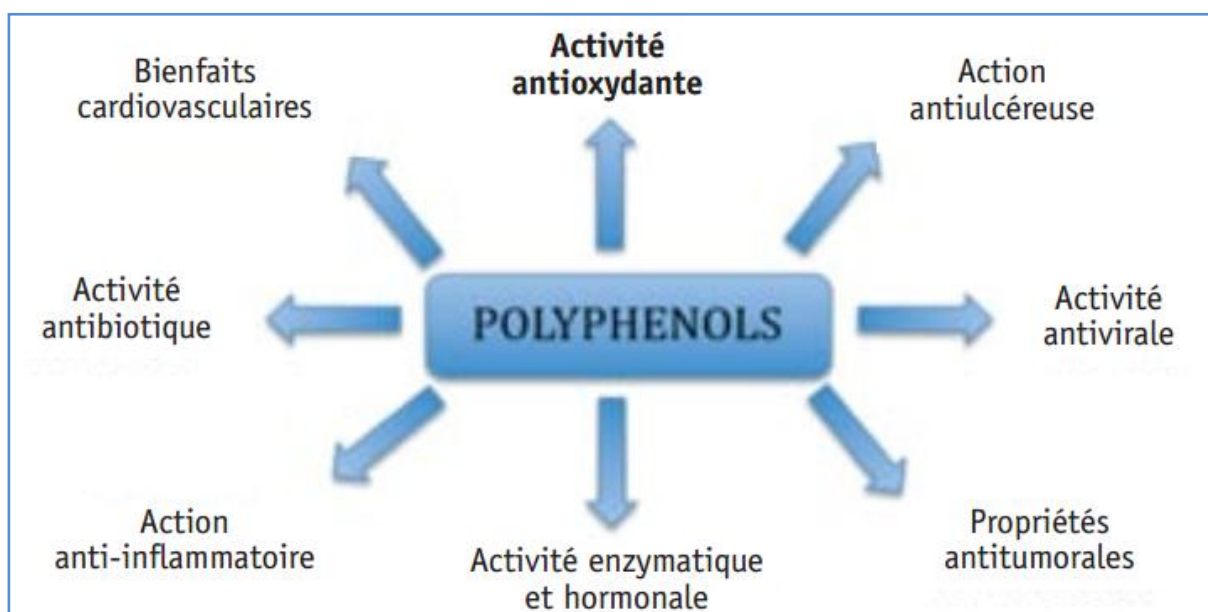


Figure 17: Propriétés des polyphénols. (Massaux , 2012).

Chapitre III: Méthodes de caractérisation

III. Méthodes de caractérisation

III.1.Méthodes chromatographiques

La chromatographie est une technique biophysique qui permet la séparation, l'identification et la purification des composants d'un mélange (Coskun, 2016). Ces composants peuvent être purifiés sur la base de leur caractéristiques telles que la taille, la forme et la charge totale (Rouessac, 2004 ; Coskun , 2016).

III.1.2. Différents types de chromatographie

III.1.2.1. Chromatographie liquide haute performance

III.1 .2.1. 1. Définition

La chromatographie liquide haute performance HPLC (Rouessac, 2004). C'est une méthode d'analyse permettant d'effectuer les contrôles de qualité de manière optimale (rapidité, spécificité) (Ganse et al. 2011). Elle permet de réaliser des analyses qui n'étaient pas possible avec les techniques de chromatographie sur couche mince ou en phase gazeuse (Algeciras, 2007). La chromatographie liquide donne des résultats performants et surtout permet de séparer tous les composants d'un mélange d'une plante, sauf les formes insolubles (Wastiel et Kosinski, 1998). Cette méthode est simple, rapide, précise, reproductible, fiable mais onéreuse. Elle peut être utilisée pour l'analyse quantitative d'autres principes actifs analogues (Ganse et al. 2011).

III.1.2.1. 2. Principe

Les composés à séparer (solutés) sont misent en solution dans un solvant. Le mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique (Sherma et Bernard, 2003). La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression. Les composés en solution se répartissent selon leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire (Sherma et Bernard, 2003).

III.1.2.1. 3. Appareillage

Le HPLC est constitué d'un injecteur qui permette l'introduction des analytes dans un courant liquide (Algeciras, 2007), d'une ou de deux colonnes en acier, de petite dimension (10,50 cm de longueur sur quelques mm de diamètre) (Wastiel et Kosinski, 1998), d'une phase stationnaire et d'une autre mobile. L'échantillon à analyser est injecté en amont de la colonne au moyen d'un injecteur on-line. Le volume d'échantillon est de l'ordre de 1 à 20 μL . La sortie de la colonne est directement branchée au détecteur, selon le type d'analyse, on utilise un détecteur UV, un détecteur de radioactivité, ou les deux en série. La particularité de la CLHP est de faire intervenir des mécanismes d'échange soluté/phase mobile/phase stationnaire basés sur les coefficients d'adsorption ou de partage (Fig 16) (Rouessac, 2004).

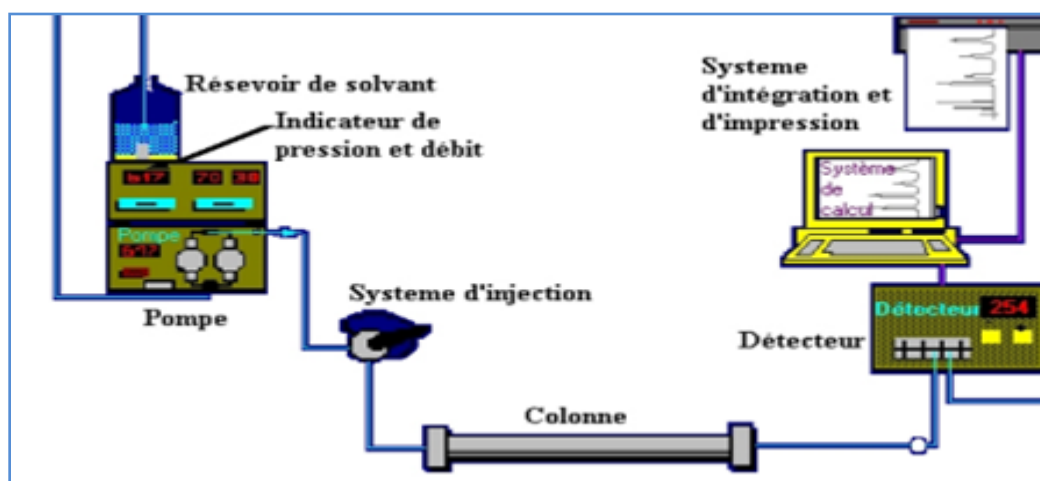


Figure 18 : Exemple d'une chromatographie liquide haute performance (Wastiel et Kosinski,1998).

III.1.2.2. Chromatographie sur couche mince CCM

III.1.2.2.1. Définition

La chromatographie sur couche mince (CCM) connue aussi sous le nom de La chromatographie planaire est une technique complémentaire de la CLHP. (Rouessac et Rouessac, 2004). Bien que la mise en œuvre de ces deux techniques soit différente, le principe de la séparation et la nature des phases restent les mêmes. C'est une Méthode sensible, de faible coût, pouvant être automatisée, elle est devenue désormais indispensable sachant aussi qu'il est possible de mener plusieurs séparations en parallèle. (Rouessac .2004).

III.1.2.2.2. Principe

La séparation par chromatographie plane des constituants de l'échantillon est réalisée sur une fine couche (100- 200 μm) de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium, de quelques centimètres de côté. Pour maintenir la phase stationnaire sur le support et assurer la cohésion des particules, un liant organique est incorporé au cours de la fabrication de la plaque. Le principe de la séparation entre phases est semblable à celui de la CLHP, mais la conduite de l'expérience de CCM est différente (Rouessac, 2004).

III.1.2.2.3. Appareillage

L'appareillage actuel permet de maîtriser les trois étapes essentielles : le dépôt de l'échantillon, la migration sur la plaque et la mesure de concentration (Rouessac, 2004). La phase stationnaire est un absorbant tel que le silicagel ou un support imprégné de cellulose. Les supports conventionnels sont des papiers Whatman (cellulose) ou des supports CCM (silice) commerciaux (Wastiel et Kosinski, 1998). La phase mobile, est constituée d'un mélange de deux ou plusieurs solvants, la phase stationnaire avec la zone initiale est placée dans la phase mobile à l'intérieur d'une chambre fermée. Les composants du mélange migrent à des vitesses différentes (Fig 17) (Sherma et Bernard, 2003).

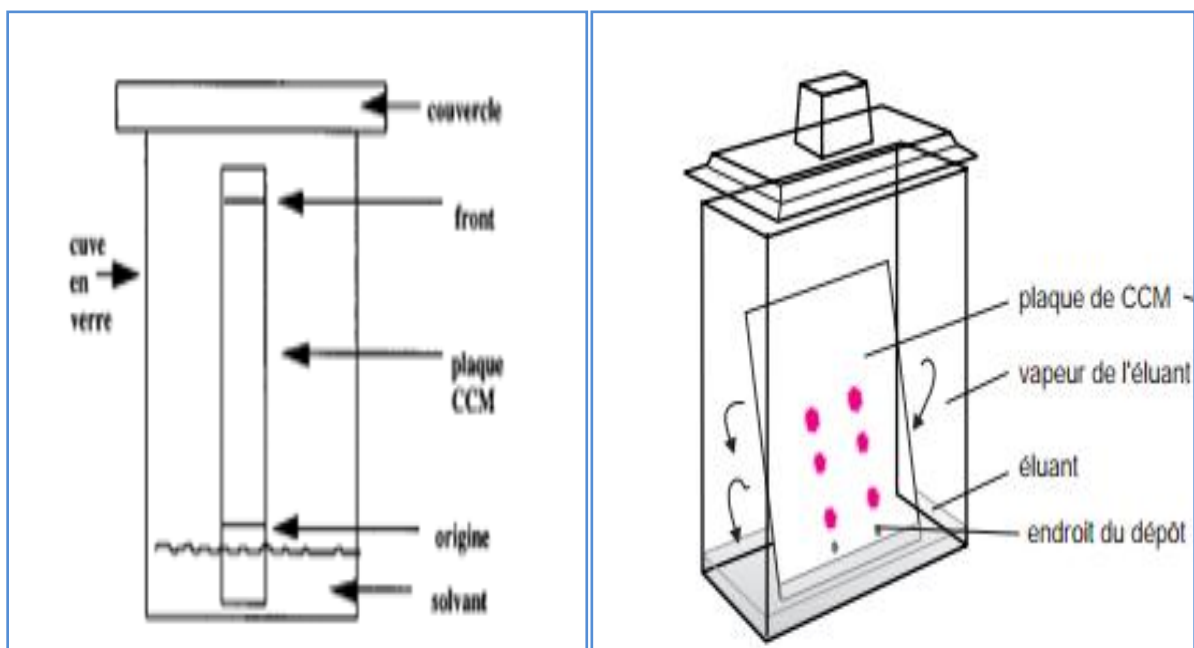


Figure 19 : Exemple chromatographie plane (Rouessac, 2004).

Tableau IV: Quelques méthodes chromatographiques (Berreghioua,2016).

Chromatographie en phase liquide		
	Type	Phase stationnaire
liquide/solide	adsorption	solide poreux
	échange d'ions	solide à la surface duquel se trouvent des sites ioniques qui permettent à l'aide d'un solvant approprié l'échange d'ions présents dans la phase mobile
	exclusion (filtration sur gel, perméable au gel)	solide dont la dimension des pores permet la séparation des espèces selon leur taille
liquide/liquide	Partage phase normale	solide poreux inerte enrobé de liquide (de moins en moins utilisée)
	Partage phase inversée	solide poreux sur lequel sont greffées des chaînes hydrocarbonées non polaires
Chromatographie en phase gazeuse		
	Type	Phase stationnaire
gaz/solide	adsorption	solide poreux
gaz/liquide	partage (partition)	dans les colonnes remplies, solide poreux inerte enrobé de liquide
		dans les colonnes capillaires, paroi interne de la colonne qui sert de support
Chromatographie en phase supercritique		
gaz supercritique/solide	interactions analyte / éluant	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide
gaz supercritique/liquide	interactions analyte / éluant	Espèce organique liée chimiquement à une surface liquide

III.2. Méthodes spectrales

III.2. 1. Différents types des méthodes spectrales

III.2. 1.1. Spectrophotométrie de masse

III.2. 1.1.1. Définition

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification (Claude, 2011).

III.2. 1.1.2. Appareillages

Le spectromètre de masse est constitué d'une source, La source est l'élément du spectromètre de masse qui permet l'évaporation et l'ionisation des analytes contenus dans l'échantillon. Plusieurs méthodes d'ionisation sont disponibles et leur choix d'utilisation dépend des propriétés physicochimiques des molécules à étudier et des renseignements désirés (Claude, 2011 ; Patrice *et al*, 2011). Il existe plusieurs types de sources d'ionisation : Ionisation et fragmentation par impact électronique dont la source comprend un filament chauffé qui émet des électrons qui sont accélérés vers une anode.

Le faisceau d'électrons entre alors en collision avec les molécules sous forme gazeuse présentes dans la source et leur arrache un électron pour former l'ion moléculaire M^+ (Claude, 2011). Ionisation chimique positive dont la source d'ionisation chimique est souvent identique à celle utilisée en impact électronique (source combinée) mais le mécanisme d'ionisation est indirect (Claude, 2011).

Ionisation par électro-nébulisation (ESI) qui consiste à pulvériser une solution (une phase mobile), à ioniser les espèces qui y sont présentes et à en assurer l'évaporation, On applique une différence de potentiel de quelques milliers de volts entre le nébuliseur et une contre-électrode en mode positif par exemple, les ions chargés positivement ou négativement présents dans l'électrolyte vont migrer et se séparer à l'extrémité du capillaire(Fig 20) (Claude, 2011).

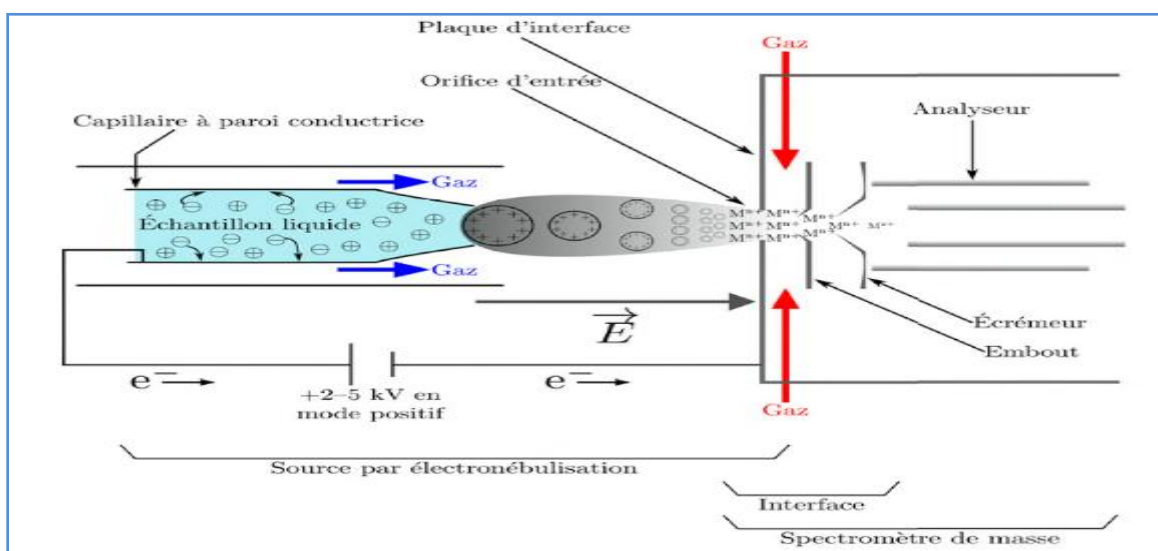


Figure 20 : Principe d'ionisation d'ESI (Rusconi, 2011).

III.2. 1.1.3. Analyseurs de masse

L'analyseur de masse correspond à la partie du spectromètre de masse qui sépare les ions formés dans la source en fonction de leur rapport m/z . Il ya plusieurs types d'analyseurs dont on trouve :

a) l'analyseur utilisant un champ électrique oscillant, le fonctionnement de ce type d'analyseurs (filtre quadripolaire, piège à ions) est fondé sur le d'ions dans un champ électrique oscillant. Placé entre deux électrodes, celui-ci se déplace et est accéléré vers électrode de signe opposé. Si la polarité de l'électrode est inversée, l'ion se trouvera être accéléré dans l'autre direction (Claude M ,2011)

b) Filtre quadripolaire qui est basé sur l'utilisation de filtres quadripolaires pour trier les ions (Fig2 1) (Rouessac, 2004 ; Claude, 2011).

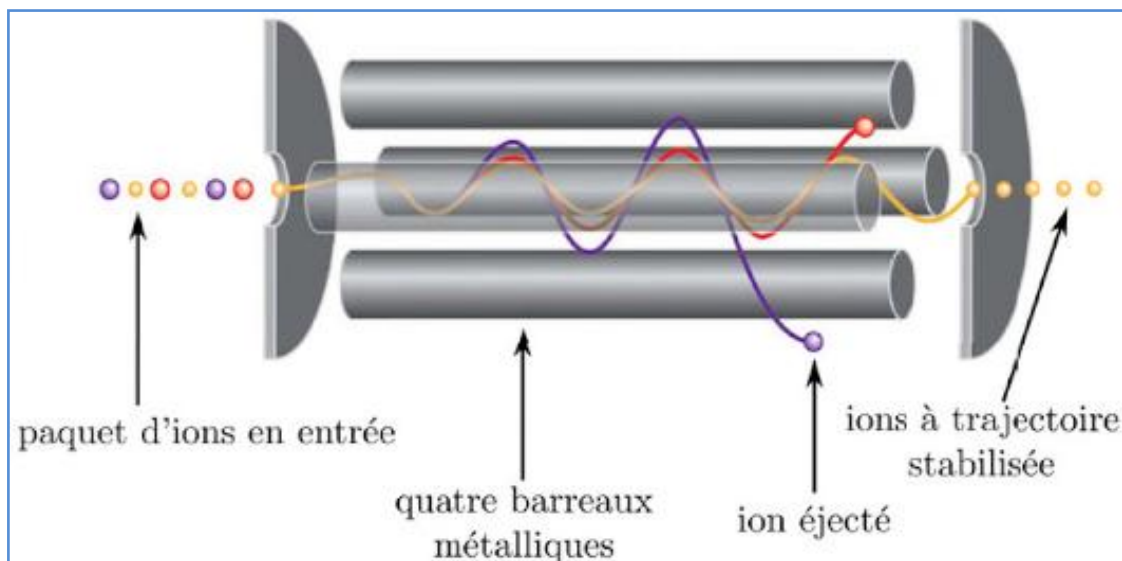


Figure 21: Analyseur quadripôle (Rusconi, 2011).

c) piège à ions, sont générés par des électrodes dont la géométrie et la disposition dans l'espace diffèrent d'un analyseur à l'autre (Fig 22)(Claude, 2011).

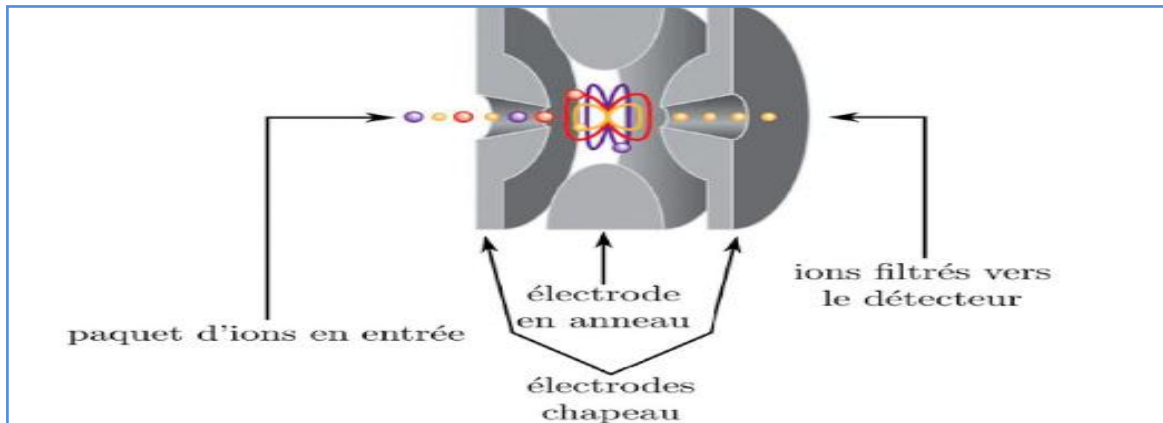


Figure 22 : Analyseur piège à ions (Rusconi, 2011).

d) Analyseurs utilisant un champ électrique constant Analyseurs à temps de vol (« time of flight » TOF), le principe se repose sur la relation entre la masse et la vitesse des ions. L'instrument mesure le temps nécessaire aux ions, (Rouessac , 2004). Généralement un TOF est associé a une source MALDI (Fig 23) (Claude, 2011)

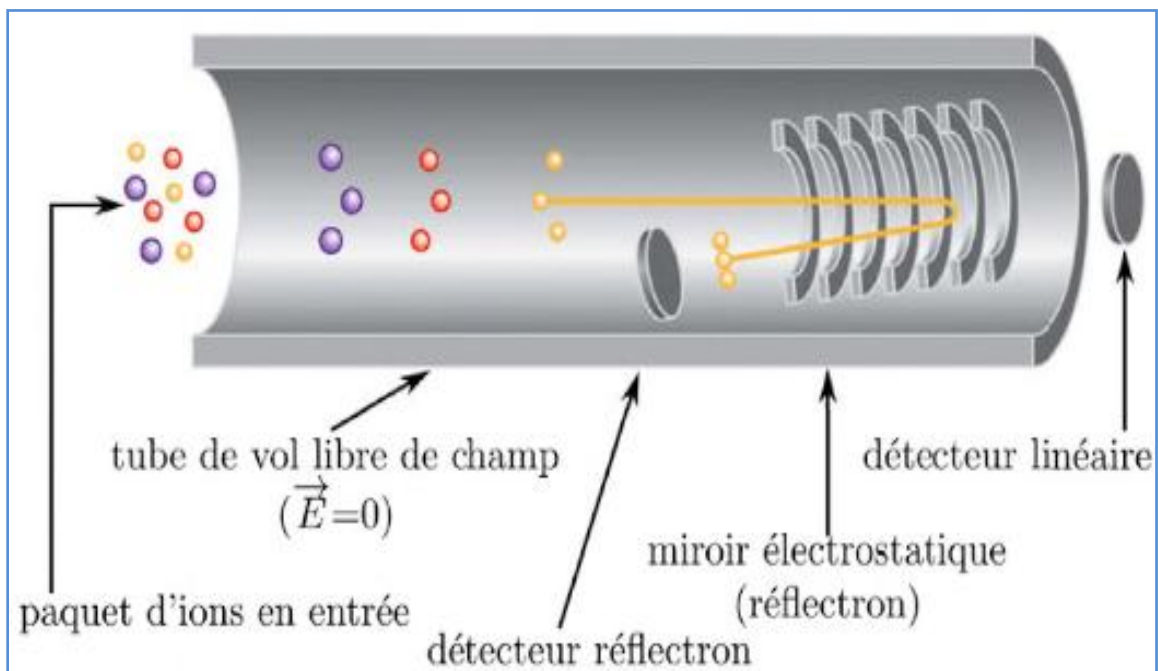


Figure 23: Analyseurs à temps de vol (Rusconi ,2011).

III.2. 1.2. Résonance magnétique nucléaire

Résonance magnétique nucléaire est très vite devenue une méthode spectroscopique polyvalente irremplaçable dans divers secteurs de la chimie. La meilleure méthode pour

obtenir des renseignements structuraux sur les composés moléculaires. Utilisée en complément des méthodes de spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, La RMN a longtemps été considérée comme trop peu sensible pour être adaptée aux analyses environnementales. Cette situation est en voie de changer comme en témoigne l'existence de techniques couplées de chromatographie liquide ou d'électrophorèse avec la RMN. (Rouessac, 2004)

III.2. 1.2.1.Principe :

La RMN permet l'étude des composés en solution ou à l'état solide. Elle sert aussi bien en analyse quantitative qu'en analyse structurale, mais c'est surtout dans ce dernier domaine qu'elle fait preuve de toute sa puissance. Elle permet de préciser la formule développée, la stéréochimie et dans certains cas la conformation du composé étudié. Elle est devenue, pour ces raisons, une des techniques majeures d'étude aussi bien des structures moléculaires que des cristaux, dont on ne saurait se passer (Rouessac, 2004).

III.2. 1.2.2.Appareillage :

La résonance magnétique nucléaire RMN n'est pas une méthode très sensible, RMN est placé dans un champ magnétique B_0 , les noyaux des atomes dont le nombre quantique de spin(I) est différent de zéro, ne peuvent prendre qu'un nombre limité d'orientation exactement $2I+1$, chaque orientation correspond à une énergie précise, on montre que la différence d'énergie entre deux niveaux successif est : (Lynch, 2001).

$$\Delta E = \frac{h}{2\pi} \gamma B_0$$

III.2. 1.3. Spectrométrie infrarouge

Les techniques spectrométriques les mieux adaptées pour étudier l'eau et les principaux constituants des inclusions fluides sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la Spectrométrie infrarouge (Calas, 1976). La partie fondamentale d'un spectromètre est généralement un dispositif, donnant, pour une longueur d'onde, et une certaine valeur d'un paramètre i , une image réelle (i, λ) d'un objet fixe Q éclairé par la source S dont on cherche B (la luminance $b(\lambda)$) (Fig. 24) (CADOT J, 1970).

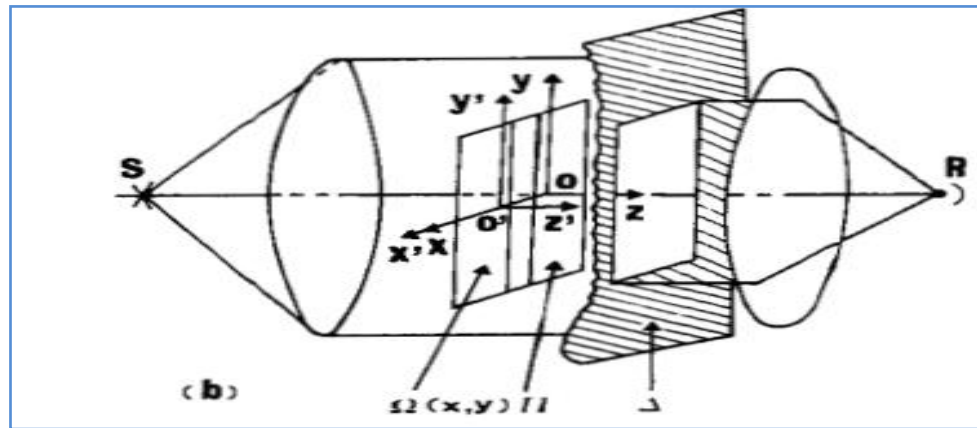


Figure 24 : Modèle simplifié de Spectrométrie infrarouge (CADOT, 1970).

III.2. 1.3.1.Principe

La spectrométrie infrarouge permet de détecter rapidement la présence des principaux constituants des inclusions fluides : eau, gaz carbonique et matières organique, ainsi que d'en estimer les proportions relatives, elle permet d'autre part d'évaluer l'importance volumétrique de ces inclusions dans le minéral. Les limites de la méthode sont nombreuses, liées principalement à l'absorption intrinsèque de la grande majorité des minéraux, dont le spectre d'absorption peut masquer une grande partie de celui des inclusions (Calas, 1976).

III.2. 1.3.2.Appareillage

Appareillage de Spectrométrie infrarouge a été réalisées a la température ambiante, les cristaux étant placés sous forme de sections épaisses dans le faisceau, il ya deux appareils (Perkin Elmer 2I et puis d'un Beckman IR9) mesurant la transmission, la diffusion de la lumière par les inclusions et les imperfections cristallines (dislocations, cassures). il a souvent été nécessaire de compenser le faisceau référence de l'appareil afin de d'éviter l'absorption due a l'humidité et au gaz carbonique atmosphérique, il a été nécessaire de purger l'appareil avec un courant d'azote desséché (Calas, 1976).

Matériel et Méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Préparation du matériel végétal

II.1.1. Récolte

Les feuilles et l'écorce de *F. angustifolia* ont été récoltées au mois de juin et octobre de l'année 2017 respectivement, dans un milieu isolé et loin de toute pollution, situé dans la forêt d'Azru n Bechar, commune d'Amizour, localisée au Sud-est de la ville de Bejaia. Les échantillons de feuilles et d'écorce ont été nettoyés puis séchés à une température ambiante dans un endroit aéré et ombragé afin d'assurer une meilleure conservation des différents composés.

II.1.2. Broyage et tamisage

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

II.2. Extraction

Le protocole d'extraction utilisé dans cette étude est celui décrit par **Chiang et al, (1994)** avec quelques modifications.

II.2.1. Procédure

La poudre d'écorce de *Fraxinus angustifolia* a été macéré dans de l'éthanol pure avec un rapport de (1g / 4ml) sous agitation et à l'ombre dans des ballons scellés convenablement pendant 24 heures. Le mélange est ensuite transféré dans des éprouvettes à décantation pendant 24 heures. Le surnageant a été récupéré, puis séché sous la hôte à température ambiante jusqu'à stabilisation du poids.

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

$$(\%) = [(P1 - P0)/E] 100$$

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

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

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

II.3. Screening chimique

II.3.1. Dosage des phénols totaux

II.3.1.1. Principe

Le réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribéreau-Gayon, 1968**). La coloration produite, dont

l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

II.3.1.2. Procédure expérimentale

Le dosage des phénols totaux a été réalisé selon le protocole de **Kahkonen et al., 1999**). Les phénols totaux des deux extraits éthanolique (feuilles et écorces) ont été quantifiés, selon la procédure décrite dans la figure suivante :

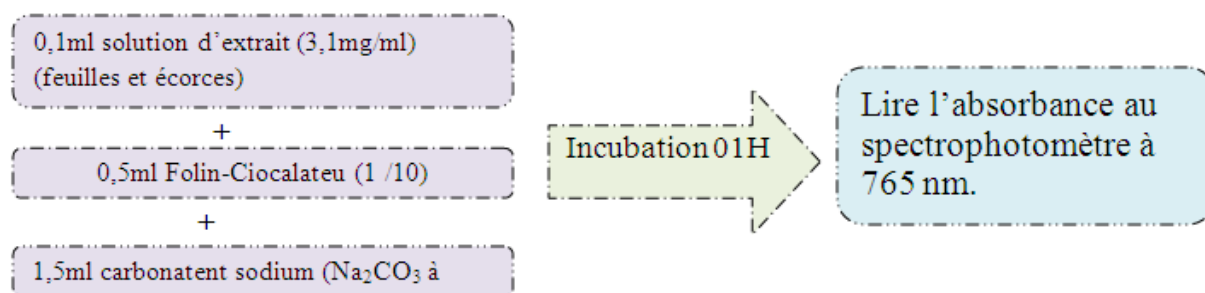


Figure25: Procédure expérimentale de dosage des phénols totaux dans les extraits éthanoliques de feuilles et d'écorces de *F. angustifolia* (**Kahkonen et al., 1999**).

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, la courbe d'étalonnage (**Annexe01**) a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (**mg Eq.GA./g d'extrait**).

II.3.2. Dosage des flavonoïdes

II.3.2.1. Principe

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par colorimétrie selon le protocole de **Maksimovic et al.,(2005)**, le principe est 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.

II.3.2.2. Procédure expérimentale

La teneur en flavonoïdes des deux extraits éthanolique a été quantifiée comme illustré dans la **figure 26**

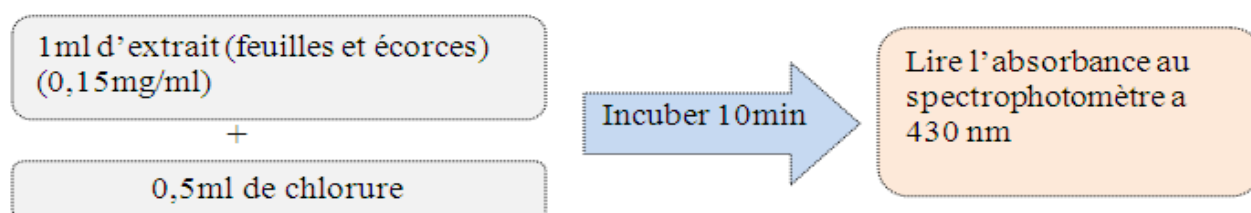


Figure 26: Procédure expérimentale de dosage des flavonoïdes dans les extraits éthanoliques de feuilles et écorces de *F. angustifolia* (**Maksimovic et al. 2005**).

La concentration des flavonoïdes dans les deux extraits a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage (**Annexe 02**) établie dans les mêmes démarches expérimentales par différentes concentrations de la rutine. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent rutine par gramme d'extrait sec (**mg Eq.Rut./g d'extrait**).

II.3.3. Dosage des tanins

II.3.3.1. Principe

Le dosage des tanins a été réalisé selon le protocole de **Hagerman et Butler, (1978)**. Le principe de cette méthode consiste à faire précipiter Sérum Albumine Bovin (BSA) par les tanins présents dans l'extrait. La teneur du précipité en complexe tanins-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.

II.3.3.1. Procédure expérimentale

Le taux des tanins présents dans les deux extraits éthanolique de feuilles et écorces de *F. angustifolia* a été quantifié par la procédure décrite dans la **figure 27** ci-dessous :

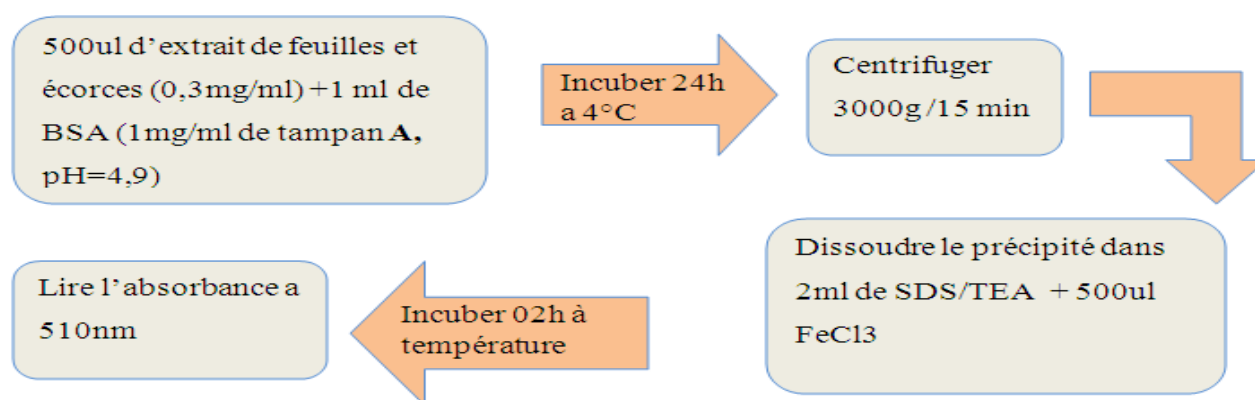


Figure 27: Procédure expérimentale de dosage des tanins dans les extraits éthanoliques de feuilles et d'écorces de *F. angustifolia* (**Hagerman et Butler, 1978**).

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.4. Evaluation de l'activité anti-radicalaire

II.4.1. Test de DPPH

II.4.1.1. Principe

Pour étudier l'activité anti-radicalaire, nous avons opté pour la méthode décrite par **Sanchez–Moreno, (2006)**. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) est un radical stable de couleur violette absorbe à 517 nm. Le principe se base sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH•, en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH) aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPHH (**Fig.28**). Cette réduction est suivie par la mesure de la diminution de son absorbance à 515 nm en présence d'un antioxydant.

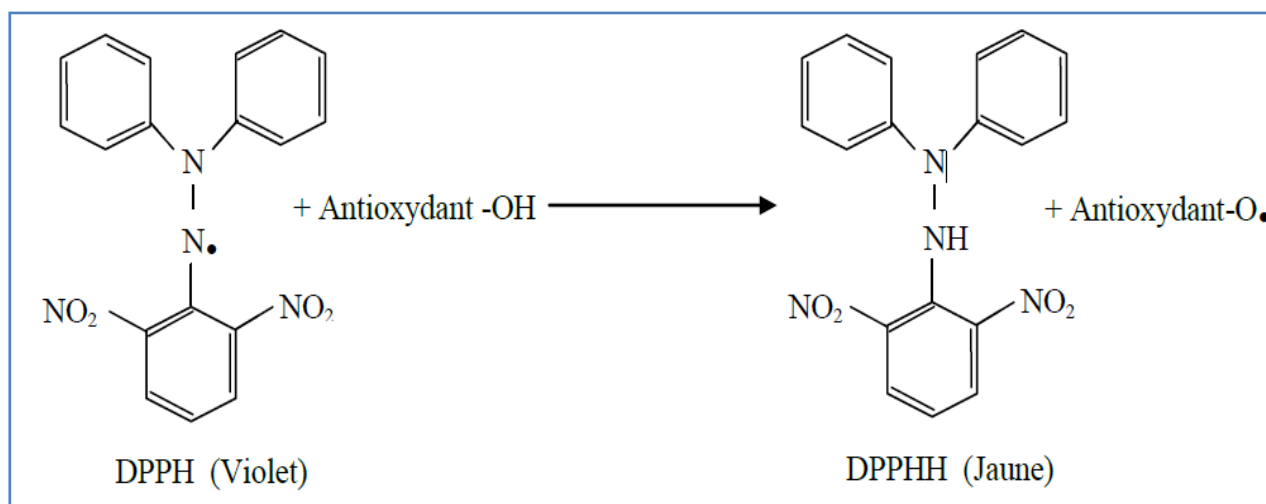


Figure28: Réaction de réduction du DPPH (Talbi et al., 2015)

II.4.1.2.Procédure expérimentale

1900 μ l de la solution du DPPH (0,04 g/ml) ont été ajoutés à 100 μ l de chaque extrait à différentes concentrations (0,06 ; 0,12 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,7 mg/ml), contre un blanc. La lecture est faite à 517nm, à chaque 5 minutes pendant 30 minutes, l'acide ascorbique a été utilisé comme standard à différentes concentrations : 0,06, 0,12, 0,25, 0,5, 0,7mg/ml. Les IC_{50} ainsi que le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit : $I(\%) = [A1-A2/A2] \times 100$

A1 : absorbance sans extrait.

A2 : absorbance avec de l'extrait

II.4.2. Test de l'ABTS

II.4.2.1. Principe

Le radical $ABTS^{\bullet+}$ (l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est stable sous sa forme libre. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical cation entraîne sa réduction et une diminution de l'absorbance (**Fig.29**). Cette diminution dépend de la quantité des antioxydants présents dans le milieu (**Mansour et al., 2011**).

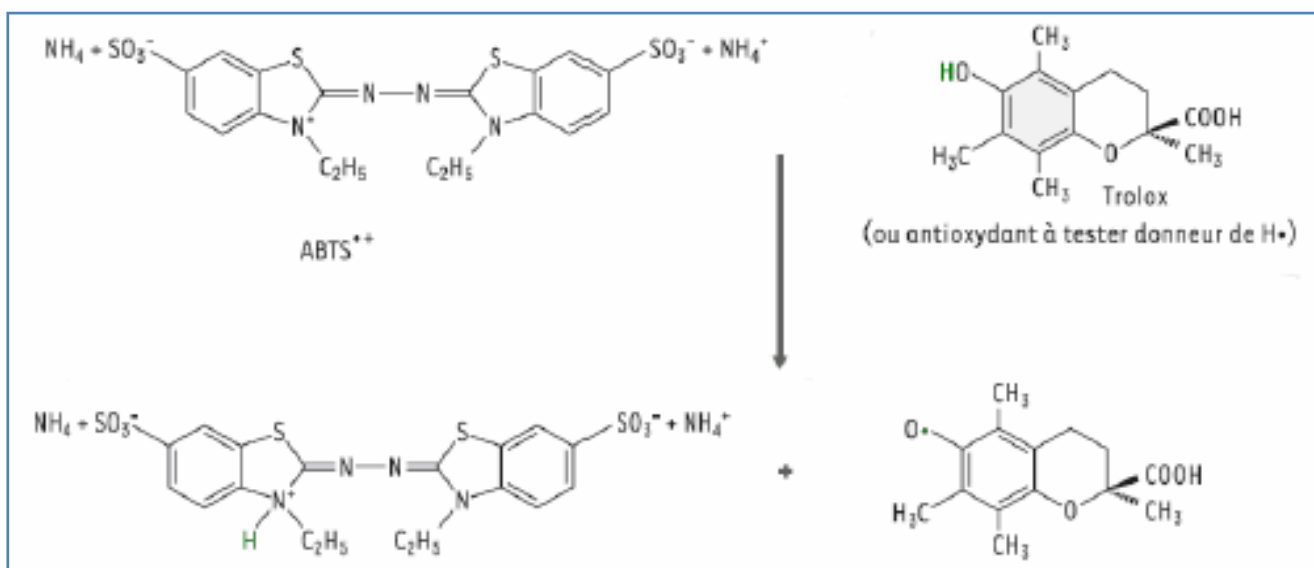


Figure29: Réaction de réduction d'ABTS (**MARC et al., 2004**).

II.4.2.1. Procédure expérimentale

Le cation $ABTS^{\bullet+}$ est généré en mélangeant 7 mM de sel ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium dans 25 ml d'eau distillée suivi d'une incubation de 16h à température ambiante. La solution radicalaire $ABTS^{\bullet+}$ est diluée par l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,2$ à 734 nm.

10ul d'extrait de différentes concentrations ont été ajoutés à 1ml de la solution radicalaire $ABTS^{\bullet+}$. et les standrds (acides gallique, acide Tannique, acide caféiques, quercétine, catéchine). Le mélange est incubé à l'abri de la lumière. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 434 nm.

La capacité anti radicalaire et les IC_{50} ont été déterminées selon l'équation suivante :

II.5. Evaluation de l'activité antioxydante

II.5.1. Activité antioxydant contre le monoxyde d'azote.

II.5.1. Principe

Le radical monoxyde d'azote est généré dans les tissus biologiques par l'oxyde nitrique spécifique synthèses, qui métabolise l'arginine en citrulline formation de NO via une réaction d'oxydation à cinq électrons (Marletta, 1989; Moncada et al., 1989; David, 1999; Virginia et al., 2003; Ghafourifar et Cadenas., 2005). L'activité de piégeage de l'oxyde nitrique peut être mesurée par la réaction de GRIESS décrite par Green et al., (1982) in Nuralam et al., 2013).

II.5.2. Procédure expérimentale

L'activité contre le monoxyde d'azote est étudiée selon la méthode décrite par Niki et al, (2005). Le mélange réactionnel contient 4 ml de nitropruside de sodium (10 mM), 1 ml d'une solution saline du tampon phosphate (10 mM à pH 7,4) et 1 ml de l'extrait, le mélange a été incubé pendant 2 h à 25°C. Après l'incubation 0,5 ml de réactif de griess a été ajoutée à 0,5 ml de mélange réactionnel, le mélange a été incubé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 535 nm contre un blanc (Nuralam et al., 2013). Les IC₅₀ et le pourcentage d'inhibition de l'extrait des feuilles et de l'écorces comparée à l'acide ascorbique est calculé par la formule suivante:

$$I(\%) = [A1 - A2 / A2] \times 100$$

A1 : absorbance sans extrait.

A2 : absorbance avec de l'extrait

II.5.2. Activité antioxydant contre le radical superoxyde

II.5.2.1. Principe

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capter un radical libre, l'anion superoxyde O₂⁻. Ce radical est généré in vitro par le système hypoxanthine/xanthine oxydase. Dans cette méthode, le radical réduit le NBT₂₊ (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm. Ainsi un composé antioxydant capable de capter l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de la réduction du NBT₂₊ par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé antioxydant. On peut ensuite tracer une courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de composé testé, et déterminer la CI₅₀ (concentration inhibant 50% de l'activité) du composé (Parejo et al., 2002).

II.5.2.2. Procédure expérimentale

Un mélange de tampon phosphate 50 mM (pH 7,5) contenant de l'EDTA (Ethylene diamine tetra acetic) (0,05 mM), hypo xanthine (0,2 mM), 63 uL NBT (Nitro-Blue Tétrazolium) (1mM), 63 uL de l'extrait éthanolique, et 63 uL xanthine oxydase (1,2U/ μ L). La xanthine oxydase a été ajoutée en dernier. Le taux de réduction du NBT a été déterminé après la lecture de l'absorbance à 560 nm (Parejo et al., 2002).

II.6. Caractérisation des extraits des feuilles et d'écorce

II.6.1. Analyses chromatographiques

II.6.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).

II.6.1.1.1. Principe

La chromatographie sur couche mince est une technique analytique simple utilisée dans le but de séparer différents constituants d'un mélange complexe en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage. Des plaques du gel de silice (60 GF254) ont été utilisées pour analyser l'extrait éthanolique des feuilles et d'écorces de *Fraxinus angustifolia* à une concentration de 25mg/ml (Fig.30).

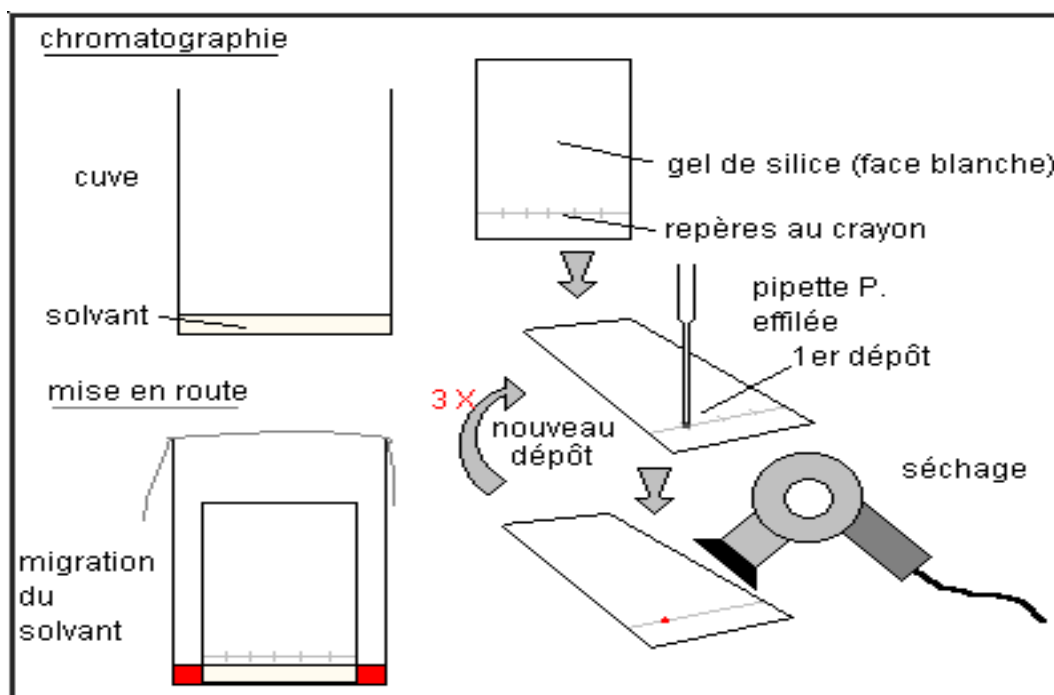


Figure 30 : préparation des plaques de CCM.

II.6.1.1.2. Procédure expérimentale

Les deux échantillons et les dix standards : acide gallique, a. tanique, a. caféique, quercétine, catéchine, Rutine, a. ascorbique, a. oléanolique, a. Cinnamique (25mg/ml), ont été déposés sur les plaques de silicagel, les plaques ont été introduites par la suite dans la chambre de migration

préalablement saturée par la phase mobile. Après développement, les plaques ont été séchées à l'aide d'un sèche-cheveux et observées à la lampe UV à 254 et 366 nm. Les rapports frontaux ont été calculés et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants des deux extraits.

$$R_f = d / D$$

d : Distance parcourue par la substance ;

D : Distance parcourue par le solvant

II.6.1.2. Chromatographie Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

II.6.1.2.1. Principe

La Chromatographie en phase gazeuse est une Chromatographie "gaz-liquide" (Coskun, 2016). L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire. (Rouessac, 2004).

II.6.1.2.2. Procédure expérimentale

Les analyses GC/MS ont été effectuées sur un appareil CGMS Shimadzu QP2010 de type EI 70eV quadripôle muni d'un détecteur masse couplé du type thermo trace GC 2000, équipé d'une colonne de colonne OVI 70I (25m) (5 % méthylphénylpolysiloxane), de (30 m x 0.25 mm i.d. épaisseur de film 0.25 µm). la température de four étant programmées de 40°C (3 min), puis à une vitesse de 3°C lorsque la température atteint 250°C. Les paramètres MS étant : - Température de trappe d'ions : 200°C - Rapport split : 1 :10 - Potentiel d'ionisation : 70 eV - Bande de scans : 40-400 u - Temps de scan : 5s - Résolution : 1000

Les composants des extraits de feuilles et de l'écorce ont été identifiés.

II.7. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart-type (SD). Les données expérimentales ont été analysées à l'aide de Graph Pad Prism 5.3 Software. L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée. La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

$p > 0,05$ = la différence n'est pas significative ns ;

$0,05 > p > 0,01$ = différence significative* ;

$0,05 > p > 0,001$ = différence hautement significative**;

$p < 0,001$ = différence très hautement significative***.

Résultats et discussion

III.1. Taux d'extraction

Les taux d'extraction à partir des feuilles et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été calculés par rapport à la poudre initiale pour les extraits éthanoliques. Les résultats obtenus montrent des rendements de 9,82 % pour les feuilles et de 7,4 % pour l'écorce, et les taux d'humidité sont de 7% pour les feuilles et 5% pour l'écorce (**Tableau v**),

Les taux d'extraction des composés phénoliques dépendent de type du solvant, le rapport solide-liquide, la granulométrie de la poudre végétale, la température et le pH du milieu etc. (**Narzck et Shahidi, 2006**).

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

Tableau V :le pourcentages de rendements et humiditié du l'extraits Feuilles et écorces de *Fraxinus angustifolia*.

Extraits	Rendement%	Humidité%
Feuilles	9,82	9,33
Ecorces	7,4	7,45

D'après les résultats obtenus on remarque que le taux d'extraction des polyphenols de l'extrait éthanolique des feuilles est supérieur a celui de l'écorce, cela peut être expliquer par le faite que la nature des composés actifs existants dans les feuilles et l'écorce est différente, ou leur proportion pour les deux partie soit différente, il a été démontré par des travaux menées par Kukic et ses collaborateurs, (2006) que les polyphénols ne se distribuent pas d'une façon équitable dans les différentes parties de la plante

III.2. Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques des extraits éthanoliques de *Fraxinus angustifolia* à savoir les phénols totaux, les flavonoïdes et les tanins ont été estimés par des méthodes de dosages colorimétriques. La méthode de Folin-Ciocalteu est choisie pour la détermination du taux des polyphénols totaux des extraits de plantes selon le protocole de Djeridane et ses collaborateurs, (**2010**). Cette méthode a été choisie pour les raisons suivantes ; **(I)** c'est une

méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, (II) la disponibilité du réactif de Folin et la méthode qui est bien standardisée, (III) la longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, (IV) c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde La teneur en flavonoïde a été évaluée selon la méthode décrite par Maksimovic et al.,(2005), Tandis que la teneur en tannins a été évaluée selon le protocole de ... Hagerman et Butler, et ses collaborateurs, (1978)

Les résultats des différents dosages montrent que les teneurs en flavonoïdes et tannins de l'extrait des feuilles sont significativement ($P < 0,05$) plus élevée par rapport à celle enregistrées au niveau de l'écorce. Par contre les teneurs en polyphenols totaux sont plus élevées au niveau de l'extrait d'écorce que celui des feuilles (Tableau VI ; Fig 31.)

TableauVI : Lateneur des composée phénoliques de polyphénoles dans l'extraites Feuilles et écorces du *Fraxinus angustifolia*;

Extraits	Phénols totaux (mg Eq.AG. / mg E)	Flavonoïdes (mg Eq.Rut. / mg E)	Tanins (mgEq.AG. mgE)
Feuilles	24,45	37	22,19
Ecorces	27,34	11,77	19,75

mg Eq.AG./mg E : milligramme Equivalent Acide gallique par milligramme d'extrait, **mg Eq.Rut./ mg E** : milligramme Equivalent Rutine par milligramme d'extrait, **mg Eq.AT./ mg E** : milligramme Equivalent Acide Tannique par milligramme d'extrait. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel GraphPad Prism 5.3. Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Dunnett. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à * $P < 0,05$, hautement significatif à ** $P < 0,01$, et très hautement significatif à *** $P < 0,001$

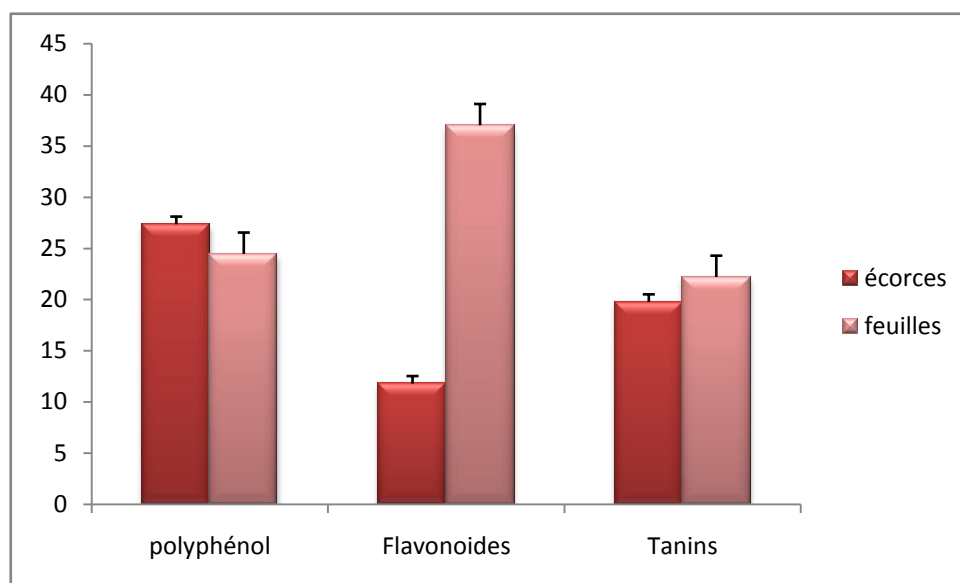


Figure 31: Teneurs en polyphénols totaux, Flavonoïdes et tannins des extraits des feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel GraphPad Prism 5.3. Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Dunnett. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à * $P < 0,05$, hautement significatif à ** $P < 0,01$, et très hautement significatif à *** $P < 0,001$

La teneur en phénols totaux obtenue pour les deux extraits présentent les valeurs suivantes (27,34 mg Eq. AG. /mg d'extrait ; 24,45 mg Eq. AG. /mg d'extrait) pour les feuilles et l'écorce respectivement. Les résultats de dosage des flavonoïdes dans les deux extraits feuilles et écorce de *Fraxinus angustifolia* présentent les teneurs suivantes (37 mg Eq Rut./mg d'extrait ; 11,77 mg Eq. Rut. /mg d'extrait) pour l'extrait des feuilles et d'écorce. les teneurs en tannins presentent les valeurs suivantes (22,19 mg Eq. AT./mg d'extrait ; 19,75 mg Eq. AT./mg d'extrait).

Des résultats semblables ont été obtenus dans des études antérieures (**Athmena et al., 2009**). Chez la même famille de la plante, un taux de polyphénols plus élevé ($95,56 \pm 1,50$ mg Eqcat/g extrait) a été retrouvé chez le genre *Fraxinus americana* (**Owen et Johns, 1999**).

le genre *Fraxinus* est connu pour être une source riche en flavones et flavonols qui sont des dérivés de quercétine et kaempferol (**Kostova et Iossifova, 2006**). Par contre, la différence entre les taux obtenus au niveau des feuilles et de l'écorce sont dus à la différences des fonctions physiologiques des parties de la plante (**Kähkönen et al., 1999**).

III.3. Evaluation de l'activité anti radicalaire

III.3.1. Evaluation de l'activité anti DPPH

Les résultats de l'activité anti-radicalaire exprimés en pourcentage (**Fig32**), révèlent que deux extraits testés ainsi que l'acide ascorbique sont des piègeurs de radical DPPH par excellence. L'extrait des feuilles présente le pourcentage le plus élevé (80%) à une concentration de 0,7 mg/ml, suivie par l'acide ascorbique (70%) et l'extrait d'écorce (65%). Les résultats de l'acide ascorbique et de l'extrait de l'écorce ne présente pas une différence significatif ($P < 0,05$). L'activité anti-radicalaire de l' L'extrait des feuilles présente des valeurs significativement plus élevées que l'extrait d'écorce.

Les antioxydants réduisent le diphényle picryl hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényle picryl hydrazyl, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants.

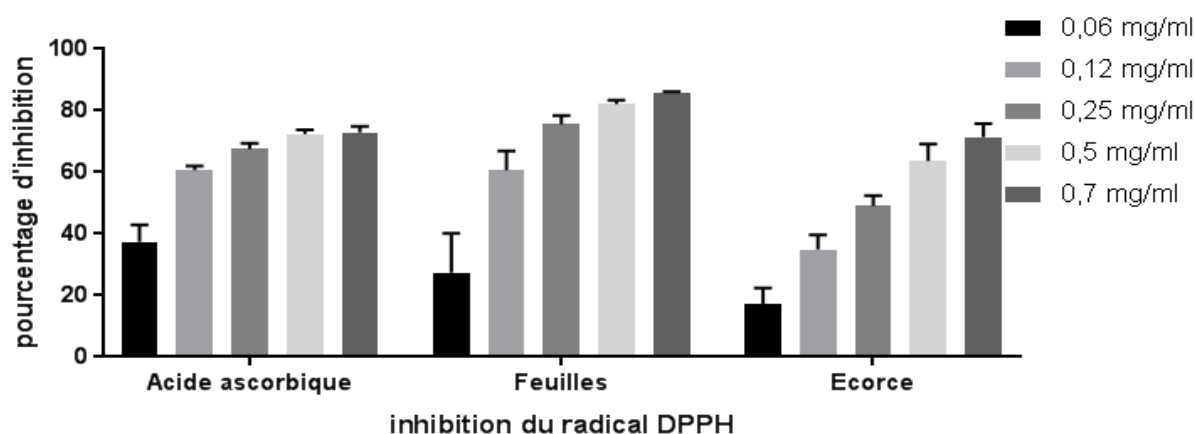


Figure 32: Activite anti-radicalaire des extraits du de feuilles ET l'écorce de *Fraxines angustifolia* et l'acide ascorbiques. Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 5.3. Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Dunnett. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à * $P < 0,05$, hautement significatif à ** $P < 0,01$, et très hautement significatif à *** $P < 0,001$

L'activité antioxydante des extraits pourrait être liée à la richesse de la plante en polyphénols (**Athamena et al., 2009**). Selon Turkmen et ses collaborateurs, (**2007**) les polyphénols semblent être des donateurs efficaces d'hydrogène d'où le pouvoir de piéger le radical DPPH. Il a été démontré que les Phénols sont des constituants très importants en

raison de leur capacité de piéger les radicaux libres en raison de leurs groupes hydroxyles (**Hatano et al., 1989**).

Il est bien connu que les radicaux libres sont à l'origine de plusieurs maladies comme les troubles neuro-dégénératifs, cardio-vasculaires et auto-immuns (**Sen et Samanta ,2015**). Des études antérieures ont montré que les extraits éthanoliques de l'écorce de *F. angustifolia* sont riches en composés phénoliques capables de capter les radicaux libres néfastes pour l'organisme, tels que, le superoxyde (O_2^-) responsable de la peroxydation lipidique (**Athmani et al., 2009**). L'existence d'une corrélation positive entre l'activité antioxydant et la teneur en polyphénols confirme le rôle majeur de ses composés dans la réduction des radicaux libres.

Tableau VII : les pourcentages de rendements et humidité du l'extraits Feuilles et écorces de *Fraxinus angustifolia*.

30 min					
mg/ml	0,7	0,5	0,25	0,12	0,06
Acide ascorbique µg/ml	77,85	68,43	52,56	43,65	37,41
Ecorces µg/ml	71,43	58,42	41,08	29,84	23,28
Feuilles µg/ml	85,68	72,12	55,52	47,68	42,41

Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 5.3. Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Dunnett. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à * $P < 0,05$, hautement significatif à ** $P < 0,01$, et très hautement significatif à *** $P < 0,001$.

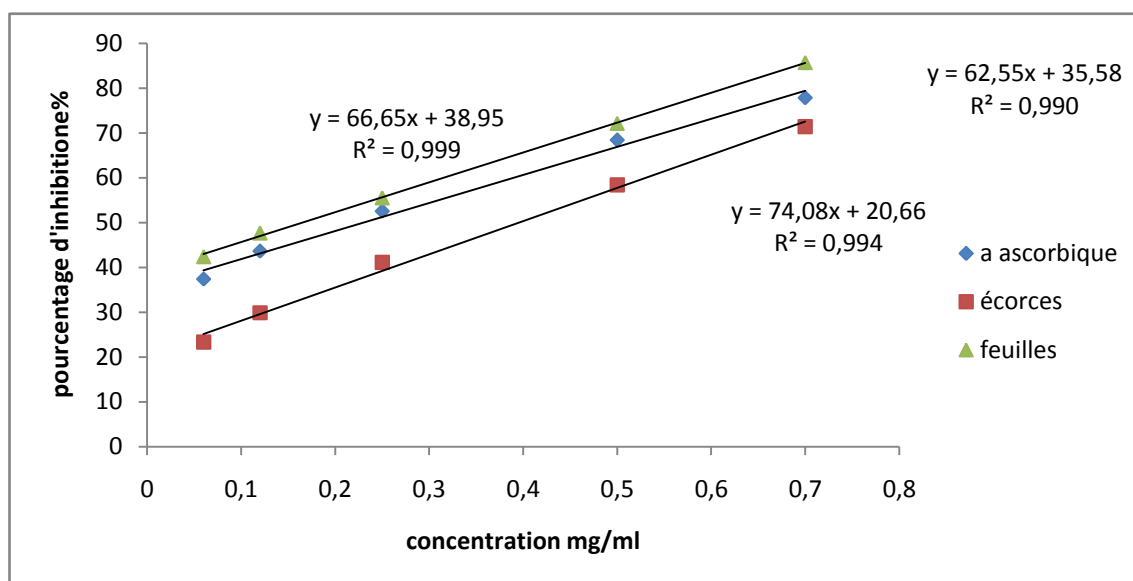


Figure 33 : Pourcentages d'inhibition de radicaux DPPH en fonction des concentrations

III.3.2. Effet scavenger contre le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote ($\text{NO}\bullet$) est un radical très réactif et un effecteur biologique important. Beaucoup de cellules produisent ce radical à partir d'arginine et d'oxygène dans une réaction catalysée par la NO-synthase. Selon les conditions de l'environnement, ce radical peut générer d'autres espèces radicalaires : à titre d'exemple, le $\text{NO}\bullet$, à forte concentration, devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec le radical superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$) pour former un puissant oxydant, le peroxydinitrite (ONOO^-) (Dröge, 2002). De ce fait, la capacité du piégeage de ces radicaux par les différents extraits de *F. angustifolia* a été testée

D'après les résultats présentés dans le tableau (VIII), on remarque que les extraits de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia* ont exhibé de puissants effets scavenger contre le $\text{NO}\bullet$. On comparant les deux extraits, on remarque que, l'extrait des feuilles a montré l'activité scavenging la plus élevée ($\text{CI}_{50} = 0,25$), par rapport à celui de l'écorce ($\text{CI}_{50} = 0,01$). Il reste que la quercétine exhibe le meilleur effet suivie de l'acide cafeique puis de l'extrait des feuilles puis l'acide gallique et l'extrait de l'écorce et finalement l'acide tannique.

Une étude menée par Nagmoti et ses collaborateurs, (2012), il a été démontré que les extraits méthanolique et aqueux de graines de *Pithecellobium dulce* (1000 $\mu\text{g/ml}$) ont exhibé un effet scavenger contre le monoxyde d'azote avec des pourcentages d'inhibitions de 52,97 et 49,89%, respectivement, qui sont loin d'être comparables aux pourcentages montrés par le présent travail

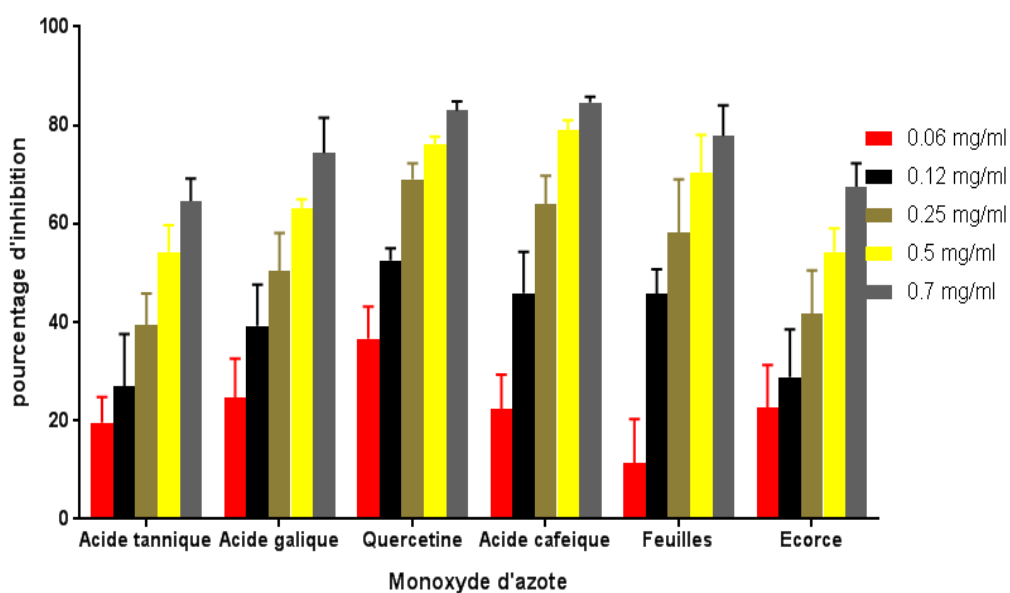


Figure 34: Pourcentage d’inhibition de monoxydes d’azote par des extraits feuilles et d’écorce de *Fraxinus angustifolia* et de la acides tannique ,acide gallique,quercetine et acide cafeique .Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type pour des tests in vitro .

III.3.3. Effet scavenger de radical superoxyde

La capacité des deux extraits des feuilles et d’écorce de *Fraxinus angustifolia* a différentes concentrations de piéger le radical superoxyde a été déterminé selon la procédure développée par **Robak et Gryglewski, (1998)**. Les résultats ont montré que tous les concentrations des extraits de plante et de l’acides ascorbique exhibent un effet scavenger contre le radical superoxyde de manière dose-dépendante (**Fig 36**). En effet, l’extrait des feuilles montre un meilleur effet avec un pourcentage (%) et IC50 de $0,106 \pm 0,003$ mg/mL) suivie de celui de l’écorce (% et IC50 de 0.09 ± 0.012 mg/mL) puis de l’acide ascorbique (% et IC50 de $0,59 \pm 0.026$).

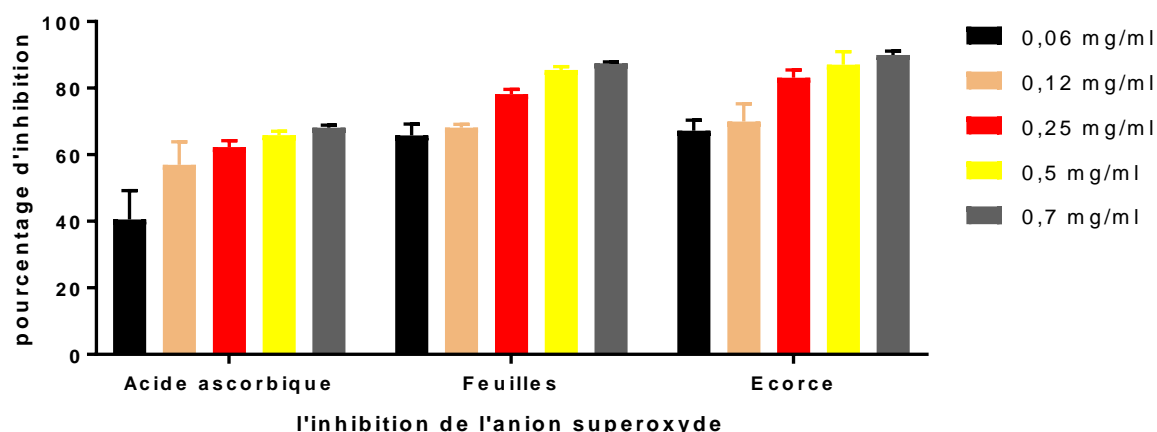


Figure 35: Pourcentage d'inhibition d'anions superoxyde désmutases par des extraits feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia* et de la vitamine C. Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-type pour des tests in vitro. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel GraphPad Prism 5.3. Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Dunnett. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à * $P < 0,05$, hautement significatif à ** $P < 0,01$, et très hautement significatif à *** $P < 0,001$. Ce puissant effet inhibiteur peut être attribué à la présence des polyphénols, flavonoïdes et des tanins dans l'extrait (Abdullahi et al., 2012). Donc, l'effet inhibiteur élevé de l'extrait par rapport à celui de la molécule de référence est dû à leur richesse en composés phénoliques.

Cos et ses collaborateurs, (1998) ont déterminé la relation entre la structure chimique des polyphénols flavonoïdes et tanins et leurs activités inhibitrices de la XO.

Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques sont directement liées à leurs structures. La présence des groupements hydroxyles et des doubles liaisons carbone-carbone dans certaines positions améliore leur effet scavenger (Dugas et al., 2000; Balan et al., 2014). Des études ont montrés que si les valeurs de IC₅₀ pour l'effet scavenger de O₂^{•-} sont inférieures à celles d'acide ascorbiques, cela indique que les extraits ont un effet inhibiteur de l'activité de la XO supplémentaire sur le radical O₂^{•-} (Valentao et al., 2002).

III.3.4. Effet scavenger de radical ABTS

Ce test est basé sur le mécanisme d'oxydoréduction de l'ABTS; l'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine) en présence de H₂O₂ ou d'un oxydant (dioxyde de manganèse ou persulfate de potassium). Le radical ABTS^{•+}, en contact avec un donneur de H[•], conduit à l'ABTS⁺ et à la décoloration de la solution (Gavin et al., 2004).

En analysant les résultats de la figure 19, on constate que l'extrait de feuilles a exhibé un puissant effet scavengers contre ce radical.

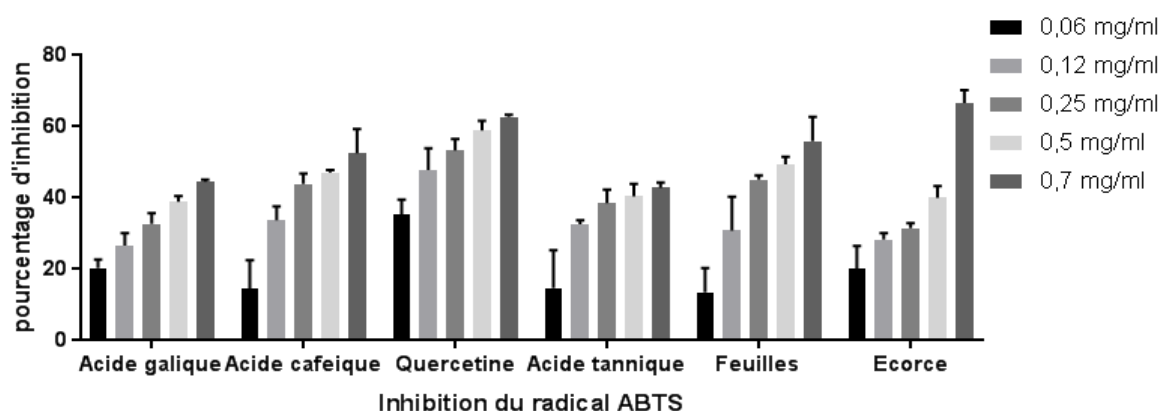


Figure 36: Activité antiradicalaire (ABTS) Les résultats ont été exprimés en moyennes \pm écart-. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le Logiciel Graph Pad Prism 5.3. Analyse de la variance (ANOVA) a été utilisé, suivi du test de Dunnett. Les resultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à * $P < 0,05$, hautement significatif à ** $P < 0,01$, et très hautement significatif à *** $P < 0,001$

Les résultats ne présentent aucune différence significative entre les molécules de références étudiées. L'activité antiradicalaire diffère considérablement entre les extraits des feuilles et celui de l'écorce, toutefois les feuilles possède une activité antiradicalaire plus importante 55,92% que l'écorce qui est de l'ordre de 40,05%.

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec les travaux décrits par Shukla et ses collaborateurs, (2012) qui, en utilisant le même protocole expérimental, ont rapporté que l'extrait aqueux de feuilles de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae), à 100 $\mu\text{g/ml}$, a montré un taux d'inhibition de ce radical de 64%, avec une CI_{50} de 100,86 $\mu\text{g/ml}$, loin d'être comparable à l'effet de l'acide ascorbique qui a présenté une valeur CI_{50} de 36,69 $\mu\text{g/ml}$.

Plusieurs études réalisées sur les propriétés biologiques des extraits de plantes ont rapportées l'implication des flavonoïdes dans la neutralisation des anions superoxydes (Benhamou et al., 2008 ; Kumar et al., 2010).

III.4. Analyse chromatographique

III.4.1. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui

progresses le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires. Les Résultats de l'analyse chromatographique (CCM) des dix standards et deux extraits feuilles, écorces de *Fraxinus angustifolia* à 366 et 255nm .

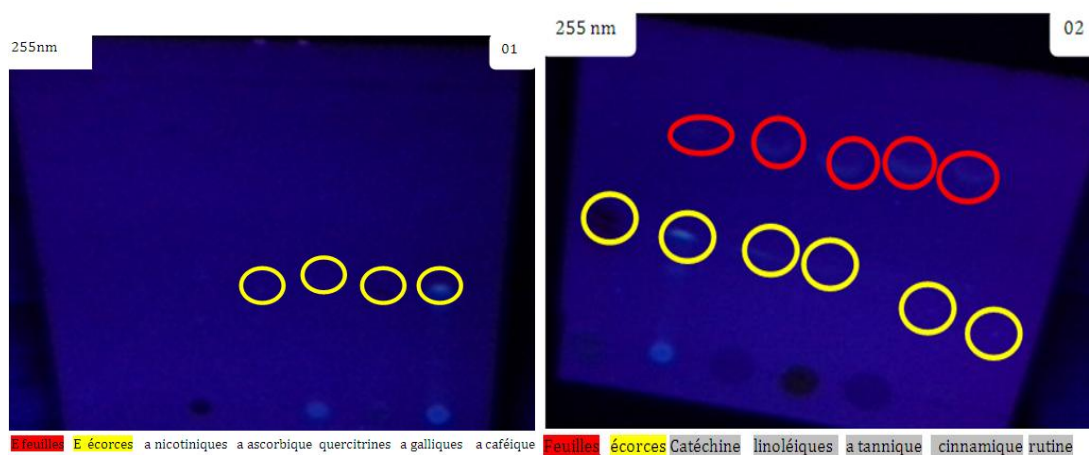


Figure 37 :A ,B Chromathogramme de *extraites feuilles et écorces de fraxonus angustifolia* comparée a Cinque standardantioxydants(A,B) sur CCM a long d'ondes de 255 nm.

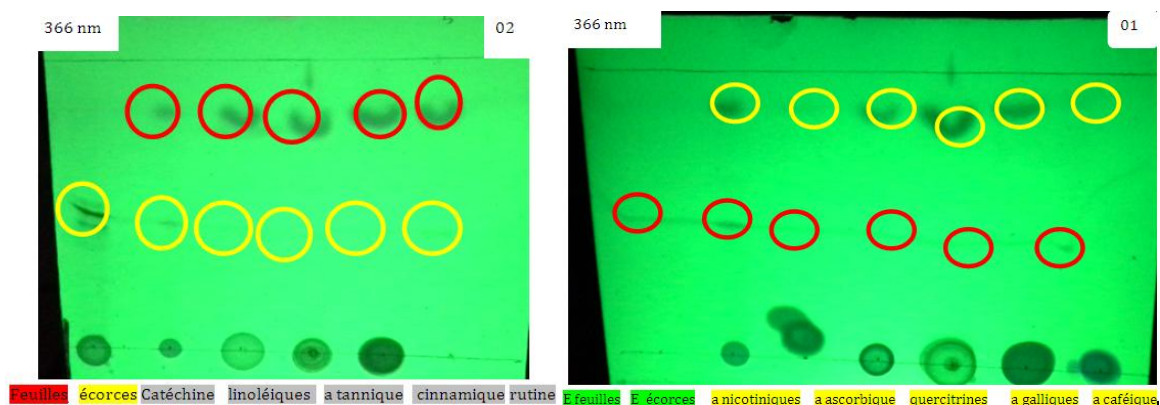


Figure 38 :A,B Chromathogramme de *extraites feuilles et écorces de Fraxinus angustifolia* comparée à Cinque standard antioxydants(A,B) sur CCM a la longueur d'ondes de 366nm.

Plusieurs travaux ont été réalisés sur les plantes médicinales dont la présente étude qui est consacrée à la recherche d'éventuels effets antioxydant des deux extraits feuilles et écorces de *Fraxinus angustifolia*. D'après ces résultats on constate a la longueur d'ondes 255 nm les fractions de l'extrait des feuilles et celui de l'écorce migrent au même niveau que la catechine

l'acide linoléique, l'acide cinnamique et la rutine, cela affirme la présence de ses composés dans l'extrait de feuilles et d'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

En plus de ses composés on remarque à la longueur d'onde de 366nm, la présence de l'acide cinnamique, l'acide nicotinique, acide ascorbique, acide gallique, et la quercétine dans l'extrait de feuilles, et l'acides nicotinique ,acides ascorbique ,quercetine acides gallique et acide caféique dans l'extrait de l'écorce, les composés cités ont été déjà identifiés dans les feuilles de *Fraxinus angustifolia* (Medjahed et al., 2016 ; Athmena et al., 2009)

III.4.2. CG-MS

L'analyse chimique des extraits *Fraxinus angustifolia* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée de spectrométrie de masse de marque Perkin Elmer 600 dans les conditions opératoires suivantes :

Une colonne Rtx-VMS (60m de long, 250µm de diamètre).

Le gaz vecteur est l'Hélium.

Un débit de 1ml/ min.

ne température de 70°C pendant 1 min, rampe de 3°C jusqu'à 160°C, pendant 1 min, rampe 2°C/min jusqu'à 230°C pendant 5 min.

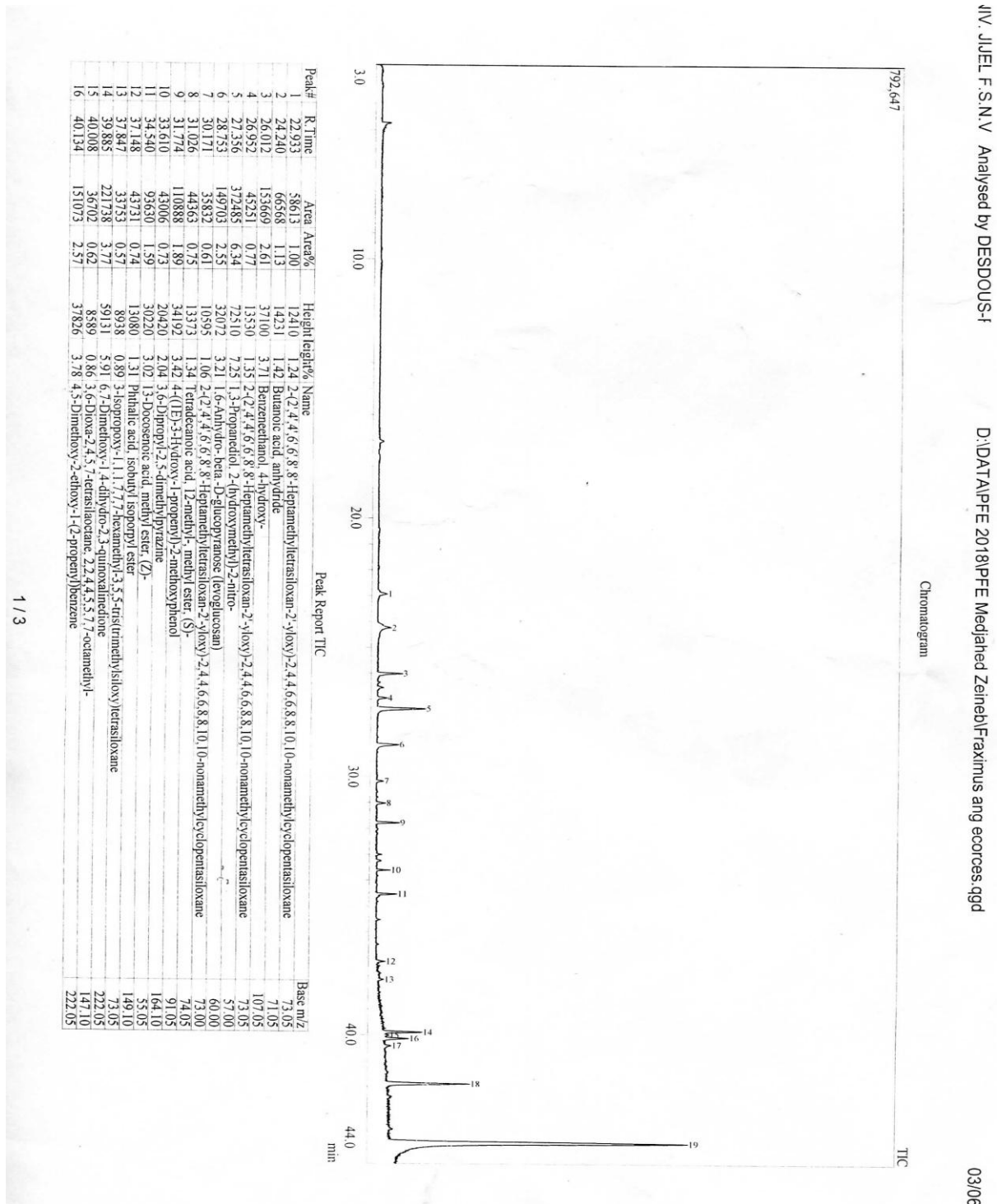
La température de l'injecteur est de 230°C.

0,2 µl de l'extrait à analyser injectée à l'aide d'une seringue spéciale.

III.4.3. Résultats CG-MS :

Nos résultats montrent également que les principaux composée bioactive présente dans *Fraxinus angustifolia* sont détectés dans l'extraits feuilles et écorces. Il est largement connu que la matrice alimentaire peut avoir un impact critique sur la biodisponibilité des polyphénols il est plausible que d'autres constituants présents dans l'extrait de *Fraxinus* tels que les polyphénols , Flavonoïdes et Tannins. Nous ne pouvons pas rejeter non plus que les autres constituants de l'extrait peuvent contribuer aux avantages métaboliques de *F angustifolia*. Ces questions nécessitent une étude plus approfondie et indiquent un éventuel effet prébiotique de l'extrait de *Fraxinus*.

Figure 39. (A,B,C) Chromatogramme CG-MS de l'extrait de Feuilles et écorces de Fraxinus angustifolia Vahl utilisé dans l'étude.



Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name	Base m/z
17	40.423	45082	0.77	9876	0.99	Fraximinol	271.20
18	41.890	527727	8.98	125024	12.50	Phenol, 4,4-(1-methylethylidene)bis-	213.10
19	44.199	3643877	62.00	446741	44.68	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester	149.05
		5877691	100.00	999858	100.00		

Condition and Method
 CGMS Shimadzu QP2010 de type EI 70ev quadropole
 colonne OV1701 (25m)
 Bibliothèque : Nist05
 gaz vecteur : He
 volume injecté: 1ul

==== Analytical Line 1 =====

[GC-2010]
 Column Oven Temp. : 80.0 °C
 Injection Temp. : 250.00 °C
 Injection Mode : Split
 Flow Control Mode : Linear Velocity
 Pressure : 34.9 kPa
 Total Flow : 18.0 mL/min
 Column Flow : 0.80 mL/min
 Linear Velocity : 36.1 cm/sec
 Purge Flow : 1.2 mL/min
 Split Ratio : 20:0
 High Pressure Injection : OFF
 Carrier Gas Saver : OFF
 Splitter Hold : OFF
 Oven Temp. Program :
 Kate :
 Temperature(°C) : 80.0 Hold Time(min) : 3.00
 : 120.0 : 5.00
 : 240.0 : 5.00

< Ready Check Heat Unit > : Yes
 Column Oven : Yes
 SPL1 : Yes
 MS : Yes
 < Ready Check Detector(FTD) > : Yes
 < Ready Check Baseline Drift > : Yes
 < Ready Check Injection Flow > : Yes
 SPL1 Carrier : Yes
 SPL1 Purge : Yes
 < Ready Check APC Flow > : No
 External Wait : No
 Equilbrium Time : 0:0 min

[GC Program]
 [GCMS-QP2010]
 IonSourceTemp : 200.00 °C
 InterfaceTemp : 250.00 °C
 Solvent Cut Time : 2.50 min
 Detector Gain Mode : Relative
 Detector Gain : 0.00 KV
 Threshold : 1000

[MS Table]

Resultants et discussion

JNIV. JIJEL F.S.N.V Analysed by DESDOUS-I

D:\DATA\PFEE 2018\PFEE Medjâhed Zeineb\Fraximus ang ecorces.qgd

03/06/21

Group : 1
Start Time : 2.50min
End Time : 45.00min
ACQ Mode : Scan
Interval : 0.508sec
Scan Speed : 666
Start m/z : 40.00
End m/z : 350.00
Sample Inlet Unit : GC
[MS Program] : GC
Use MS Program : OFF
[Similarity Search Parameters]
File1(Min.SI:0) : C:\GCMSsolution\Library\NIST05.LIB
File2(Min.SI:0) : C:\GCMSsolution\Library\NIST05.LIB
Search Depth : No PreSearch
Max Hit# : 25
Delete the same Compounds : OFF
Reverse Search : OFF
--- Post-search --- : OFF
Option (Match Case) : OFF

Tableau IX.A,B Composés identifiés dans l'extrait de *Fraxinus angustifolia* utilisé dans cette étude.

	Nom	Area %
1	2-(2',4',4',6',6',8',8'-Heptamethyltetrasiloxan-2'-yloxy)-2,4,4,6,6,8,8,10,10-nonamethylcyclopentasiloxane	58613
2	Butanoic acid,anhydride	66568
3	Benzeneethanol,4-hydroxy-	153669
4	2-(2',4',4',6',6',8',8'-Heptamethyltetrasiloxan-2'-yloxy)-2,4,4,6,6,8,8,10,10-nonamethylcyclopentasiloxane	45251
5	1,3-propanediol,2-(hydroxymethyl)-2-nitro-	372485
6	1,6-anhydro-beta-D-glucopyranose(levoglucosan)	149703
7	2-(2',4',4',6',6',8',8'-Heptamethyltetrasiloxan-2'-yloxy)-2,4,4,6,6,8,8,10,10-nonamethylcyclopentasiloxane	35832
8	Tetradecanoic acid,12-methyl-,methyl ester,(s)-	44363
9	4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	110888
10	3,6-Dipropyl-2,5-dimethylpyrazine	43006
11	13-Docosenoic acid,methyl ester,(Z)-	93630
12	Phtalic acid,isobutyl isoporoyl ester	43731
13	3-isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-tris(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	33753
14	6,7-Dimethoxy-1,4-dihydro-2,3-quinoxalinedione	221738
15	3,6-Dioxa-2,4,5,7-tetrasilaoctane,2,2,4,4,5,5,7,7-octamethyl-	36702
16	4,5-Dimethoxy-2-ethoxy-1-(2-propenyl)benzene	151073
17	Ferruginol	45082
18	Phenol,4,4'-(1-methylethylidene)bis-	527727
19	1,2-benzenedicarboxylic acid,mono(2-ethylhexyl)ester	3643877

Tableau IX.,B Composés identifiés dans l'extrait de *Fraxinus angustifolia* utilisé dans cette étude.

1	Trisiloxane,1,1,1,5,5,5-hexamethyl-3,3-bis[(trimethylsilyl)oxy]	112766
2	Butane,2-iodo-3-methyl-	82507
3	Benzeneethanol,4-hydroxy-	31012
4	3-isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-tris(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	32116
5	2-(2',4',4',6',6',8',8',heptamethyltetrasiloxan-2'-yloxy)-2,4,4,6,6,8,8,10-nonamethylcyclopentasiloxane	25778
6	Tridecanoic acid,methyl ester,(Z)-	67336
7	16-heptadecenal	82741
8	1,2-Benzenedicarboxylic acid,mono(2-ethylhexyl)ester	97407
		4292080

Conclusion et perspectives

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 antioxydants 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.

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

Dans le présent travail, l'effet pharmacologique de deux extraits de *F. angustifolia* a été mis en évidence par la réalisation d'une étude phytochimiques et l'évaluation de l'activité antioxydant, à différentes concentrations.

La quantification des composés phénoliques dans ces extraits de *fraxinus angustifolia* a révélé la présence de polyphénols (phénols totaux, tannins et flavonoïdes), sachant que des teneurs du tannins et flavonoïdes plus élevées ont été obtenues dans l'extrait éthanolique du feuilles par rapport à l'écorces, et de phénols totaux dans l'écorces, plus élevé que l'feuilles ,Les principales méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant des plantes médicinales ont été examinées et regroupées selon leurs principes.

Le test DPPH+ (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) est basé sure la mesure de la capacité de piégeage de radicaux à l'aide de radical stable DPPH. Le test ABTS (2,2-azinobis 3-ethyl-benzothiazoline 6-sulphonate) est basé sur neutralisation d'un radical cationique ABTS^{•+}. Le piégeage du radical superoxyde (O₂^{•-}) et l'anion superoxyde a est évalué la capacité du l'extraits à capter ces radical libre.et ces testes montrée que *f. angustifolia* a une bonne activité antioxydants, le pouvoir réducteur de la plantes et l'activité antiradicalaire de l'extrait de feuilles et écorces de *F.angustifolia*. révèlent que l'extraits Feuilles ont des fortes teneurs en Flavoides ,Tannis (37mg/ml; 22,19mg/ ml) que les écorces (11,17mg/ml; 19,75mg/ ml) respectivement et Les polyphénols totaux est montrant l'augmentation dans l'ecorces (27,34mg/ml) que feuilles (24,45mg/ml) , et un pouvoir réducteur les radiceaux libre effecaces a la doses élevé (0,7mg/ml).la doses dépendant IC50 de DPPH (0,10) a Feuilles et (0,08) a l'écorces,acides ascorbiques (0,2) et ABTS (0,12) Feuilles (0,26) écorces par apports a acide tannique,acides gallique ,quaféaique et quercetine que a une IC50 de (0,05 ; 0,02 ; 0,06 ; 0,2) respictivement .

Le IC50 de monoxides d'azotes feuilles (0, 16); (0, 18) écorces et cafeaique ,tannique, acdes gallique et quercetine (0,13 ; 0,13 ; 0,13 ; 0,18) respictivement. Activité antioxydant superoxyde d'anions donnée l'IC50 swivantes de Feuilles,écorces et l'acides ascorbique respictivement (0,1 ; 0,59 ; 0,09).

L'analyses de chromatographie sur couche mince montrée que fraxinus angustifolia possède presque tous les acides antioxydantes et sa donnée a la plante un fort pourcentage d'inhibition. par ailleurs l'analyses de chromatographic sur couches minces premetes la determination la richasses des antioxydantes dans cette

plantes , et la chromatographie de phases gesses(CPG) precesie la composition chimiques qui permetes l'inhibition des radicaux libres.

D'apprée cet recherché laboratoire ont montrée que *fraxinus angustifolia* est une plantes d'une très imporantes activité biologique a la peage des radiceux libres .conquences a le taux élvès des antioxydantes . Est tans que les antioxydants ont un rôle bénéfique pour la santé grâce à la protection contre les vieillissements, réduisent les risques de cancers et de maladies cardio-vasculaires.ils doits intése sur l'importances de *fraxinus angustifolia* a ces activité thérapeutique et aussi réalisees d'autres études comparables pour découvree d'autre activité couratifes en futures , poure donnée des médicament naturelles sans effets secondaires aux temps de augmentation et la diversité des maladie actuailes .

Références bibliographiques

A

- **Athamani, S., Chalghem, I., Kassah, L. A. , Laroui, S., Khebri,A. (2009)** .Activite Anti-Oxydante et Antimicrobienne D'extrait De Cuminum Cyminum L. *Lebanese Science Journal*, 11 :69-81.
- **Atoui , A. K ., Mansouri , A ., Boskou , G .,Kefalas, P. (2005)**. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89: 27-36.
- **Abdullahi ,A ., Hamzah ,R .U., Jigam, A .A., Yahya, A., Kabiru, A.Y., Muhammad, H., Sakpe, S.A ., defolalu, F .S ., Isah, M .C., Kolo, MZ .(2012)**. Inhibitory activity of xanthine oxidase by fractions *Crateva adansonii*. *Journal of Acute Disease*,12:126-129.
- **Aurousseau , B. (2002)**. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod*, 15 (1): 67-82.
- **Ali, S S .,Kasoju, N ., Luthra, A., Sing A., Sharanabasav, H ., Sahu, A ., Bora,U. (2008)**. Indian Medicinal Herbs as Sources of Antioxidants. *Food Res Int*, 41: 1–15.
- **Algeciras, S.A., Cook,W J ., Milz, T.C ., Saenger, A.K ., Karon, B.S. (2007)**.Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-Stick samples collected for determination of neonatal bilirubin, *Clinical Biochemistry*.40:1311 – 1316.
- **Afonso,V ., Champy,R .,Mitrovic, D .,Collin, P ., Lomri, A .(2007)**. Radicaux libre dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : role dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*,74:636 – 643.
- **Ames, B. N., Shigenaga, M .K., Hagen, T.M. (1993)**. Oxidants, antioxidants, and the Degenerative diseases of aging. 90: 7915 – 7922.
- **Ayouni. F., Chalal. KE., Chibout. M. (2017)**.Code Saturne: A Finite Volume Code for the computation of turbulent incompressible flows - Industrial Applications. <http://univ-bejaia.dz/dspace/123456789/4909>.

B

- **Baba, A. F. (1999)**. Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident. *Librairie Moderne. Roiba*, 91 : 1-294 .
- **Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006)**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières*. 12 :79-82 .

- **Burgot, J et Burgot, J.L.** (2006). Méthodes chromatographiques électrophorèses méthodes spectrales et méthodes thermique .3^{ème} édition .11.rue Lavoisier, Paris ,PP : 33-512.
- **Berregioua, A.** (2016). Investigation Phytochimique Sur Des Extraits Bioactifs De Deux Brassicaceae Médicinales Du Sud Algérien : Moricandia Arvensis et Zilla Macroptera.Université de Tlemcen.
- **Bourgou, S ., Ksouri, R .,Bellila, A .,Skandrani, I ., Falleh, H .,Marzouk, B.**(2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian Nigella sativa L. shoots and roots.C. R. *Biologies*, 331: 48–55.
- **Brand,W.W ., Cuvelier, M.E ., Berset. C.** (1995) .Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technology*, 28:25–30.
- **Balan,T ., Sani, M.H., Ahmad, S H.M .,Suppaiah, V ., Mohtarrudin, N ., Jamaludin, F .,Zakaria, Z.A .,** (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities contribute to the prophylactic effect of semi-purified fractions obtained from the crude methanol extract of Muntingia calabura leaves against gastric ulceration in rats. *Ethnopharmacology* , vol28: 1-15.
- **Baghiani, A ., Ameni, D ., Boumerfeg, S ., Adjadj M ., Djarmouni M ., Charef, N ., Khennouf, S ., Arrar, L.** (2012). Studies of Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of Root and Aerial Parts of Medicinal Plant Capparis Spinosa L. *American .Journal of Medicine*.
- **Berghe, D.** (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoides as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, 61:71-76.
- **Bolton, J.L ., Trush, M.A ., Penning,T.M, Dryhurst, G ., Monks, T.J.** (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol* ,13:135 145.
- **Beaudeau, J.L ., Geneviève, D.** (2011). Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives. 2^{ème} édition. Edition Lavoisier Chantal Arpino, pp : 130 - 131.
- **Bonnefont, R.D ., Théron.P .,Delattre.J.** (2003) .Radicaux libre et antioxydant. Flammarion. Paris, pp: 317.
- **Bloomer, R.J. Fisher,H-Wellman.** (2008) . Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gen Med*, 5(3): 218-28.
- **Benhamou, S, et al**(2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980–2005. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique*. **56** :159-175.

C

- **Chang .D.T., Lopez .A., von Kessler .D.P., Chiang .C., Simandl. B.K., Zhao. R., Seldin.M.F.,Fallon. J.F., Beachy P.A.** (1994) .Products, genetic linkage and limb patterning

activity of a murine hedgehog gene. *Development for advances in developmental biology stem cells*. 120: 3339-3353

- **Caudullo,G et Durrant,H. (2016).** Fraxinus angustifolia in Europe: distribution, habitat, usage and threats .*European Atlas of Forest Tree Species* 97:17-23.
- **Chen, L ., Yang, X ., Jiao, H ., Zhao, B . (2013).** Tea catechins protects against lead-induced ROS formation, mitochondrial dysfunction, and calcium deregulations in pc 12 cells. *Chemical*.
- **Cicek,E ., Cicek, N ., Bilir, N. (2006).**Effects of seedbed density on one-year-old Fraxinus angustifolia seedling characteristics and outplanting performance, 33:81–91.
- **Coskun, O. (2016).**Séparation Techniques: *Chromatography*, 3(2) : 156–160.
- **Claud, M .(2011).** Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone Des Laboratoires* - N°437.
- **Cadot , J .(1970).**Le Spectromètre A Grilles Dans Le Proche Infrarouge. *Revue. d’Optique Appliquée*, , 1(2) :79-90 .
- **Calas, G. (1976).** utilisation de la spectrométrie infrarouge pour l’étude de inclusions fluides des minéraux : intérêts et les limites , 99:153-161.
- **Cos, P ., Ying, L ., Calomme, M ., Hu, J.P ., Cimanga, K ., Van Poel, B ., Pieters, L ., Vlietinck A .J ., Vanden, C.H., Wen P., Lu, F. (1994).** Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of alsophila spinulosa (Hook) tryon . *Journal of Enzyme Inhibition*, 8 (1): 61- 71.
- **Cantin, P.A (1999).** Oxidant and antioxidants in lung injury. In: *Lam and Other Diseases Characterized by Smooth Muscle Proliferation*. Moss j. New York, 519 – 531.
- **Canavy,B ., Didier, J.C ., Jacquélet, F. (2014).** Mieux vivre avec une maladie professionnelle. *Edition Lulu Press*, Pp :116.
- **Cuvelier, C., Dotreppe, O ., Istasse,L. (2003).** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E, 147 : 315 – 324.
- **Chandan, K ., Sens,M. A ., Osmo, H. (1994).** Exercice-induced oxydative stress: glutathione Supplementation and deficiency. *Journal of Applied Physiology*, 77 (5): 2177 – 2187.
- **Cano, N ., Barnoud, D ., Schneidre, S ., Vasson, M.P ., Hasselmann, M ., Leverve, X. (2007).** *Traité de nutrition artificielle de l’adulte*. 3^{ème} édition. Edition springer - Verlag, p 254.
- **Cos, S .,Fernández, R., Güézmés ,A., Sánchez-Barceló , E.J.(1998).**Influence of Melatonin on Invasive and Metastatic Properties of MCF-7 Human Breast Cancer Cells.*cancer Reseach*. 58 : 19.

D

- **David, S.B., (1999).** Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31 (6), 577–596.
- **Dornas, W.C ., Oliveira,T ., Rodrigues ., R.G ., Santos, A.F ., Nagem, T.J . (2008).** Flavonóides : potencial therapeutic no stress oxidative *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*, 28(3): 241- 249.
- **Djeridane, A ., Yousfi, M ., Brunel, J.M ., Stocker, P. (2010) .** Isolation and characterization of a new Steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome Arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2599-2606.
- **Dugas, A.J ., Castaneda, A.J ., Bonin, G.C ., Price, K.L ., Fischer, N.H ., Winston, G.W.(2000).** Evaluation of the total proxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* 63: 327-331.
- **Droge, K.S. (2002).** Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol.Rev* , 82 :47 –95.
- **Delattre, J ., Beaudeau, J.L ., Bonnefont, R . (2005).** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. *Edition Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales, Paris*, pp 14 , 93 , 94.
- **Davide, G.W .(2015).** Encyclopedia of Mind Enhancing, Foods, Drugs and Nutritional Substances. Second edition. Edition Mcfarland & Company, Inc, Publishers Jefferson, North Carolina, pp: 166.

E

- **Evans, W.J. (2000).** Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr*, 72: 647– 652.

F

- **Furlan, C.M. (2010) .**tannins: what do they represent in plant life. departamento de botânica, institu to de biociências, universidade de são paulo, sp, brazil.
- **Favier, A.F. (2003)** Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm*,64: 390-396.
- **Furlan, C.M. (2018) .**tannins: what do they represent in plant life. departamento de botânica, institu to de biociências, universidade de são paulo, sp, brazil.
- **Fisher,A. B ., Dodia, C ., Manevich, Y., Chen J.W., Feinstein, S.I .(1999).** Phospholipid Hydroperoxides Are Substrates for Non-selenium Glutathione Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:21329 – 21334.

G

- **GIANCOTTI, F.G (2014).** Deregulation of cell signaling in cancer, *FEBS Letters* .vol:588(16): 2558–2570.
- **Ghafourifar, P., Cadenas, E., (2005).** Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 190–195.
- **Ghasemzadeh, A et Ghasemzadeh, N. (2011).** Flavonoides and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human .*Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (31):6697-6703.
- **Ganse, H., GBAGUIDI. F., AMINOU, T ., ZIME, H ., MOUDACHIROU, M ., QUETIN-LECLERCQ, J.(2011)** .Développement et validation d’une méthode quantitative de dosage par Chromatographie Liquide à Haute Performance Ultra-violet (CLHP-UV) de l’artémisinine dans *Artemisia annua* cultivé au Bénin .5(1): 142-149.
- **Gao,X ., Ohlander, M., Jeppsson , N ., Bjork, L ., Trajkovski, V .(2000).** Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp: 48:1485.
- **Gauche, E ., Hausswirth, C. (2006).** Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. *Science & Motricité*, 58 : 43-66.
- **Georgetti, S.R ., Casagrande, R , Di Mambro, V.M ., Azzolini , E .S Fonseca Maria, J .V.(2003)** . Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPS Pharm Sci*, 5 (2): 1-5.
- **Goudable, J., Favier, A . (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 11 :115-120.
- **Gardès, A.M ., Jore, D. (2005).** Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l’oxygène, Radicaux libres et stress oxydant. Edition Lavoisier, Paris, pp :1 – 23.
- **Gèrard, M.D ., Chaudière, J. (1996).** Métabolisme et fonction antioxydant du glutathion. *Path Biol* ,44 :77 – 85.
- **Gavin E. C, Gary H , John-Marc C and Steven E. (2004).**Brenner.WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Resarch*. 14: 1188-1190.

H

- **Harvey, D. (2015)** .Modern analytical chemistry. america. *The journal of Immunology*,178:3814 – 3821.
- **Halliwell, B. et Gutteridge,A. (1996).** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical Evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*,70: 737 – 757.
- **Hagermen, A.E., Butler, L.J. (1978).** Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food chemistry*, 26:809-812.

- **Heymonet, C.(2013)** .Les plantes à visée anti-inflammatoire utilisées en phytothérapie. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat .université de lorraine.
- **Hinsinger, D., Basak ,J., Gaudeul, M., Cruaud, C, Bertolino. P., Frascaria,L.N., Bousquet ,J .(2013).**The Phylogeny and Biogeographic History of Ashes (*Fraxinus*, *Oleaceae*) Highlight the Roles of Migration and Vicariance in the Diversification of Temperate Trees.v:8 (11).
- **Hatano ,T., Edamatsu, R ., Mori, A. (1989)** . Effects of interaction of tannins with coexisting substances. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol 37:2016.
- **Hollman, P.C ., Katan, M.B.(1999).** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*,vol 37:937.
- **Halenget, J ., Pincemail, J ., Defraigne, J. O ., Charlier , C ., Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 62: 628 – 638.
- **Halliwell, B. (1989).** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical Evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*,70: 737 – 757.

J

- **Jayakumar,T ., Thomas, P.A .,Geraldine, P. (2009).** In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 228–234.
- **Jha , P ., Flather, M ., Lonn, E ., Farkouh, M ., Yusuf, S .(1995).** The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann. Intern Med*, vol123: 600-860.
- **Janssen, H. (2007).** Catalase over expression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. *The journal of Immunology*,178:3814 – 3821.

K

- **Kukić, J .,Petrović, S .,Niketić, M .(2006),** Antioxidant Activity of Four Endemic *Stachys* Taxa. *Biological and Pharmaceutical bulletin*. 29 : (4) . 725-729.
- **Kumar,V.(2010).**CYP 1A1 polymorphism and organochlorine pesticides levels in the etiology of prostate cancer. *Chemosphere* . 81 : 464-468.
- **Kaushik,N .K ., Bagavan, A ., Rahuman, A. (2015).** Evaluation of antiplasmodial activity of medicinal plants from North Indian Buchpora and South Indian Eastern Ghats.*Malaria Journal*, (14):1.

- **Kostova, I et Iossifova, T. (2006).**Chemical components of Fraxinus species. ,Fitoterapia, 78 :85–106.
- **Kádasi, M-Horáková., Adamčíková, K ., Pastirčáková, K., Longauerová.V ., Maľová. M.(2017).** Branch for Woody Plant Biology Natural infection of Fraxinus angustifolia by Hymenoscyphus fraxineus in Slovakia.23 (1) : 52-55.
- **Keith, D.B. (2002).** History of gas chromatography. 21:547 -557.
- **Kitson, F.G., Larsen, B.S., Ewen, C.N. (1996).**Gas Chromatography And Mass Spectrometry. Edition Academic Press limited.
- **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.
- **Kohen, R et Nyska, A. (2002).** Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.* 30: 620-650.
- **Koechlin, R .C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans la maladie respiratoire. *Nutrition Clinique & Métabolisme*. 20 :165 177.

L

- **Lingadurai ,S., Nath, LK ., Kar,PK., Besra ,SE., Joseph, RV.(2007).**Anti-Inflammatory And Anti-Nociceptive Activities Of Methanolic Extract Of The Leaves Of Fraxinus floribunda Wallich. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 4 : 4 .
- **Lee ,Y.S , Li ,P ., Huh, J. y ., Hwang, I.j ., Lu, M ., Kim ,J.i ., Ham, M ., Talukdar, S ., Chen, A ., Lu, W.j ., Bandyopadhyay, G. k ., Schwendener, R ., Olefsky. J ., Kim, J.b. (2011).** Synergistic effect of tetrandrine and ethidium bromide against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).*Journal of Toxicological Sciences*. 36(5) : 645–651.
- **Lene, R., Nielsen ., Hietala, Ari.M ., Kjær, E.D.(2017).** The Susceptibility Of Asian, European And North American Fraxinus Species To The Ash Dieback Pathogen Hymenoscyphus Fraxineus Reflects Their Phylogenetic History. 136: 59–73.
- **Lugasi,A .(2003).**The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases, *Acta Biologica Szegediensis* , 47:119-125.
- **Lacampagne, S. (2010) .** Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin : Etude de l’impact de l’organisation physico-chimique des parois cellulaires sur la composante

tannique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux. Thèse Pour Le Doctorat De L'université Bordeaux 2.

- **Lorrain, B ., Isabelle, K.y ., Pechamat, L , Teissedre, p.L .(2013).** Evolution of Analysais of Polyhenols from Grapes, Wines, and Extracts Molecules, (18) :1076-1100.
- **Lynch, J. (2001).**Analyse physico-chimique des catalyseurs industrielles .édition technip ,27 rue ginoux.paris, France
- **Li, C.Y ., Jackson, R.M. (2002).** Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation Injury. *Am. J. Physiol.-Cell Physiology*, 282: 227–241.
- **Lacolley , P ., Babuty, D ., Boulanger ,C ., Ghaleh, B ., Loirand, G., Pinet, F., Samuel, J.L.(2007).** Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. Edition John Libbey Eurotext, Paris . 312:316 , 317.
- **Lehucher, M ., Lesgards, J .F ., Delubac, O ., Stocker, P ., Durand, P ., Prost, M. (2001).** Oxidative stress and human disease, Current knowledge and perspectives for prevention. *Presse Medicale*, 30: 1076 – 1081.
- **Lindau, S.B ., Shaffer, J .(1993).** Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxiadative damage. *Free Rad Boil Med*, 8:15 – 581.

M

- **Marc .S Frédéric. A Namane M.(2004).** Code Saturne: A Finite Volume Code for the computation of turbulent incompressible flows - Industrial Applications. <http://www.latp.univ-mrs.fr/IJFV/spip>.
- **Mansour.H., Braidy. N ., Guillemin. GJ. , Chan-Ling T .(2006).** Age related changes in NAD+ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *journals.plos.org*. 316 , 317.
- **Minica- Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., and Simin, N., Agric .JMT, Dorman, HJD, Deans,SG., Figueiredo, AC., Barosso, JG and Ruberto, G.(1998)** Influence of the composition of essential oils on their antioxidant and antiradical properties..5(15) :3537-3544,
- **Macheix .(2013).**Les composés phénoliques des végétaux :quelles perspectives à la fin du XXème siècle, *Acta Botanica Gallica*, 143(6) : 473-479.
- **Marletta, M.A., (1989).** Nitric oxide: biosynthesis and biological. *Trends Biochem. Sci.* 14 (12), 488–492.
- **Moncada, S., Palmer Jr, R.M., Higgs, E.A., (1989).** Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1709–1715.

- **Mizutani ,T et Masaki, H. (2014).** Anti-photoaging capability of antioxidant extract from *Camellia japonica* leaf, *Experimental Dermatology*. 23: 23–26.
- **Medjahed, Z ., Atmani, K.D ., Fauconnier,M. L ., Richard, G ., Atmani, D.j. (2016).** Hepatoprotective and ant diabetic activities of *Fraxinus angustifolia* Vahl extracts in animal models: characterization by high performance liquid chromatography analysis. *Turkish Journal of Medical Sciences* . 46: 910-920.
- **Macheix .(1996).**Les composés phénoliques des végétaux :quelles perspectives à la fin du XXème siècle, *Acta Botanica Gallica*, 143(6) : 473-479.
- **Manach,C et Scalbert, A ., Morand,C ., Rémésy, C ., Jime, L.(2003).** Polyphenols : food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727–47.
- **Massaux, C. (2012).** Polyphénols : des alliés pour la santé. *Produit*, 149 :1-4.
- **Menvielle, B. J. (2005).** La superoxyde dismutase , puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie*.75: 118 – 121.
- **Mates ,J.M ., Perez, G.C ., Castro, N.I . (1999).** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32, 595 – 603.
- **Médart.J (2009).** Manuel pratique de nutrition: l'alimentation préventive et curative. 2^{ème} édition. Edition de Boeck University, pp: 51 – 52.
- **Marusawa, H ., Ichikawa, K.N ., Murakami, H .,Ito, K ., Tezuka.T. (2002).**Hydroxyle radical as a strong electrophilic species .*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **10**. 2283 – 2290.
- **Milane, H.(2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. p : 13-36.
- **Maksimovic, Z., Malencic, D., Kovacevic, N. (2005).** Polyphenol contents and antioxydant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96:873-877.

N

- **Niki, L ., Reynaert ,S.W ., Aesif, T.M ., Amy,B ., Emiel,F.M ., Wouters,C.G ., Irvin ., Yvonne M.W ., Ohla, S.E ., Opere,C.A ., Leday,A.M. (2007).** Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues, *Mutation Research*. 579: 22 – 36.
- **Nielsen, L.R., McKinney., L. V .,Hietala, M.A., Kjær, E.D. (2017).** The susceptibility of Asian, European and North American *Fraxinus* species to the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* reflects their phylogenetic history. *V* .136 :59–73.
- **Ningappa., M.B ., Dinesha ., R ., Srinivas,L. (2008).** Antioxidant and free radical scavenging activities of polyphenol-enriched curry leaf extract (*Murraya koenigii* L). *Food Chemistry* .106:720.

- **Nabavi, S.M ., Nabavi, S.F ., Alinezhad,H ., Zare, M., Azimi, R .,**(2012) .Biological activities of flavonoid-rich fractions of *Eryngium Caucasicum* Trautv. *European review for medical and pharmacological sciences*, 16 (1 3): 81-87.
- **Nuralam,M.d ., Bristi,N.J ., Rafiquzzaman, M.d.(2013)**. Review on in vivo and in vitro methods Evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21:143–152.
- **Naczki,M and Shahidi.F.(2006)**. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography*, 1054: 95-111.
- **Novelli, G.P (1997)** .Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol.* 48: 517-527.
- **Niki, L ., Reynaert ,S.W ., Aesif, T.M ., Amy,B ., Emiel,F.M ., Wouters,C.G ., Irvin ., Yvonne M.W ., Ohla, S.E ., Opere,C.A ., Leday,A.M. (2005)**. Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues, *Mutation Research*. 579: 22 – 36.
- **Nagmoti ,M B et al.(2012)** . Prevalence of hepatitis C infection in HIV-seropositive individuals in and around Belgaum, south India. *International Journal of STD & AIDS*. 23 : 10.

O

- **Owen,a .,Patrick ,L .,Timothy Johns,b. Owen, PL ., Johns, T .(1999)**. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout .*Journal of ethnopharmacology*, 64, :2 : 149-160.
- **Ohla . K ,Niko. A ,Busch .Markus , Dahlem .A,Christoph . S,Herrmann.**(Circles are different: The perception of Glass patterns modulates early event-related potentials. *Vision Research*. 45 :2668-2676.

P

- **Pastre , j et priymenko , N .(2007)**. Intérêt des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue méd* , p 4 :187.
- **Patrice, M., Pionneau, C ., Mazie, D .(2011)**. Spectrométrie de masse en biologie médicale : principes et applications . *Biotribune Mag* , 40 :4-8.
- **Parejo, I ., Viladomat, F., Bastida, J ., Rosas,R ,A ., Flerlage,N ., Burillo, J.,Codina, C. (2002)**. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*. 50: 6882–90.
- **Packer,L ., Kraemer ,K ., Rimbach ,G .(2001)**. Molecular aspects of lipid acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* . 17 (10) :888 – 895.
- **Pincemail ,J., Siquet, J., Chappelle, J. P.(2000)**. Evaluation des concentrations plasmatiques en antioxydants anticorps contre les LDL oxydées et homocysteine dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann.Biol. Chin*. 58: 178-185.

- **Power, S. K ., Smuder, A.J ., Kavazisan .,Hudson. (2010).**experimental guides lines for studies designed to investgate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance *international journal of spot nutrition and exercise metabolism.* 20:2-14.

R

- **Rasul, A., Bao, R ., Malhi, M. (2013) .** Induction of apoptosis by costunolide in bladder cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial dysfunction. *Molécules.*18 : (2) :1418–1433.
- **Rameau, J .C et Dumé, G. (1989).** Flore forestière française : Plaines et collines. Institut pour le développement forestier. 1 :457-459 .
- **Rajnarayana, M., Sripal R ., Chaluvadi, M.R ., Krishna. (2001) .**bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential ournal of pharmacology. 33: 2-16.
- **Rouessac , F et Rouessac , A. (2004).** Méthodes et techniques instrumentales modernes 6^e édition. Dunod, Paris.
- **Robert, E. (2003).** Liquid Chromatography Mass Spectrometry an Introduction .England.
- **Rusconi, F. (2011).**manuel de spectrométrie de masse a usage de biochimistes. edition 11.rue lavoisier,paris.
- **Rice, E.A ., Miller, N.J ., Paganga ,G. (1997).** Antioxidants properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science.* 2:152
- **Rice, E.v ., Miller, N. J., Paganga, G.(1996) .** Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine .*pp: 20933.
- **Rahman, I. (2002).** Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 1(3) : 291-315.
- **Roberfroid M B , Coxam V , Delzenne N M (2008).** Aliments fonctionnels. 2ème édition. Edition Lavoisier TEC & DOC, p : 209, 215 .
- **Ravi, K ., Ramachandran, B ., Subramanian , S. (2004).** Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences ,* 75 : 2717 – 2731 .
- **Rezaire A (2012).** Activité anti-oxydant et caracterisation phénolique du fruit de palmier amazonien oencarpus bataua (patawa). Thèse de Doctorat université des Antilles et de la Guyane.
- **Robak,J et Gryglewski ,R . J. (1998).** Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology.* 37. 837-841.

- **Ribéreau-Gayon, G. (1968).** Etude des mécanismes de synthèse et de transformation de l'acide malique, de l'acide tartrique et de l'acide citrique chez *Vitis vinifera* L. *Phytochemistry*, 7 : 91471-1482.
- **Ryszard, Gryglewski, J. (1988).** Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*. 37 : 5 : 837-841.

S

- **Sánchez-Moreno, J, Daban .C. (2006).** Cognitive impairment in bipolar II disorder. *The British Journal of Psychiatry*. 189:254-259.
- **Sarfraz, I ., Rasul ,A ., Jabeen ,F., Younis, T., Kashif Z.M., Arshad M ., Muhammad Ali(2017).** Fraxinus: A Plant with Versatile Pharmacological and Biological Activities . 2017 : 12-19.
- **Shahidi, F et Naczk , M. (2004) .** Phenolics in Food and Nutraceuticals.
- **Shukla,K, Mahdi, AA. , Rajender .(2012),S.** Ameliorative effect of *Withania coagulans* on dyslipidemia and oxidative stress in nicotinamide–streptozotocin induced diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*. 50:3595-3599 .
- **Shahidi, F et Naczk , M. (2006) .** Phenolics in Food and Nutraceuticals. . *Life Sciences* . 4: 564-582.
- **Sen ,T et Samanta ,SK.(2015).** Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. 147:59-110.
- **Sofowara ,G. (1982) .** Arbres et plantes médicinales du jardin. *édition fernard lanor* . paris pp:12.
- **Sherma ,J et Bernard,F. (2003).** Handbbook of thin layer chromatography. New York basel.
- **Sofwara ,G. (1982) .** Arbres et plantes médicinales du jardin. *édition fernard lanor* . paris pp:12.
- **Seeram, N. P ., Henning, S.M ., Lee, R ., Niu,Y ., Scheuller, H. S , Heber, D .(2006).** Catechin and caffeine contents of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 54.1599–1603.
- **Smati, D ., Longeon, A ., Guyot, M. (2004).** 3, 4-Dihydroxycinnamoyl -erythrodiol, a cytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian Sahara. *J. Ethnopharmacol.* 95: 405–407.
- **Schaer, D.J .(2010).** Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an oxidant scavenger. *Forum Original Research Communications* .12(2):185- 98.

- **Smith , M.A ., Perry, G ., Richey, P. L ., Sayre, L.M ., Anderson, V.E ., Beal, M. F.(1996).** Oxidative damage in Alzheimer . Nature. 382: 120.
- **Stargrove, M.B ., Treasure,J ., Mckee, D.L .(2008).** Herb, Nutrient and Drug interaction: Clinical Implication ad Therapeutic Strategies. Edition Mosby Elsevier. p p733.
- **Schin, L.N ., Yoshinori., N ., Kazou., M. (1998).** Tunneling effect in the regeneration reaction of vitamine E by ubiquinol. Chemical Physics Letters. 287: 70 – 74.
- **Stamler, J.S ., Slivka,A. (1996).** Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. Nutrition Reviews.54 (1): 1 – 30.
- **Sorg, O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. Comptes Rendus A Biologies. 327: 649 – 662.
- **Sayre, L.M ., Moreira, P. I ., Smith, M.A ., Perry,G. (2008).** Metal ions and oxidative. 4: 564-582.

T

- **Tanaka M, Kuei C.W, Nagashima, Y. (1997).** Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. Nippon Suis- an Gakkaishi .1997 : 47-1409.
- **Turkmen, N., Velioglu, S., Sari, F., Polat, G.(2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. Molecules. 12: 484-496.
- **Tamer F. M.D. (2003) .**Free radicals, Types, sources and damaging reactions, Internal and Sport. *Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F.*(30):7-15.

V

- **Valentao, P., Fernndes, E ., Canvalho, E ., Andrade, P.B ., Seabra, R.M ., Bastos, M.L. (2002).** Antioxidant activity of Hypericum androsaenium infusion scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biological and Pharmaceutical Bulletin .25:1324-1327.
- **Valko, M ., Izakovic , M ., Mazur, M ., Rhodes, C. J ., Telser, J. (2004).** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol. Cell. Biochem. 266: 37–56.
- **Valko, M ., Rhodes, C.J ., Moncol , J., Izakovic, M ., Mazur., M .(2006).** Free radicals, metals And antioxidants in oxidative stress induced cancer. Chem. Biol Interact.160: 1- 40.

- **Vincent, J.L , Martin ,C.(2008)** . Le syndrome de détresse respiratoire aigue. Edition Springer Berlin Heidelberg New York, pp: 172 .
- **Virginia, H., Sarah, L.E., Rachel, J.S., Nathaniel, T., Joseph, S., Adam, E., Cecilia, G., (2003).** Mitochondrial nitric-oxide synthase: role in pathophysiology. *IUBMB Life* .55 (10 &11), 599–603.

W

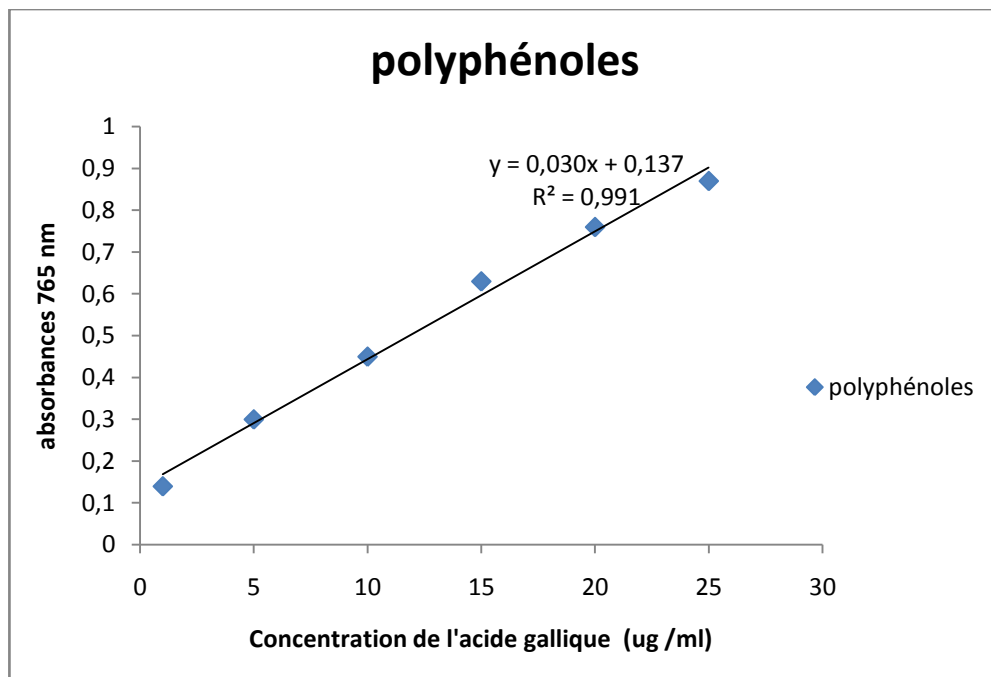
- **Wardman P, Andeias L P (1996).** Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* . 145: 523 – 531.
- **Wang, H ., Zou, D ., Xie, K et Xie, M.(2014)** . Antibacterial mechanism of fraxetin against *Staphylococcus aureus* , *Molecular Medicine Reports*, 10(5): 2341–2345.
- **Wasik, A et Antkiewicz, M.L.(2017).** The mechanism of neuroprotective action of natural compounds, *Pharmacological Reports*.69 (5) :851–860.
- **Wallander , E.2008).** Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Syst* . 273 :25–49.
- **Wastiel, C ., Kosinski, M . (1998).**Contrôle de qualité des produits radio pharmaceutiques par chromatographie liquide HPLC, (2). 18-22.
- **Widmer C C , Pereira C P , Gehrig P , Vallelian F , Schoedon G , Buehler PW, Wardman P, Candeias L P (1996).** Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* . 145: 523 – 531.
- **Wassmann, S ., Wassmann, K., Nickenig, G. (2004).** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten* . 44: 381-386.

Y

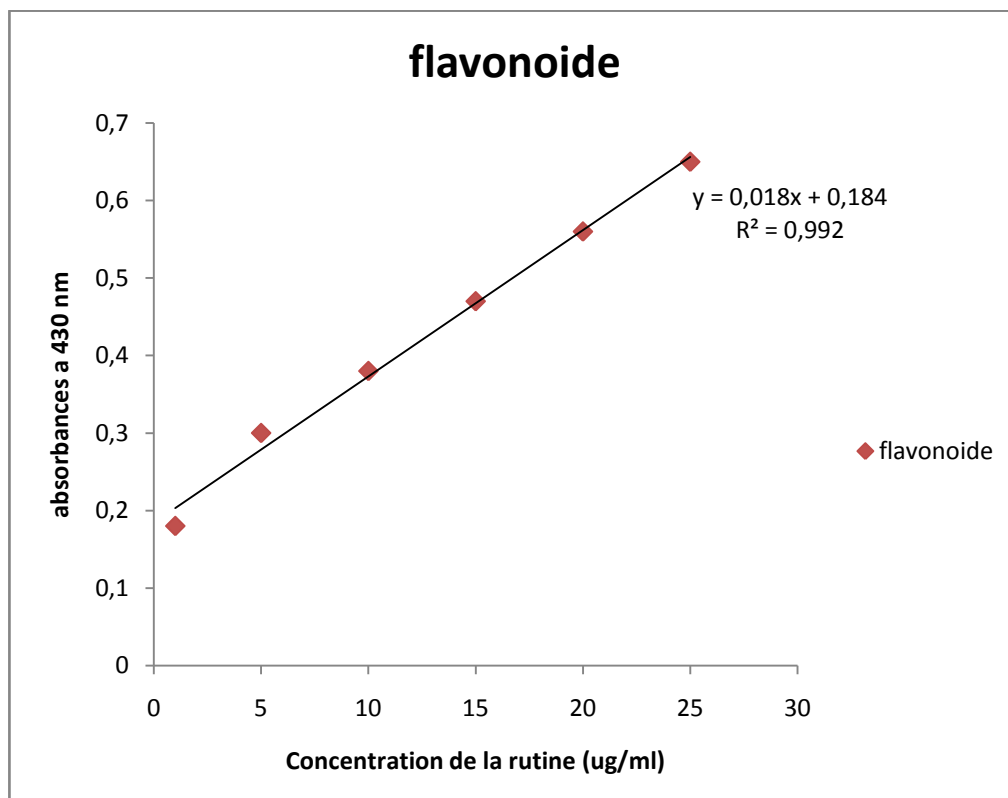
- **Younis,T., Khan, M.R ., and Sajid, M. (2016).** Protective effects of *Fraxinus xanthoxyloides* (Wall.) Leaves against CCl₄ induced hepatic toxicity in rat, *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16: (1).

Annexe

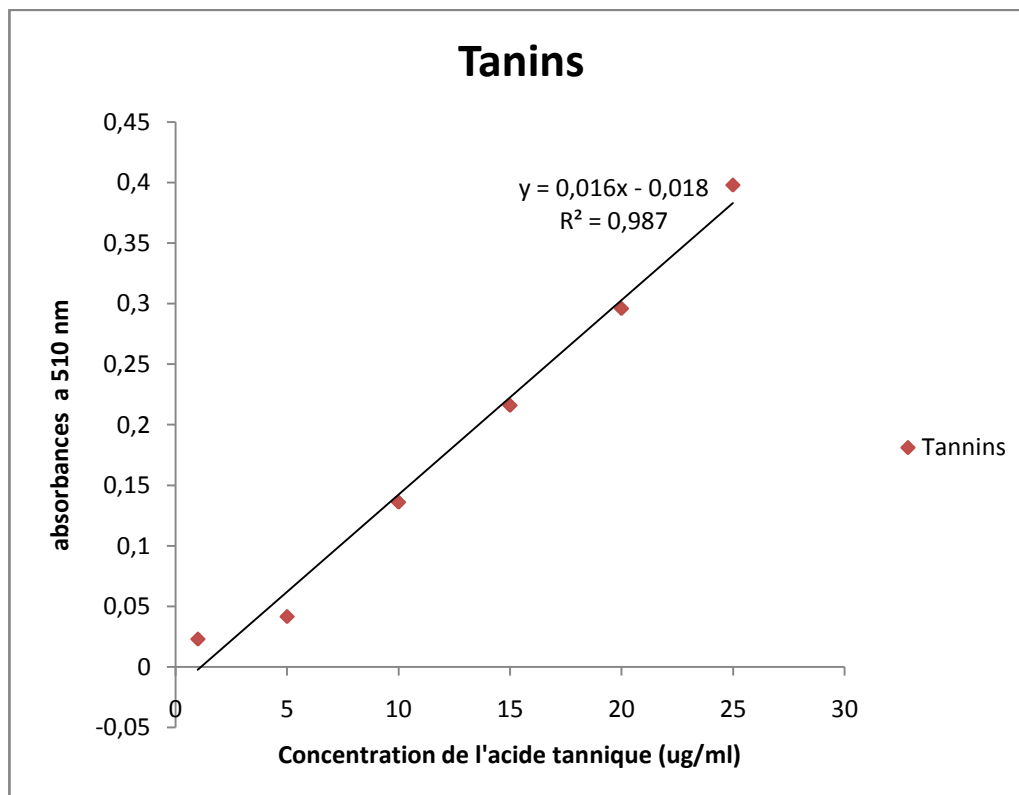
Annexe I : Courbe d'étalonnage pour dosage des phénols totaux



Annexe II : Courbe d'étalonnage pour dosage des flavonoïdes



Annexe III : Courbe d'étalonnage pour dosage des tanins



Résumé:

Fraxinus angustifolia est une plante médicinale appartenant à la famille des Oléacées, L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité antioxydant. Le dosage des composés phénoliques des extraits éthanoliques de feuilles et de l'écorce de *F. angustifolia*, révèle que la teneur en flavoïdes et Tannis (37 mg/g; 22,19 mg/g) pour les extraits de feuilles est plus élevée que celui de l'écorce (11,17 mg/g; 19,75mg/ ml) respectivement, tandis que la teneur en polyphénols totaux est plus élevée pour l'extrait d'écorce (27,34mg/g) que celui des feuilles (24,45 mg/g). L'activité anti-oxydante est évaluée contre les radicaux libres ABTS, DPPH, NO et O₂⁻, en comparant leurs IC₅₀ à des standartes antioxydants, les résultats obtenus révèlent que l'extrait de feuilles possède la meilleur pouvoir réducteur contre le radical DPPH, ABTS, NO et O₂⁻ en comparant aux les acides antioxydants. Et les d'IC₅₀ confirmie ces résultats. Pour les IC₅₀, a l'extrait de feuilles et de l'écorces, encore une fois l'extrait de feuilles représente le meilleurs effet inhibiteur....l'analyse chromatographique par chromatographie sur couche mince et chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, a permet l'identification de plusieurs molécules actives pour l'extrait de feuilles et celui de l'écorce.

Mots clés: *Fraxinus angustifolia*, ABTS, DPPH, Polyphénole, activité antioxydant, CG-MS.

Abstract

Fraxinus angustifolia is a medicinal plant belonging to the Oleaceae family, the objective of this work is to evaluate the antioxidant activity. The determination of phenolic compounds in ethanolic extract leaf and bark, revealed that flavonoid and Tannis content (37 mg /g , 22.19 mg /g) for leaf extracts was higher than bark (11.17 mg /g, 19.75 mg /g) respectively, while total polyphenol content is higher for bark extract (27.34 mg/g) than leaf extract (24. 45 mg /g). The anti-oxidant activity is evaluated against the free radicals ABTS, DPPH, NO and O₂⁻, by comparing their IC₅₀ with those of ascorbic acid, tannic acid, and quercetin, the results obtained reveal that the leaf extract possesses the best reducing power against the radical DPPH, by comparing with the extract of the bark and ascorbic acid (IC₅₀ DPPH 0.10 mg /g , 0.08 mg /g, 0.2 mg /g, leaves, bark and ascorbic acid respectively). For the ABTS radical (IC₅₀, 0.12 mg /g for the leaf extract and 0.26 mg /g for that of the bark), again the leaf extract represents the best inhibiting effect.... Chromatographic analysis by thin layer chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry, has allowed the identification of several active molecules for the leaf and the bark extract.

Key words: *Fraxinus angustifolia*, ABTS, DPPH, Polyphenols, antioxidant activity, CG-MS.

ملخص:

Fraxinus angustifolia هي من النباتات الطبية تعود لعائلة Oleeacea ، الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة للنبتة. ويستند عملنا على تحديد المركبات الفينولية من مستخلصات الايثانول من أوراق ولحاء *F. Angustifolia*، وكذلك تقييم نشاطهم المضادة للأكسدة في المختبر ، بحضور الجذور الحرة ABTS، DPPH، NO، O₂⁻. وتعتمد الدراسة على استخدام أساليب الكروماتوجرافية المركبة (CCM و GPC-SM) لتحديد العوامل المضادة للأكسدة. تم فصل المركبات الفينولية من *F. Angustifolia* ، (البوليفينول الكلي والفلافونويد ، التانين). حيث كشف أن محتوى Flavoides و Tannis في القشرة على الترتيب (37مغ/غ و 22،19مغ/غ) ، أكبر من محتواه في الورقة (17،11،17مغ/غ. 19،75مغ/غ) على التوالي، و مجموع البوليفينول في القشرة أكبر (27،34مغ/غ) من كميته في الأوراق الذي (24،45مغ/غ). أما الجرعات المضادة للأكسدة تأخذ نشاطها عند الجرعة العالية (0.7 مغ/غ)، وفعالية المستخلصين مرتبطة بالتراكيز ، وهذا ماكدته نتائجنا لل IC₅₀ لل DPP و ABTS. L'anione superoxydes وكذلك monoxyde d'azotes. وفي الختام، فإن هذه النتائج تعزز القاعدة العلمية وتبرر استخدام *F. Angustifolia* في العلاج التقليدي والوقاية من الأمراض المتعلقة بالأكسدة ، وكذا قدرتها المضادة للأكسدة.

الكلمات الرئيسية: *Fraxinus angustifolia* ، ABTS ، DPPH ، Polyphenol ، Flavonoids ، Tannis ، antioxidant activity