

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE : Sciences

DEPARTEMENT Chimie

N° :.....



DOMAINE : Sciences de Matière

FILIERE : CHIMIE

OPTION : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

*Mémoire présenté pour l'obtention*

*Du diplôme de Master Académique*

**Par :** Maroua Douffi

Zineb lakehal

Intitulé

*Contribution à l'étude phytochimique et activité  
biologique des extraits de Fraxinus excelsior L*

**Soutenu devant le jury composé de :**

Dr. Bouchelouche Kanza	Université de M'sila	Président
Dr. Belhaddad Omelkheir	Université de M'sila	Rapporteur
Dr. Messasma Zakia	Université de M'sila	Examineur

**Année universitaire : 2017 /2018**

## **Dédicace**

*Je dédie ce modeste travail :*

*À ma belle maman **Saida Lograda** pour leur soutien durant toute*

*ma vie et sans lequel je n'a aurais*

*jamais devenu ace que je suis*

*À toutes les professeurs et enseignants que j'ai eu durant*

*tout mon cursus scolaire et qui m'ont permis de réussir*

*dans mes études.*

*À ma chère famille Lograda*

*À mes meilleures copines Malika, Turquia, Sarah, Maroua, Soumia, Affaf*

*À ma chère binôme Zineb*

*À toute mes amies*

*A toute personne ayant contribué à ce travail de près ou de loin*

**MAROUA**

## **Dédicace**

*Je tiens à dédier ce modeste travail :*

*A ma très chère mère et à mon cher père, en gratitude de leurs dévouement, de leurs soutiens permanents durant toutes mes années d'études, de leurs sacrifices illimités, de leurs réconfort moral pour mon éducation, mon instruction et pour me voir atteindre ce but, pour tout cela et pour ce qui ne peut être dit, mes affectations sans limite.*

*A ceux qui sont la source de mon inspiration et mon courage, à qui je dois de l'amour et de la reconnaissance :*

*Mes chers frères : Abdelbassit et Abdelraouffet et mes Sœurs Houda et Soumia.*

*A mon fiancé : hassane Takiedin*

*A mes très cher amie : Maroua, Naziha et Mounira.*

*A tous mes amis et mes collègues*

*Et à ceux qui croiront toujours en moi.*

*A vous tous un grand merci.*

**ZINEB**

## **Remerciements**

*Nous avons remercié ALLAH, le tout puissant de nous avoir gardé en bonne santé, de nous avoir donné le courage et la patience pour l'accomplissement de ce travail.*

*Nous voudrions exprimer nous gratitude et nos sincères remerciements à notre encadreuse :*

***Mme. Omelkheir Belhaddad*** pour leur accepté d'encadrer et diriger le présent

*travail, pour leur encouragé et soutenu*

*ce travail n'aurait pas pu aboutir à des résultats sans l'aide et les encouragements de plusieurs personnes que je remercie.*

*Merci à tous les membres du jury pour avoir évalué notre travail et nous avoir offert cette belle journée qu'a été celle de notre soutenance de travail, quel beau souvenir*

*À tous les personnes qui ont impacter de près ou de loin dans la réalisation ce travail.*

*Enfin, nous remercie tous les enseignants de département de chimie.*

## RESUME

Cette thèse est une contribution à la valorisation de la plante *Fraxinus excelsior* visant à identifier les différentes familles de composés chimiques et une évaluation des activités antioxydante et antibactérienne. Pour l'étude phytochimique, on a réalisé une extraction par quatre méthodes avec trois solvants (éthanol, méthanol et l'eau). Les tests phytochimiques réalisés ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes, des tanins et de stérols et triterpènes. L'analyse qualitative de ces extraits par CCM a révélé la présence de flavonoïdes. Le dosage des polyphénols totaux effectués sur les extraits bruts ont été déterminés à partir des courbes d'étalonnage d'acide gallique. Les résultats montrent que l'extrait alcoolique est plus riche en polyphénols. Les activités les plus potentielles par le mécanisme de piégeage direct des radicaux libres par la méthode de DPPH sont prouvées par les extraits méthanoliques avec des  $IC_{50}$  pour macération et Soxhlet d'ordre de 35,39 et 46,005  $\mu\text{g/ml}$  respectivement. Les extraits ont été également soumis à un screening pour leur activité antibactérienne *in vitro*, contre deux souches de bactéries pathogène, en employant la méthode de diffusion à partir d'un disque solide. Les résultats ont montré que tous les extraits ont présenté une activité antibactérienne moyenne contre les deux bactéries.

**Mots clés :** *Fraxinus excelsior*, étude phytochimique, métabolites secondaires, activité antibactérienne, activité antioxydante, chromatographie sur couche mince.

## ملخص

يهدف العمل المقدم في هذه الأطروحة إلى الإسهام في إعطاء الأهمية لنبته عن طريق الفحص الفيتوكيميائي لتحديد مختلف المركبات الكيميائية وتقييم الأنشطة المضادة للأوكسدة والمضادة للجراثيم . بالنسبة للدراسة الفيتو كيميائي، تم إجراء الاستخراج بأربع طرق (الإيثانول ،الميثانول و الماء) . كشفت الاختبارات الفيتو كيميائية عن وجود الفلافونويد ، التانينات ،الستيرول التريتينات الثلاثية .كشف التحليل النوعي لهذه المستخلصات عن طريق ( CCM ) عن وجود الفلافونويد. إن كمية الفينولات الكلية قد حددت انطلاقا من منحنيات قياسية لحمض الجاليك النتائج بينت أن المستخلص الكحولي غني أكثر بالفينولات المتعددة الأنشطة الأكثر احتمال من خلال آلية المسح المباشر للجذور الحرة بواسطة طريقة DPPH من خلال مستخلصات الايثانولية IC50 بتقنيتين والسكسلي بتركيز مثبط IC50 بمقدار 35.39 و46.005 ميكروغرام / مل بالترتيب. تم فحص المستخلصات أيضا لنشاطها المضاد للبكتيريا في المختبر ضد السلالتين المسببة للأمراض ،باستخدام طريقة الانتشار على القرص الصلب وقد أظهرت النتائج أن جميع المستخلصات أظهرت نشاط مضاد للبكتيريا متوسط ضد السلالتين .

الكلمات المفتاحية : *Fraxinus excelsior* ، الأيضيات الثانوية ، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للأوكسدة و وكروماتوغرافيا

## ABSTRACT

This thesis is a contribution to the valorization of the plant *Fraxinus excelsior* aimed at identifying the different families of chemical compounds and an evaluation of the antioxidant and antibacterial activities. For the phytochemical study, extraction was carried out by four methods with three solvents (ethanol, methanol and water). The phytochemical tests carried out made it possible to highlight flavonoids, tannins and sterols and triterpenes. The qualitative analysis of these extracts by TLC revealed the presence of flavonoids. The total polyphenol assays performed on the crude extracts were determined from gallic acid calibration curves. The results show that the alcoholic extract is richer in polyphenols. The most potential activities by the mechanism of direct free radical scavenging by the DPPH method are proven by the methanolic extracts with IC<sub>50</sub> for maceration and Soxhlet of orders of 35,39 and 46,005 µg / ml respectively. The extracts were also screened for their antibacterial activity in vitro, against two strains of pathogenic bacteria, using the diffusion method from a solid disc. The results showed that all the extracts showed a mean antibacterial activity against both bacteria.

Key words: *Fraxinus excelsior*, phytochemical study, secondary metabolites, antibacterial activity, antioxidant activity, thin layer chromatography.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide ribonucléique

**BHT** : Butyl hydroxytoluene

**CAT** : Catalase

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**DMSO** : Dimethylsulfoxyde

**DPPH** : 2,2'-diphényle-1-picrylhydrazyl

**DPPHH** : 2,2'-diphényle-1- picrylhydrazine

**EDéc** : extrait de décoction

**EInf** : extrait de l'infusion

**EMHMe** : extrait hydrométhanolique de macération

**EMHEt** : extrait hydroéthanolique de macération

**ERO** : Les espèces réactives oxygénées (ROS)

**ESHMe** : extrait hydrométhanolique de soxhlet

**ESHet** : extrait hydroéthanolique de soxhlet

**IC50** : Concentration d'inhibition à 50 %

**GPx** : Glutathion peroxydase

**Mg EAG / g** : milligramme équivalent en acide gallique par gramme

**NADPH** : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**SOD** : Superoxyde dismutase

**UV** : Ultra-violet

## SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	01
---------------------------	----

### **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **Chapitre I : Etude de la plante médicinale**

I.1. Distribution géographique.....	03
I.2. Description botanique.....	03
I.3. Nomenclature de la plante.....	04
I.4. Composition chimique.....	04
I.5. Effets et usages médicaux.....	07
I.6. Mode d'utilisation et précautions d'emploi.....	08

#### **Chapitre II : Les métabolites secondaires**

II.1. Définition .....	09
II.2. Classification .....	09
II.2.1. Alcaloïdes .....	09
II.2.2. Stéroïdes .....	10
II.2.3. Saponosides.....	11
II.2.4. Les composés phénoliques.....	11
II.2.4.1. Flavonoïdes.....	12
II.2.4.2. Tanins.....	14

#### **Chapitre III : Activités biologiques**

III.1. Activité antioxydante.....	16
III.1.1. Les radicaux libres.....	16
III. 1.1.1. Définition.....	16
III.1.1.2. Les espèces réactives oxygénées (ERO).....	16
III.1.1.3. Origine des espèces réactives de l'oxygène.....	16
III.1.1.4. Principales cibles des radicaux libres.....	17

III.1.2. Les antioxydants.....	18
III.1.2.1. Antioxydants enzymatiques.....	18
III.1.2.2. Antioxydants non enzymatiques.....	19
III.2. Activité antibactérienne.....	20
III.2.1. Généralité.....	20
III.2.2.1. Les antibiotiques .....	21
III.2.2.2. Les substances naturelles.....	22

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre IV : Matériels et méthodes**

IV.1. Matériels végéta.....	23
IV.2. Méthodes d'extraction.....	23
IV.2.1. Infusion .....	23
IV.2.2. Décoction .....	23
IV.2.3. Macération.....	23
IV.2.4. Soxhlet .....	23
IV.3. Screening phytochimique.....	24
IV.3.1. Réactions de caractérisation de la poudre végétale.....	24
IV.3.1.1. Recherche des alcaloïdes.....	24
IV.3.1.2. Tanins .....	24
IV.3.1.3. Flavonoïdes .....	25
IV.3.1.4. Stéroïdes .....	25
IV.3.1.5. Saponosides .....	26
IV.3.1.6. Oses et holosides .....	26
IV.3.1.7. Mucilages .....	26
IV.3.2. Réactions de caractérisation des extraits .....	26
IV.3.2.1. Détection des alcaloïdes .....	26
IV.3.2.2. Les tanins .....	26

IV.3.2.3. Flavonoïdes.....	27
IV.3.2.4. Stéroïdes .....	27
IV.3.2.5. Saponosides .....	27
IV.3.2.6. Oses et holosides.....	28
IV.3.2.7. Mucilage .....	28
IV.4. Chromatographie sur couches minces CCM .....	28
IV.5. Dosage des polyphénols .....	30
IV.6. Etude des activités biologiques.....	30
IV.6.1. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode au DPPH.....	30
IV.6.2. Activité antibactérienne .....	32

## **Chapitre V : Résultats et discussions**

V.1. Procèdes d'extraction.....	33
V.2. Les résultats du screening phytochimique.....	34
V.3. La chromatographie sur couche mince (CCM).....	36
V.4. Dosage des polyphénols.....	39
V.5. L'activité antioxydante par le radicale DPPH.....	41
V.6. L'activité antibactérienne.....	45
<b>Conclusion</b> .....	47
<b>Références bibliographiques</b> .....	49

## LISTES DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : Aspect morphologiques du <i>Fraxinus excelsior</i> L : <b>A</b> : arbre, <b>B</b> : fruits, <b>C</b> : feuilles.....	03
<b>Figure 02</b> : Séco-iridoïdes isolés de la feuille de frêne.....	07
<b>Figure 03</b> : Triterpènes présents dans la feuille de frêne.....	07
<b>Figure 04</b> : Structure chimique de quelques alcaloïdes.....	10
<b>Figure 05</b> : noyau cyclopentanophénanthrénique.....	10
<b>Figure 06</b> : Structure de base des flavonoïdes.....	12
<b>Figure 07</b> : Les principales classes des flavonoïdes.....	13
<b>Figure 08</b> : Structure générale de tanins hydrolysable.....	14
<b>Figure 09</b> : Structure générale de tanins condensés.....	15
<b>Figure 10</b> : Résumé du mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active.....	19
<b>Figure 11</b> : Structure de la paroi bactérienne.....	20
<b>Figure 12</b> : Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive.....	31
<b>Figure 13</b> : Les images de résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans les extraits de <i>Fraxinus excelsior</i> .....	36
<b>Figure 14</b> : Chromatogrammes observés sous UV à 365 nm des extraits.....	38
<b>Figure 15</b> : Courbe étalonnage de l'acide gallique.....	39
<b>Figure 16</b> : Teneurs en polyphénols pour différents extraits préparés à partir des feuilles de <i>Fraxinus excelsior</i> .....	40
<b>Figure 17</b> : Les pourcentages d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration des différents extraits.....	42
<b>Figure 18</b> : Valeurs des IC <sub>50</sub> des différents extraits préparés à partir les feuilles de <i>Fraxinus excelsior</i> .....	43
<b>Figure 19</b> : Corrélation entre les valeurs d'IC <sub>50</sub> (test DPPH) et les teneurs en phénols totaux de différents extraits préparés.....	44
<b>Figure 20</b> : L'activité antibactérienne des extraits de <i>Fraxinus excelsior</i> a vis-à-vis. <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> .....	46

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 01</b> : Les flavonoïdes de <i>Fraxinus excelsior</i> .....	05
<b>Tableau 02</b> : Les acides de <i>Fraxinus excelsior</i> .....	06
<b>Tableau 03</b> : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes.....	29
<b>Tableau 04</b> : Quantités et rendements des extraits des feuilles de <i>Fraxinus excelsior</i> .....	33
<b>Tableau 05</b> : Résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans les feuilles de <i>Fraxinus excelsior</i> .....	34
<b>Tableau 06</b> : Résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans les extraits de <i>Fraxinus excelsior</i> .....	35
<b>Tableau 07</b> : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits.....	37
<b>Tableau 08</b> : les zones d'inhibition des extraits.....	45

# **INTRODUCTION GENERALE**

### INTRODUCTION GENERALE

Depuis la nuit des temps l'homme utilisait la nature comme source de nourriture et de médicaments. A cet effet, les plantes ont été privilégiées par toutes les civilisations du monde pour développer une pharmacopée traditionnelle en réponse aux maladies qui les touchaient. L'étude des composés d'origine naturelle est toujours porteuse de beaucoup d'espérance pour la recherche de nouveaux médicaments [1].

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, on a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes et dérivés, des terpènes, stéroïdes et des composés poly phénoliques [2].

Ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, d'insectes, sécheresse, lumière UV...). D'un point de vue applicatif, ces molécules constituent souvent la base des principes actifs des plantes médicinales [3].

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde, avec une avalanche de beaucoup de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. C'est en grande partie dû à la géographie vaste englobant une masse de terre approximativement de 216, 634.000 hectares de secteurs forestiers fermés. Plus de 5.000 de substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entres elles se sont avérées utiles dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies. Malgré la nature hétérogène du continent, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents chimio thérapeutiques et prophylactiques de ces plantes [4].

Dans ce contexte, s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antioxydants et antimicrobiennes des différents extraits obtenus à partir de feuilles de *Fraxinus excelsior*.

Ce travail vise à chercher la richesse de cette plante en polyphénols, et à déterminer leurs propriétés biologiques. Pour atteindre ce but, plusieurs objectifs spécifiques devaient être réalisés :

- 1) Préparer des extraits aqueux, méthanoliques et éthanoliques à partir des différents extraits obtenus à partir de feuilles de la plante.
- 2) Faire un criblage phytochimique pour les différents extraits de la plante étudiée.
- 3) quantifier des composés phénoliques
- 4) Évaluer l'activité antioxydante des extraits de la plante étudiée.
- 5) Évaluer l'activité antibactérienne des extraits sur des souches bactériennes Gram-négative et Gram-positives.

# ***PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE***

**Chapitre I : Etude de la plante**  
**médicinale**

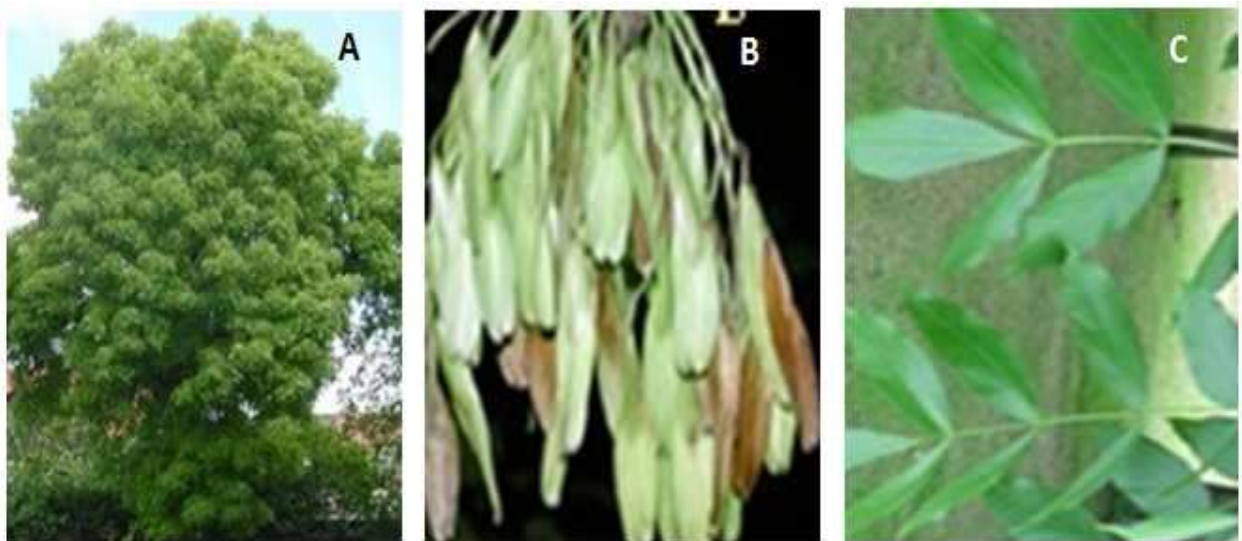
## 1. Distribution géographique

Le frêne est un arbre de la famille des oléacées. Il est aussi connu sous le nom de frêne commun, de quinquina d'Europe, ou de langue d'oiseau. Il pousse près des forêts fluviales, sur les berges des cours d'eau [5]. On le rencontre dans toute l'Europe, en Asie et en Afrique du Nord [6]. Le frêne commun est une espèce très sensible aux incendies, c'est pourquoi il est absent des zones où se produisent des incendies répétés [7].

L'expansion du frêne commun en Europe est un phénomène récent. La distribution du frêne s'est développée en fonction de facteurs historiques naturels et anthropogéniques [8]. Suite aux activités (perturbations) humaines, le frêne a connu de nouveaux environnements et sa fréquence a évolué en fonction du temps et de l'espace. Grâce à son ubiquité, il a été favorisé pendant les dernières décades sur les surfaces agricoles abandonnées [7].

## 2. Description botanique

C'est un arbre à feuillage caduc qui, sous des conditions favorables peut atteindre des hauteurs de plus de 40 m avec une circonférence allant jusqu'à 6 m. Les écorce lisse et grise, plus rugueuse avec l'âge. Les fleurs sont nues, infimes, de couleur tirant vers le rouge et comportent seulement deux étamines. Les fruits sont des samares aplaties, indéhiscentes, munies d'une aile membraneuse allongée. Comme pour toutes les samares, la dissémination des graines se fait en partie par l'action du vent. Les feuilles sont opposées, composées pennées portant 20 à 25cm folioles dentées de couleur vert foncé [9].



**Figure 01** : Aspect morphologiques du *Fraxinus excelsior* L : **A**: arbre, **B**: fruits, **C**: feuilles.

### **3. Nomenclature de la plante**

La plante *Fraxinus excelsior* est classée comme suit :

**Règne** : Plante.

**Classe** : Magnoliopsida.

**Sous classe** : Asteridae.

**Ordre** : Scrophulariales.

**Famille** : Oleaceae.

**Genre** : *Fraxinus*.

**Espèce** : *Fraxinus excelsior* L.

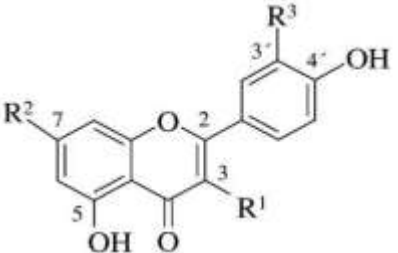
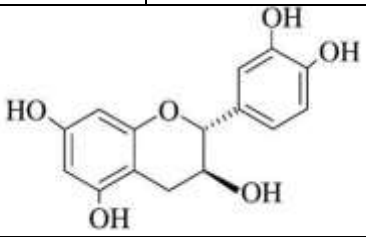
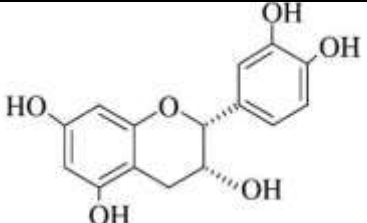
### **4. Composition chimique**

*Fraxinus Excelsior* renferme une grande gamme de produits chimiques dont :

#### **4.1. Flavonoïdes**

On trouve la catéchine et l'épicatéchine, la quercétine et la rutine ...etc (Tableau 01)

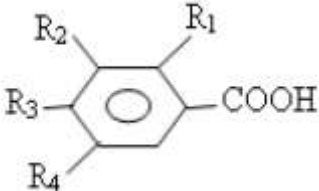
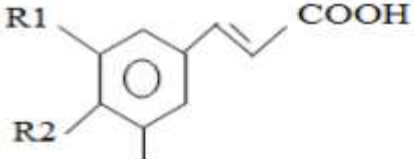
Tableau 01 : Les flavonoïdes de *Fraxinus excelsior* [10].

Structure de base			
			
R1	R2	R3	Nom
OH	OH	OH	Quercétine
OGlc-Rha	OH	OH	Rutine
OGlc	OH	OH	Isoquercetine
O-Rha	OH	OH	Quercetrine
OH	OH	H	Kaempferol
O-Glc	OH	H	Astragaline
OGlc-Rha	OH	H	Nicotiflorine
H	OH	H	Apigénine
			(+)-Catechine
			(-)-Epicatechine

#### 4.2. Acides phénoliques

Parmi les acides phénoliques, *F. excelsior* renferme l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide 2,4- dihydroxybenzoïque, l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide cinnamique, l'acide caféique et l'acide sinapique (Tableau 02).

Tableau 02 : Les acides de *Fraxinus excelsior* [10].

Structure de base					
<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<i>Nom</i>	
<i>H</i>	<i>H</i>	<i>OH</i>	<i>H</i>	<i>Acide p-hydroxybenzoïque</i>	
<i>OH</i>	<i>H</i>	<i>OH</i>	<i>H</i>	<i>Acide 2,4-dihydroxybenzoïque</i>	
<i>H</i>	<i>OCH<sub>3</sub></i>	<i>OH</i>	<i>H</i>	<i>Acide vanillique</i>	
<i>H</i>	<i>OH</i>	<i>OH</i>	<i>OH</i>	<i>Acide gallique</i>	
Structure de base					
<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<i>Nom</i>		
<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>Acide cinnamique</b>		
<b>OH</b>	<b>OH</b>	<b>H</b>	<b>Acide caféique</b>		
<b>OCH<sub>3</sub></b>	<b>OH</b>	<b>OCH<sub>3</sub></b>	<b>Acide sinapique</b>		

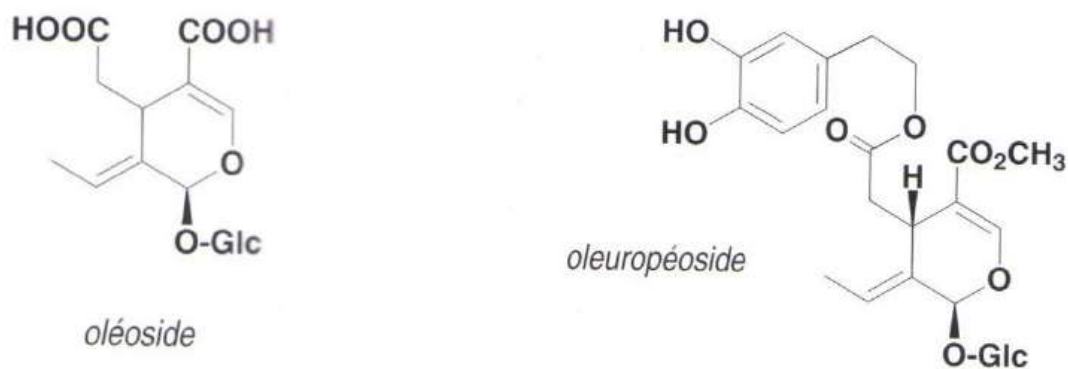
#### 4.3. Tanins

Les feuilles de frêne renferment des tanins catéchiques et galliques [11].

#### 4.4. Terpènes

##### ✓ Séco-iridoïdes

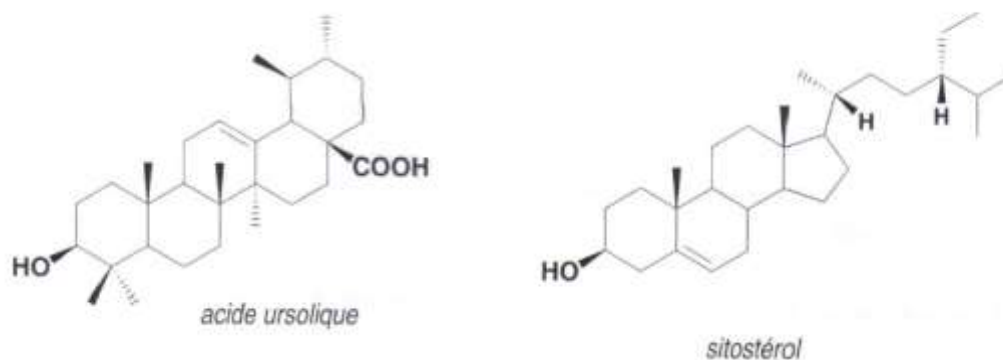
Une grande diversité de séco-iridoïdes ont été isolés. On retrouve notamment l'oléoside, l'oleuropéside [6].



**Figure 02 :** Séco-iridoïdes isolés de la feuille de frêne

### ✓ Triterpènes

On note la présence d'acide ursolique ainsi que  $\beta$ -sitostérol (*figure 03*) [12].



**Figure 03 :** Triterpènes présents dans la feuille de frêne

#### 4.5. Autres composés

Les feuilles de frêne contiennent du mannitol et des minéraux notamment du potassium [12].

### 5. Effets et usages médicaux

Les espèces de *Fraxinus* ont une importance économique, commerciale et médicinale.

Beaucoup d'entre elles attirent une attention considérable pour leurs propriétés médicinales et trouvent leurs applications aussi bien dans la médecine traditionnelle que dans la médecine

moderne. Elles ont été employées dans différentes régions du monde pour leurs effets purgatifs, diurétiques et doux aussi bien que pour le traitement de la constipation, l'hydropisie, l'arthrite, la douleur rhumatismale et de la cystite [10].

L'écorce du frêne est utilisée comme anti-inflammatoire, antifièvre, analgésique et comme traitement du rhumatisme, de la diarrhée et de l'arthrite. La tisane des feuilles possède un effet laxatif et diurétique. L'infusion du frêne stimule les reins sans causer d'irritation et favorise ainsi l'élimination de toxines. Cette infusion est donc recommandée contre la goutte, le rhumatisme et pour purifier le sang [13] [6].

## **6. Mode d'utilisation et précautions d'emploi**

Les parties utilisées de cet arbre sont les feuilles et l'écorce. Dans la crise de goutte, ce sont les feuilles qui seront utilisées.

***L'infusion :*** Elle est souvent indiquée. Il faut 10 à 20g de feuilles séchées po

ur un litre d'eau bouillante. La dose est de à 0,5 à 1L par jour [5].

***Décoction :*** faire bouillir une poignée de morceaux d'écorce dans 1 litre d'eau. En prendre 1 tasse avant les principaux repas [14].

***Des gélules sont commercialisées :*** Si elles sont dosées à 300mg, la posologie est de 2 gélules matin, midi et soir.

La consommation de plante diurétique nécessite un apport hydrique journalier suffisant. Elle doit être encadrée chez les patients ayant une pathologie rénale [5].

**Chapitre II : Les métabolites**  
**secondaires**

## 1. Définition

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes [15]. Ce sont caractérisés généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (généralement quelques pourcents du carbone total, si on exclue la lignine de cette catégorie) [16].

L'évaluation de la valeur thérapeutique de ces métabolites a fait l'objet de nombreuses recherches et a amené à l'identification des principaux éléments actifs de la plante. De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique s'appuie largement sur la diversité et les propriétés biologiques des métabolites secondaires végétaux pour le développement de nouveaux médicaments [17].

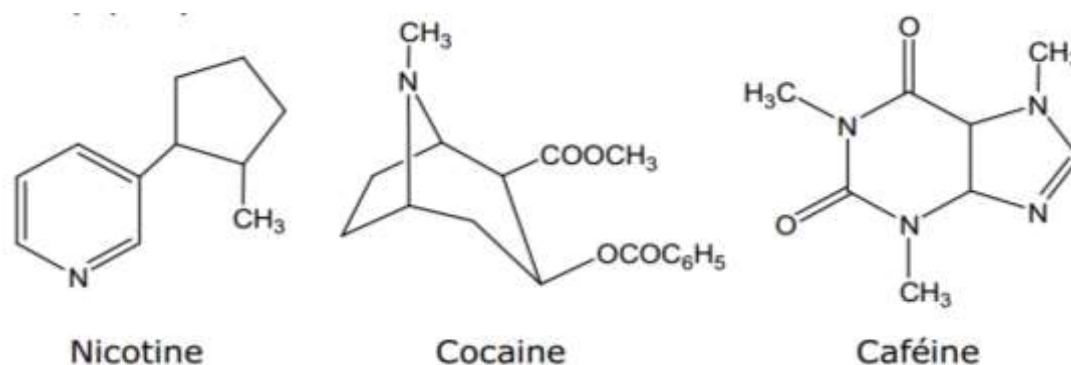
## 2. Classification

Ils sont classés en plusieurs grands groupes selon leur appartenance chimique : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques dépendant principalement de leur nature chimique et de leur concentration [18].

### 2.1. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées, le plus souvent, d'origine végétale. La plupart des alcaloïdes sont donnés des réactions de précipitation avec certains réactifs appelés "réactifs généraux des alcaloïdes" et ayant des propriétés physiologiques et pharmacodynamiques même à faible dose [19].

Depuis leur découverte, plus de 12000 alcaloïdes ont été isolés ou détectés chez les plantes, les champignons et même les animaux. Pour cela et à cause de la grande diversité de ce groupe, leur classification est basée sur plusieurs critères [20]. Les molécules d'alcaloïdes les plus courantes sont représentées dans la figure 04.

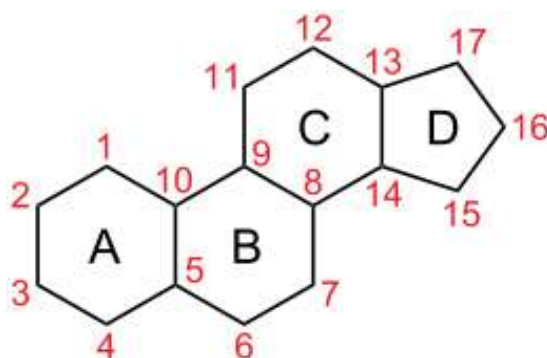


**Figure 04 :** Structure chimique de quelques alcaloïdes.

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités qui s'exercent dans les domaines les plus variés. Au niveau du système nerveux central ils seraient des dépresseurs (morphine) ou stimulants (caféine). On note aussi l'existence d'anesthésiques locaux (cocaïne) et d'antifibrillants (quinine) [21].

## 2.2. Stéroïdes

Les stéroïdes sont dérivés de triterpènes tétracycliques, Ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique hydrophobe partiellement ou totalement hydrogéné. Beaucoup de stérols se produisent sous forme de glycosides caractérisés par les saponines stéroïdiens [22].



**Figure 05 :** noyau cyclopentanophénanthrénique.

Ils comprennent une grande variété de composés naturels parmi lesquels se trouvent : les hormones sexuelles, les hormones corticosurrénales, les acides biliaires, les glucosides cardiotoniques, les sapogénines, quelques alcaloïdes et d'autres groupes mineurs [22].

Les stéroïdes possédant beaucoup d'activités biologiques comme l'activité antimicrobienne, antitumorale, antioxydante et inflammatoire [23].

### 2.3. Saponosides

Les saponosides constituent un groupe d'hétérosides très fréquent chez les végétaux [24]. Ils tirent leur nom du latin *sapo* signifiant savon en raison de leur propriété à former des solutions moussantes en présence d'eau. Au niveau structural, les saponines sont composés d'une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile liée à une partie aglycone hydrophobe pouvant être de type stéroïdique ou triterpénique, appelée génine. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaire confère aux saponosides des propriétés tensioactives ou de détergent [25].

Plusieurs drogues à saponosides sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour leurs propriétés antitussives et/ou expectorantes. L'industrie des cosmétiques exploite notamment leurs propriétés détersives [13]. De plus, Les saponines possèdent une grande variété d'activité biologiques telles que : anti-inflammatoire, antitumorale, antivirale et antifongique [26].

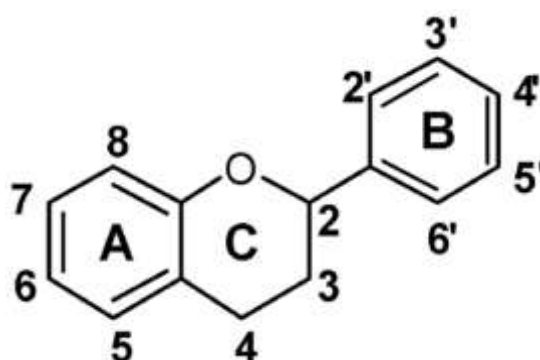
### 2.4. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires spécifiques du règne végétal. Ils constituent un des groupes les plus nombreux et largement distribués des substances dans différentes parties des plantes (racines, feuilles, fruits et écorce) [27]. Ils ont en commun un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles qui peuvent être libres ou engagées, avec ou sans autres fonctions (-COOH, -CH<sub>3</sub>...) [7]. Parmi les composés phénoliques les plus importants les tanins et les flavonoïdes.

### 2.4.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes (*flavus*, jaune en latin) représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits [28].

Tous les flavonoïdes possèdent le même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C (Figure 06) [29].



**Figure 06 :** Structure de base des flavonoïdes.

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, du degré d'hydroxylation et méthylation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C [28]. La variation dans ces paramètres peut subdiviser les flavonoïdes en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont : flavones, flavonols, anthocyanidines, flavanones, flavanols, isoflavones et chalcones (figure 07) [27].

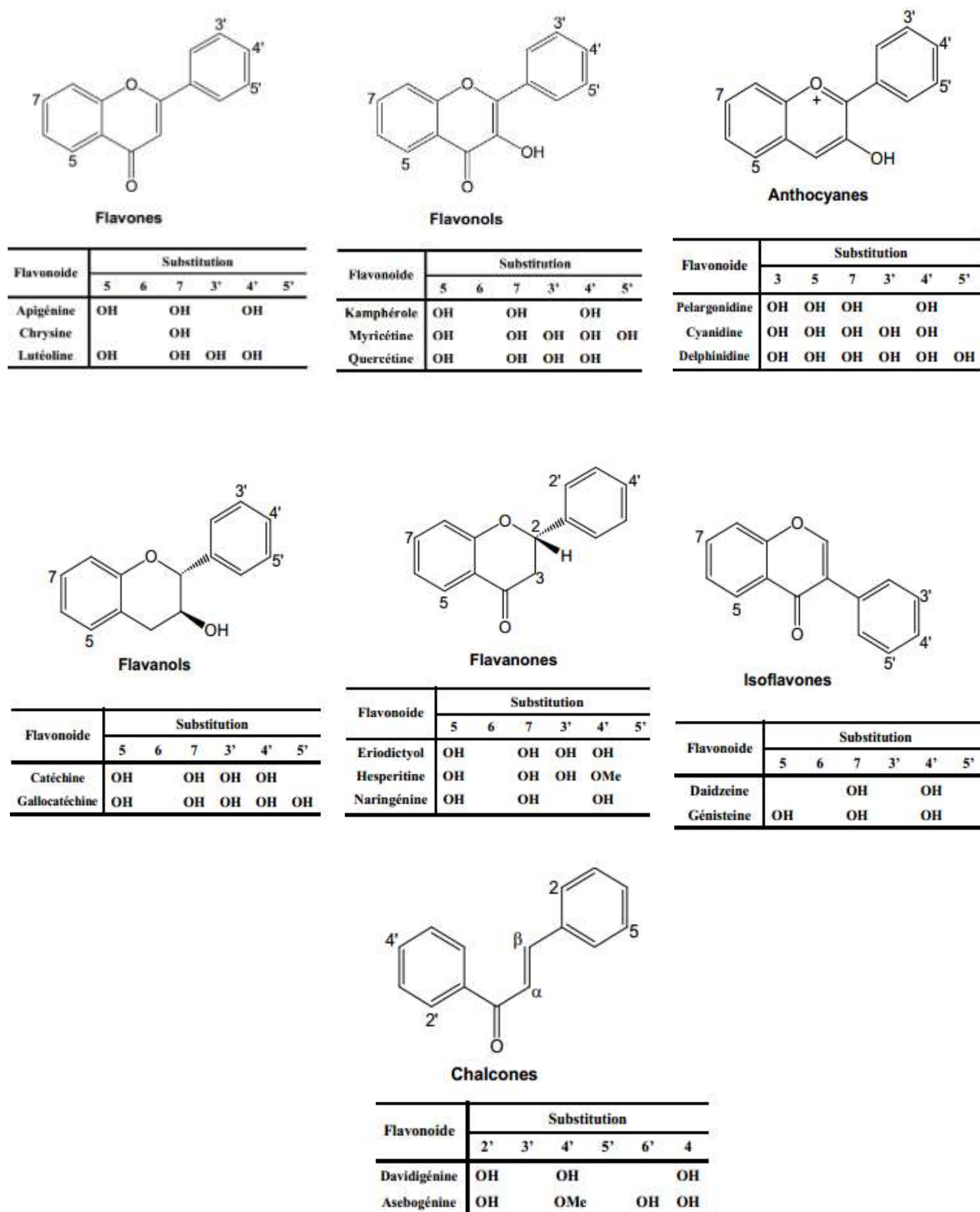


Figure 07 : Les principales classes des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales [30]. Ils sont reconnus pour leurs activités biologiques nombreuses et très diverses dont les activités antivirales, anti-inflammatoires, antioxydantes et anticancéreuses [31]. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH) et superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et également en tant qu'inhibiteurs d'enzymes responsables de la formation de ces espèces nocives [32].

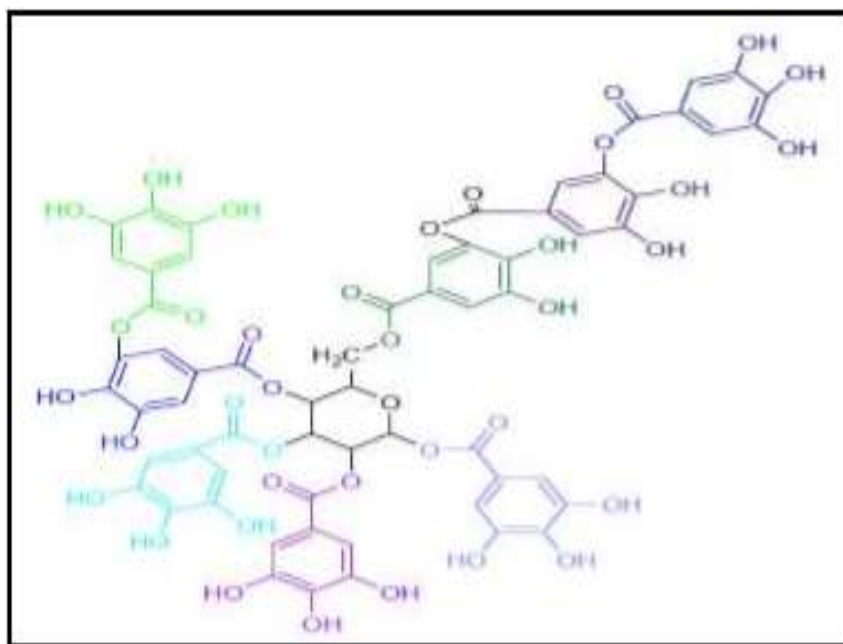
### 2.4.2. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da [33]. Ces composés naturellement produits par les plantes et se caractérisent par leur facilité à se combiner aux protéines [34]. En général, ils sont divisés en deux groupes les tanins hydrolysables et les tanins condensés [35].

#### *Tanins hydrolysables*

Ce sont des polyesters d'oses et d'acides phénols. Les oses sont trouvés dans ces tanins surtout représentés par le glucose, ces tanins sont de deux types :

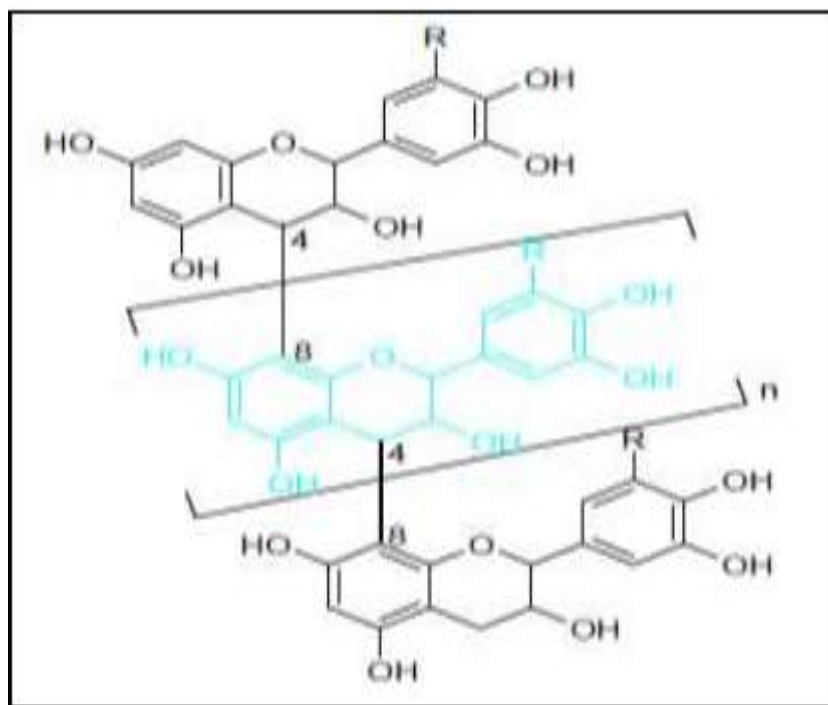
- Les tanins galliques qui sont les esters d'oses et d'acides galliques.
- Les tanins ellagiques qui sont des esters d'oses et d'acide ellagiques [36].



**Figure 08 :** Structure générale de tanins hydrolysable.

*Tanins condensés*

De structure plus complexe, on les appelle également proanthocyanidines, largement présents dans le règne végétal, et que l'on rencontre dans de nombreux produits alimentaires (fruit, légumes, boissons....) [35].



**Figure 09** : Structure générale de tanins condensés.

Les tanins sont caractérisés par leur capacité antioxydante. Grâce à leurs fonctions phénoliques, qui ont un fort caractère nucléophile, les tannins sont d'excellents piègeurs de radicaux libres, ils sont des donneurs de protons aux radicaux lipidiques produits lors de la peroxydation d'où la formation des radicaux tanniques plus stables [37].

Certains remèdes riches en tanins présentent des effets antimicrobiens [38], antiviraux [39] ou antifongiques. Cette activité thérapeutique reconnue explique l'inscription des tanins comme antiseptique dans la pharmacopée médicale [37].

## **Chapitre III : Activités biologiques**

## 1. Activité antioxydante

De nos jours, Il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leurs rôles dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme, mais aussi à leurs implications dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires [40].

### 1.1. Les radicaux libres

#### 1.1.1. Définition

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 rapparer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique [41].

#### 1.1.2. Les espèces réactives oxygénées (ERO)

##### 1.1.2.1. Les radicaux radicalaires

- Radical superoxyde ( $O^{\cdot-}$ ) ;
- Radical hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ ) ;
- Monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ).

##### 1.1.2.2. Les radicaux non radicalaires

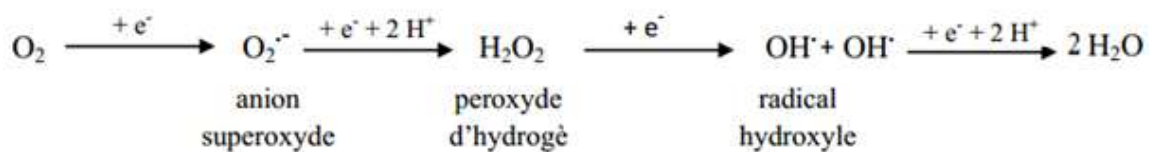
- L'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) ;
- Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ;
- Le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ) [42].

#### 1.1.3. Origine des espèces réactives de l'oxygène

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 [43]. Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

### 1.1.3.1. La mitochondrie

La mitochondrie est la source majeure de production des radicaux libres ; en effet, au cours du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, l'oxygène est réduit à 95 % par voie enzymatique en molécule non toxique comme H<sub>2</sub>O. La réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur O<sub>2</sub>, en conduisant aux intermédiaires respectifs O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et OH<sup>•</sup> selon la réaction suivante :



Cependant, une réduction incomplète de l'O<sub>2</sub> peut apparaître pour 1 à 5% de l'oxygène moléculaire conduisant alors à la formation du radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>-•</sup> [44].

### 1.1.3.2. La réaction immunitaire

L'inflammation est également considérée comme une source importante de ROS. Il a été montré qu'une grande quantité de ROS est produite par les cellules immunitaires, plus particulièrement les cellules phagocytaires. Ces cellules produisent l'O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, l'OH<sup>•</sup> et du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour éliminer les microorganismes pathogènes et les cellules cancéreuses. En effet, afin d'assurer la défense de l'organisme, les phagocytes utilisent le phénomène d'explosion oxydative, qui consiste à l'activation du complexe NADPH oxydase. Cette enzyme utilise l'oxygène pour produire des O<sub>2</sub><sup>-•</sup> en grande quantité au niveau de la membrane cytoplasmique [45].

### 1.1.3.3. Les facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux tels que le tabagisme, les radiations UV, les médicaments, les réactifs chimiques, les solvants industriels et la pollution sont des sources exogènes des ROS qui peuvent causer l'oxydation des composants biologiques [46].

### 1.1.4. Principales cibles des radicaux libres

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent agir sur différentes cibles biologiques comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques [47].

#### ***1.1.4.1. Lipides***

Les lipides, principalement les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette réaction est appelée peroxydation lipidique.

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule [42].

#### ***1.1.4.2. Protéines***

Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires. Les espèces réactives de l'oxygène sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes protéiques. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical  $\text{OH}\cdot$  s'additionne, modifiant la conformation de la protéine. Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures. De nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases [42].

#### ***1.1.4.3. Acides nucléiques***

Les acides ribo et désoxyribonucléique (ARN et ADN) sont aussi des cibles privilégiées des radicaux libres. Il a été calculé que l'ADN d'une cellule peut être le siège de 10000 attaques radicalaires par jour. De nombreux radicaux libres oxygénés et azotés sont capables d'attaquer l'ADN et l'ARN. Toutefois, l'anion superoxyde, le monoxyde d'azote et le peroxyde d'hydrogène, aux taux physiologiques, ne semblent pas réagir avec les bases et les sucres des ADN et ARN. En revanche la haute réactivité d' $\text{OH}\cdot$  est à la base d'un grand nombre de produits d'oxydation puisqu'il réagit facilement avec les bases (puriques et pyrimidiques) et avec les sucres (ribose et désoxyribose) [42].

### **1.2. Les antioxydants**

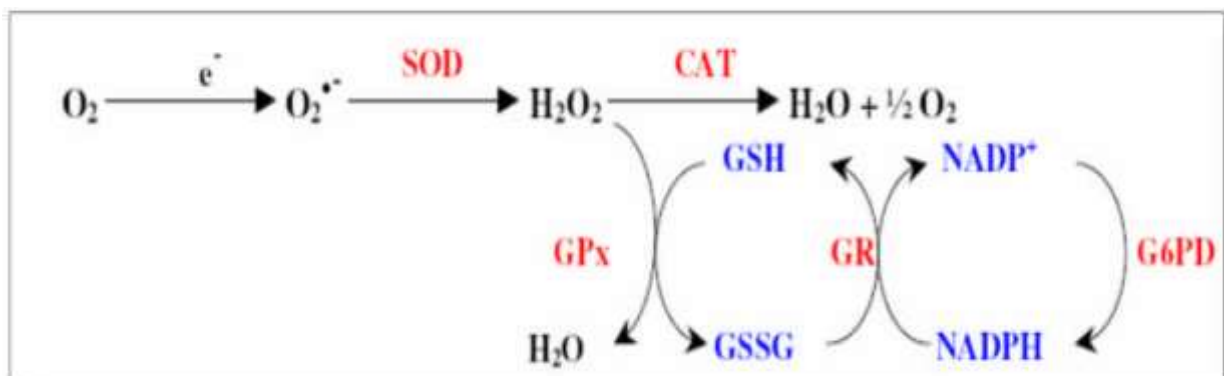
Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'espèces réactives de l'oxygène [37]. Les

systèmes de défenses antioxydantes de l'organisme peuvent être divisés en systèmes enzymatique et non enzymatique [43].

### 1.2.1. Antioxydants enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes : le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l' $O_2^{\bullet -}$  et de  $H_2O_2$  conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire [48].

Le rôle majeur du superoxyde dismutase ou SOD est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. La catalase ou CAT est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. L'activité du glutathion peroxydase ou GPx est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur [49].



**Figure 10 :** Résumé du mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active.

### 1.2.2. Antioxydants non enzymatiques

Ces systèmes antioxydants comportent des composés synthétisés in vivo (sources endogènes) tels que le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles (œstrogènes), l'acide urique... et des composés apportés par l'alimentation (sources exogènes) comme l'acide ascorbique (vitamine C), la vitamine E, les caroténoïdes, les polyphénols... Il est également possible de classer ces systèmes antioxydants selon qu'ils sont hydrosolubles (comme l'acide ascorbique et les polyphénols) assurant une protection des milieux intra et extracellulaires, ou

liposolubles (comme la vitamine E et les caroténoïdes) agissant surtout au niveau des membranes et des lipoprotéines circulantes [50].

## 2. Activité antibactérienne

### 2.1. Généralité

Les bactéries sont des organismes vivants unicellulaires procaryotes (caractérisés par une absence de noyau et d'organites). Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes (Gram positif et Gram négatif), basés sur la différence de la structure de la composition chimique de la paroi cellulaire [51].

La bactérie est enveloppée par une paroi rigide, qui lui donne sa forme et sa résistance. Cette paroi est épaisse chez les bactéries à gram positif et plus mince chez les bactéries à gram négatif. Ces dernières possèdent une seconde membrane qui est la membrane externe pour la distinguer de la membrane cytoplasmique, dite interne [52].

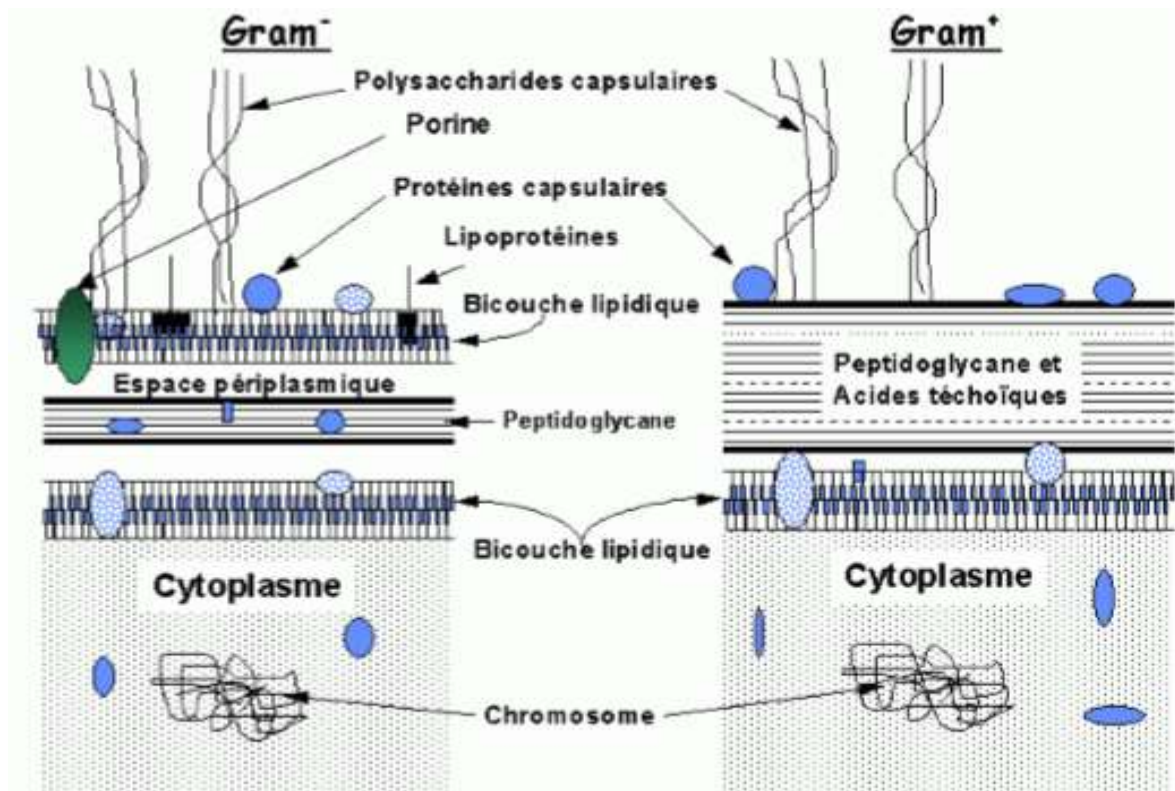


Figure 11 : Structure de la paroi bactérienne.

Si les bactéries travers les barrières cutanées ou muqueuses et pénètrent dans l'organisme, on obtient alors une infection. L'organisme est souvent capable d'éliminer les bactéries par l'intermédiaire d'une réaction du système immunitaire, sans que symptôme de maladie se manifestent. Lorsque les bactéries se multiplient plus vite que les défenses de l'organisme ne peuvent les détruire, se déclenche une maladie infectieuse accompagnée de signes inflammatoire [53]. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu. Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les micro-organismes résistant aux antibiotiques [54]. Il y a deux sources majeures pour la recherche de nouveaux antibactériens : les produits naturels et les molécules synthétiques (antibiotiques). Les produits naturels ont été la majeure source pour la découverte de nombreux médicaments nouveaux, et qui pourraient être développé en tant qu'agents antibactériens [55].

### **2.2.1. Les antibiotiques**

Les antibiotiques sont des substances chimiques produites par des micro-organismes ou par la synthèse chimique de molécules dérivant de composés naturels [56]. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs. Cette propriété les distingue des antiseptiques [57].

Chacun des antibiotiques a son spectre d'action propre : certains à spectre restreint ne sont efficaces que contre un groupe limité de microorganismes, certains n'attaquent que les bactéries gram-négatives, d'autres n'attaquent que les gram-positives, d'autre enfin sont à large spectre, c'est-à-dire qu'ils sont efficaces contre un très grand nombre de microorganismes différents. L'action des antibiotiques est influencée par de nombreux facteurs : concentration microbienne, milieu, interaction avec un autre antibiotique, ...etc [51].

### 2.2.2. Les substances naturelles

Les plantes restent la source la plus commune d'agents antimicrobiens. Leur utilisation comme remèdes traditionnels est la plus populaire pour 80 % de la population mondiale. En Asie, Amérique Latine et Afrique, plus de 35000 espèces de plantes sont utilisées à des fins médicinales [58]

Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols et les huiles essentielles ... etc. qui possèdent des activités antimicrobiennes. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

#### 2.2.2.1. Les composés phénoliques

Plusieurs études in vitro et in vivo ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antibactérienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques ; sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et Gram positif (*Staphylococcus aureus*) [59].

#### 2.2.2.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus efficaces présents dans les plantes. Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20<sup>ème</sup> siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser [60].

Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre. Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries Gram positives que sur les bactéries Gram négatives. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire [61].

# ***PARTIE EXPERIMENTALE***

## **Chapitre IV : Matériels et méthodes**

## 1. Matériels végétale

Le matériel végétal est constitué par les feuilles de *Fraxinus excelsior*. La plante a été récoltée aux mois d'avril et mai de la région de Lakhdaria de la wilaya de Bouira (Algérie). Après le séchage à température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, Le matériel végétal est broyé au mortier jusqu'à obtention d'une poudre fine.

## 2. Méthodes d'extraction

### 2.1. Infusion

A 50 g de poudre de *Fraxinus excelsior* nous avons ajouté 500 ml d'eau bouillante. Le mélange a été ensuite filtré après 3h de contact. L'infusé refroidi a été filtré et desséché dans l'étuve à 40°C [62].

### 2.2. Décoction

Nous avons effectué une décoction aqueuse à 10 %. 50g de poudre de *Fraxinus excelsior* ont été mis dans 500 ml d'eau distillée et portés à ébullition pendant 1h. Le décocté refroidi a été filtré et desséché dans l'étuve à 40°C [62].

### 2.3. Macération

Les polyphénols sont extraits du végétale séché et broyé (50g), par macération avec deux solvants à 80% à savoir l'éthanol et le méthanol. Cette macération se fait en deux temps, c'est-à-dire pendant deux jours successifs, avec changement de solvant chaque 24 heures, ceci pour permettre une meilleure extraction des composée [63]. Le mélange a été filtré et soumis à une évaporation à 45°C dans un rotavapor. Les extraits obtenus sont appelés extraits bruts.

### 2.4. Soxhlet

L'extraction au Soxhlet a été retenue comme technique d'extraction car elle favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale. L'extraction au Soxhlet a été effectuée par deux solvants à savoir l'éthanol et le méthanol.

Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de 30 g de poudre de *Fraxinus excelsior*, cette cartouche est fixée sur un réservoir (ballon) contenant 300 ml de solvant (80%) et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté. Le mélange a été filtré et soumis à une évaporation à 45°C dans un rotavapor.

### 3. Screening phytochimique

Ce screening qualitatif est réalisé sur les extraits préparés à partir des deux plantes pour une estimation préliminaire sur les constituants majeurs des extraits. Les principaux groupes phytochimiques pouvant être étudiés sont : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes et tanins), les saponosides, les stéroïdes et terpènes, les mucilages et les holosides. Les extraits des feuilles ont été soumis aux tests phytochimiques selon les méthodes de [64] [65].

#### 3.1. Réactions de caractérisation de la poudre végétale

##### 3.1.1. Recherche des alcaloïdes

Un extrait sulfurique est préparé à partir de 10g de drogue et 50ml d' $H_2SO_4$  dilué à 10%. Après une macération de 24h. Le filtrat est ensuite complété à 50 ml avec de l'eau distillée. Un volume de 1 ml de filtrat est introduit dans un tube à essai puis 5 gouttes de réactif de Dragendorff sont ajoutées. L'apparition d'un précipité confirme la présence d'alcaloïdes.

##### 3.1.2. Tanins

Dans un tube à essai, 5 ml du filtrat d'infusion (5 %) sont additionnés de 1 ml d'une solution aqueuse de  $FeCl_3$  à 1 %. En présence de tanin, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

La différenciation des tanins (catéchiques et galliques) est obtenue par la réaction de Stiasny ; à 30 ml d'extrait sont ajoutés 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 30% + 5

ml HCl concentré) et chauffés au bain-marie à 90°C. L'obtention de précipité rouge soluble dans l'alcool amylique montre la présence de tanins catéchiques. Après filtration, On a saturé le filtrat par l'acétate de sodium pulvérisé, puis ajoutés de quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 1%. Le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

### 3.1.3. Flavonoïdes

#### *Les anthocyanes*

Les anthocyanes sont détectés en plaçant 5 ml d'infusé à 5 % dans un tube auquel on ajoute 5 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 10%, après agitation, le mélange est ajouté à 1 ml NH<sub>4</sub>OH à 10%. La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleu-violacée en milieu basique.

#### *Les flavonoïdes libres*

Introduits dans un tube à essai 5 ml d'infusé à 5 %, et ajoutés de 5 ml d'alcool chlorhydrique (5 ml éthanol à 95 %, 5 ml eau distillée, 5 ml HCl concentré) ; puis de quelques copeaux de magnésium et de 1 ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose violacée (flavonones) ou rouge (flavonols, flavononols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les auronnes, les catéchines et les isoflavones.

### 3.1.4. Stéroïdes

Elle se fait par une macération de 24h dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec de l'anhydride acétique puis du chloroforme. Dans le fond du tube à essai contenant l'extrait, nous avons mis 1 à 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageant étant verte ou violette.

### 3.1.5. Saponosides

Elle se fait sur le décocté à 10% de la poudre. Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire successivement 1,2, 3...10ml de décocté. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter ensuite dans le sens de la longueur pendant 15 secondes en raison de 2 agitations par seconde. Après avoir laissé au repos pendant 15 minutes, la hauteur de la mousse est mesurée dans chaque tube, et une hauteur de 1 cm indique l'indice de mousse.

### 3.1.6. Oses et holosides

Procéder à une évaporation à sec de 5 ml de décocté aqueux à 10 %. Ajouter au résidu 2 à 3 gouttes de  $H_2SO_4$  concentré. Après 5 mn ajouter 3 à 4 gouttes d'alcool saturé avec du thymol. Une réaction positive se traduit par une coloration rose.

### 3.1.7. Mucilages

Introduire 1 ml de décocté aqueux à 10 % dans un tube à essai et ajouter 5 ml d'alcool absolu, attendre 10 mn. L'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilage.

## 3.2. Réactions de caractérisation des extraits

### 3.2. 1. Détection des alcaloïdes

Elle consiste à évaporer à sec 10 ml de chaque extrait, auquel 1.5 ml de HCl à 2% est ajouté. Après agitation de la solution obtenue, 1 à 2 gouttes du réactif de Dragendroff sont ajoutées. L'apparition d'un précipité orange indique la présence d'alcaloïdes.

### 3.2. 2. Les tanins

Les tanins sont mis en évidence à partir de 1 ml d'extrait placé dans un tube en présence de quelques gouttes de  $FeCl_3$  (1%). Après agitation de l'extrait, la couleur verdâtre vire au bleu noir en présence de tanins. La différenciation des tanins (catéchiques et galliques) est obtenue par la réactin de stiasny ; à 30 ml d'extrait sont ajoutés 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 30% + 5 ml HCl concentré) et chauffés au bain-marie à 90°C. L'obtention

de précipité rouge soluble dans l'alcool amylique montre la présence de tannins catéchique. Après filtration, On a saturé le filtrat par l'acétate de sodium pulvérisé, puis ajoutés de quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  à 1%. Le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny.

### 3.2. 3. Flavonoïdes

*Pour la détection des flavonoïdes libres*, 5 ml d'extrait aqueux sont introduits dans un tube à essai, et ajoutés de 5 ml d'alcool chlorhydrique (5 ml éthanol à 95%, 5 ml eau distillé, 5 ml d' $\text{HCl}$  concentré); puis de quelques copeaux de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose violacée (flavonones) ou rouge (flavonols, flavononols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool isoamylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génines).

*Les anthocyanes* sont détectés en plaçant 5 ml d'extrait aqueux dans un tube auquel on ajoute 15 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à (10%), après agitation, le mélange est ajouté à 5 ml  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10% (milieu basique). La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleu-violacée en milieu basique.

### 3.2. 4. Stéroïdes

Les stéroïdes sont révélés après addition de 1 ml d'anhydride acétique à 10 ml d'extrait aqueux évaporé. On a ensuite partagé la solution préparée dans deux tubes à essai, L'un servant de témoin et dans le fond du second tube à essai, nous avons mis 1 à 2 ml d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré. A la zone de contact des deux liquides, on observe formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette révèle la présence de stéroïdes et triterpènes.

### 3.2.5. Saponosides

Pour mettre en évidence les saponines, une série de 10 tubes à essais est fait par 1, 2...10 ml des extraits puis le volume dans chaque tube est ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Ensuite, chaque tube a été agité dans le sens de longueur pendant 15 secondes. Après un repos de 15 minutes, la hauteur de la mousse est mesurée dans chaque tube. Une hauteur de mousse persistante supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides.

### 3.2.6. Oses et holosides

Les oses sont détectés en introduisant 5 ml des extraits dans un bécher de 100 ml et évaporé au bain-marie à sec. Au résidu, sont ajoutées 2 à 3 gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré. Après 5 minutes, 3 à 4 gouttes d'éthanol saturé avec du thymol sont ajoutées. Le développement d'une coloration rose révèle la présence d'oses et holosides.

### 3.2.7. Mucilage

Pour mettre en évidence des mucilages, 1 ml d'extrait est introduit dans un tube à essai et ajouté de 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange, indique la présence de mucilages.

## 4. Chromatographie sur couches minces CCM

Les extraits obtenus ont été analysés qualitativement par chromatographie sur couche mince. Des dépôts de 10 µl de chaque extrait ont été effectués. La plaque a été introduite dans une cuve chromatographique contenant un solvant. Après migration, la plaque a été retirée de la cuve et séchée sous hotte. La révélation des constituants chimiques a été réalisée sous les lampes UV. Les spots ont été repérés et les rapports frontaux (distances de migration) du spot ont été mesurés.

Les systèmes de solvants employés sont les suivants :

**S1:** Tol/AcOEt/MeOH (26.67: 6: 0.67).

**S2:** CHCl<sub>3</sub>/MeOH (30: 3.33).

**S3 :** AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (33.33 : 4.5: 3.33).

**S4 :** Toluène/Acétone/Acide formique (1: 1.67: 0.33).

L'examen sous lumière ultra-violette fournit des informations très importantes sur la structure des molécules. Il apporte des indications particulières concernant les substitutions. Le tableau suivant résume les relations existantes entre la structure d'un composé flavonique et sa fluorescence sous UV [66].

**Tableau 03** : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes

<b>Spot coloré</b>	<b>Type de Flavonoïde</b>
Noir	Flavonol 5,6,7 tri OH libre Flavonol 5,6,8 tri OH libre
Brun noir	3 OH absent ou 3 OH substitue
Violet	Flavones 5 OH et 4'OH Flavones 3 OR et 5 OH, 4'OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones flavanones
Bleu Claire (fluorescent)	Flavones sans 5 OH libre Flavones sans 5 OH libre avec ou sans 5 OH substitue
Jaune terne Jaune Fluorescence Orangée	Flavonoles 3 OH libre avec Ou sans 5 OH libre
Jaune vert Brilliant	5OH libre ou 5OH substitue
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3 OH libéré Aurones Chalconé flavanones
Jaune pale	Dihydroflavonols

## 5. Dosage des polyphénols

### 5.1. Principe

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange de deux acides : acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est au voisinage de 760 nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits végétaux.

### 5.2. Protocole

Pour évaluer la teneur en polyphénols des extraits, 100  $\mu$ l de chaque extrait convenablement dilué est ajouté à 500  $\mu$ l du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois dans l'eau distillée). Après 4 min 400  $\mu$ l d'une solution de carbonate de sodium (7.5 % dans l'eau distillé) sont ajoutés, après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 765 nm par un spectrophotomètre UV [4].

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (10-140  $\mu$ g/ml). La concentration des polyphénols est calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligrammes d'extrait ( $\mu$ g EAG/mg d'extrait).

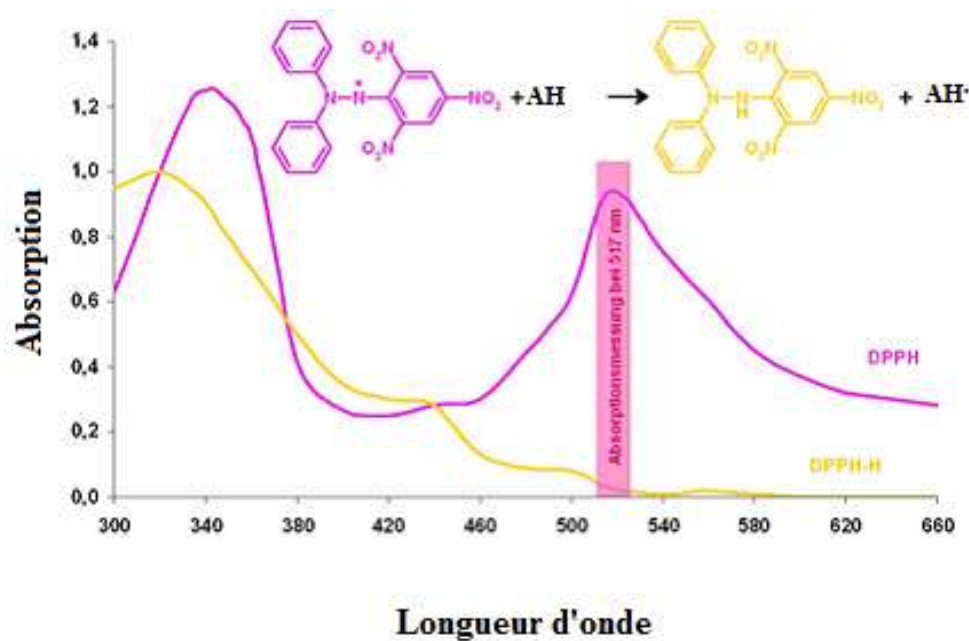
## 6. Etude des activités biologiques

### 6.1. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode au DPPH

#### 6.1.1. Principe

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode au DPPH. L'activité antioxydante des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical par les antioxydants donneurs

d'hydrogène présents dans l'extrait qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515 nm, [67].



**Figure 12 :** Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive [68].

### 6.1.2. Protocol

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire, des différents extraits, 50  $\mu$ l de chacune des différentes concentrations d'extraits ou de standard (quercétine, rutine et BHT) ont été incubés avec 1.25 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, la réaction de transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le DPPH<sup>•</sup> est suivie par spectroscopie visible en enregistrant la décroissance de la bande d'absorption du DPPH<sup>•</sup> à 517 nm. La capacité antioxydante d'extraits est déterminée en évaluant le pourcentage d'inhibition de l'absorbance du radical DPPH [69].

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 (A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}$$

$A_{\text{contrôle}}$  : Absorbance sans antioxydant

$A_{\text{échantillon}}$  : Absorbance avec antioxydant

## 6.2. Activité antibactérienne

### 6.2.1. Les souches testées

Les microorganismes testés dans le laboratoire centrale de l'hôpital zahraoui (M'sila).

Ils correspondent aux espèces suivantes :

Catégorie	Genre et espèce
Bactéries Gram-	Escherichia. Coli
Bactéries Gram+	Staphylococcus <i>aureus</i>

### 6.2.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques

Dans des boites de Pétris stériles préalablement coulées par des milieux (Gulose ; Nutritif), une suspension bactérienne à tester a été déposée sur la surface des géloses à l'aide d'un écouvillon stérile. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier filtre stérile de 6 mm de diamètre, imprégnés de 20  $\mu$ l des différents extraits (200 mg) ont été déposés stérilement sur la surface des milieux, préalablementensemencée. Les disques des contrôles négatifs sont imprégnés d'eau distillée et de DMSO. Des disques standards contenant l'antibiotique de référence (gentamycine, 10  $\mu$ g par disque) servent de contrôles positifs. Les boites de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h [70].

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle le diamètre de la zone d'inhibition, déterminé par les différentes concentrations des différents extraits autour des disques.

## **Chapitre V : Résultats et discussions**

## 1. Procèdes d'extraction

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse quantitative et qualitative proprement dite. Elle est influencée par la méthode d'extraction choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme la nature du solvant d'extraction, la température et les étapes d'extractions individuelles jouent également un rôle important dans cette procédure.

Dans notre étude, Nous avons réalisé quatre types d'extractions : une macération par l'éthanol et le méthanol à 80 %, extraction par soxhlet avec l'éthanol et le méthanol à 80 %, une décoction et une infusion sur les feuilles de *Fraxinus excelsior*. Les rendements d'extraction des composés phénoliques de différents matériels végétaux étudiés sont reportés dans le tableau suivant.

**Tableau 04** : Quantités et rendements des extraits des feuilles de *Fraxinus excelsior*.

Les extraits	EInf	EDéc	EMHMe	EMHEt	ESHMe	ESHEt
Masse de matériel végétale (g)	50	50	100	100	30	30
Masse extrait (g)	5.7	5.5	17.5	19.5	5.5	7
Rendement (%)	11.4	11	17.5	19.5	18.33	23.33

Les extraits hydroéthanoliques ont donné les plus forts rendements (19.5 et 23.33%), suivis par les extraits hydrométhanoliques (17.5 et 18.33 %). Les substances extractibles par l'eau montrent les rendements les plus faibles pour les deux méthodes avec 11.4 % et 11 % respectivement pour l'infusion et décoction. Ces substances représentent celles utilisées par la médecine traditionnelle car cette dernière n'utilise que l'eau comme solvant d'extraction.

D'après ces résultats nous constatons que le mélange hydroalcoolique donne les meilleurs rendements d'extractions par rapport aux mélanges aqueux. Dans la plupart des

plantes étudiées les extraits hydrométhanolique représentent des rendements plus élevé que celle des extraits aqueux.

## 2. Les résultats du screening phytochimique

Les résultats de screening réalisés sont mentionnés dans les tableaux et les figures ci-dessous.

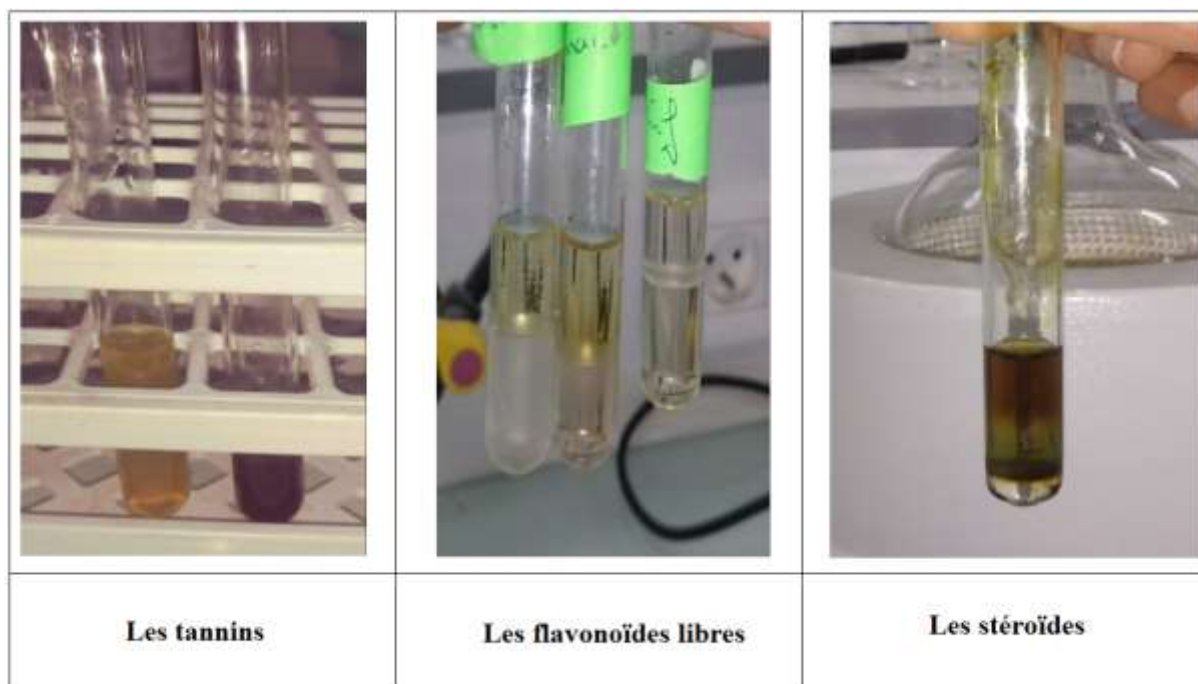
**Tableau 05** : Résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans les feuilles de *Fraxinus excelsior*.

Composés recherchés		Résultats	
<b>Alcaloïdes</b>		-	
<b>Tannins</b>	Globales	++	++
	Catéchiques	-	-
	Galliques	++	++
<b>Flavonoïdes</b>	Libres	++	++
	Anthocyanes	-	-
<b>Stéroïdes et triterpènes</b>		++	
<b>Saponosides</b>		-	
<b>Oses</b>		-	
<b>Mucilages</b>		-	

**Tableau 06** : Résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans les extraits de *Fraxinus excelsior*.

Composés recherchés		Résultats					
		EInf	EDéc	EMHMe	EMHEt	ESHMe	ESHEt
<b>Alcaloïdes</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Tannins</b>	Globales	++	++	++	++	++	++
	Catéchique	-	-	-	-	-	-
	Galliques	++	++	++	++	++	++
<b>Flavonoïdes</b>	Libres	+	+	+	+	+	+
	Anthocyane	-	-	-	-	-	-
<b>Stéroïdes</b>		++	++	++	++	++	++
<b>Saponosides</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Oses</b>		-	-	-	-	-	-
<b>Mucilages</b>		-	-	-	-	-	-

(-) Résultat négatif et (+) Résultat positif



**Figure 13** : Les images de résultats des réactions de caractérisation des principaux métabolites secondaires contenus dans les extraits de *Fraxinus excelsior*.

Les résultats révèlent la présence des plusieurs métabolites secondaires. Les tanins, les stéroïdes et les flavonoïdes sont présents avec une intensité importante dans les différents extraits. Par contre, on observe l'absence d'alcaloïdes, des saponosides, des oses et des mucilages.

### 3. La chromatographie sur couche mince (CCM)

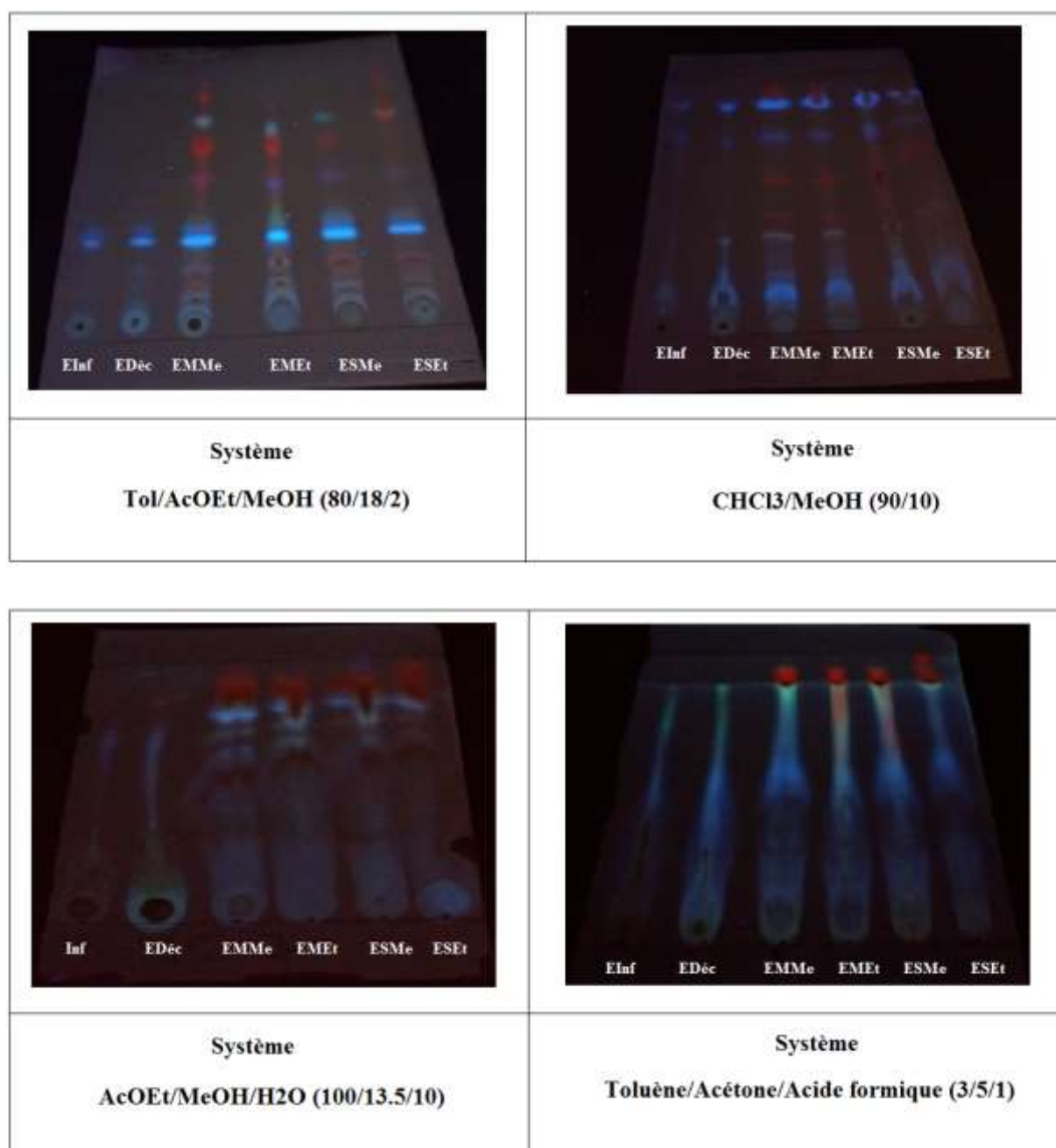
Les résultats d'analyse des différents extraits obtenus à partir les feuilles de *Fraxinus excelsior* par CCM sont présentées sur les figures 14.

Les systèmes de solvants utilisés ont permis de séparer plusieurs composés dans les extraits (tableau 07). Il s'agit des informations sur les rapports frontaux des constituants, leur comportement à la lumière UV (365 nm).

L'examen sous lumière ultra-violette fournit des informations très importantes sur la structure des molécules. Il apporte des indications particulières concernant les substitutions. Le tableau suivant résume les relations existant entre la structure d'un composé flavonique et sa fluorescence sous UV.

Tableau 07 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits.

Extrait	Système 1 Tol/AcOEt/Me (80/18/2)		Système 2 CHCl <sub>3</sub> /MeOH (90/10)		Système 3 AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O (100/13.5/10)		Système 4 Tol/Acétone/ Acide formique (3/5/1)	
	R <sub>f</sub>	Couleur	R <sub>f</sub>	Couleur	R <sub>f</sub>	Couleur	R <sub>f</sub>	Couleur
EInf	0.3	Bleu	0.88	Bleu				
EDéc	0.083 0.3 0.33	Bleu	0.15 0.29 0.88	Bleu Bleu Verte	0.31 0.8	Bleu Verte		
EMHMe	0.083 0.3 0.53 0.76 0.86 0.93	Verte Rouge Bleu Verte Rouge Bleu	0.11 0.3 0.52 0.72 0.9	Bleu Bleu Bleu Rouge Verte	0.43 0.7 0.81 0.93	Bleu Bleu Rouge verte	0.28 0.46 0.6 0.98	Bleu Rouge Bleu Verte
EMHEt	0.3 0.33 0.53 0.66 0.76	Verte Rouge Bleu Verte Rouge	0.11 0.3 0.52 0.72 0.9	Bleu Bleu Bleu Rouge Verte	0.43 0.61 0.7 0.81	Bleu Bleu Rouge Verte	0.28 0.46 0.6 0.98	Bleu Rouge Bleu Verte
ESMe	0.083 0.3 0.53 0.66 0.76	Verte Rouge Bleu Rouge Rouge	0.11 0.3 0.52 0.72 0.9	Bleu Verte Verte Rouge Verte	0.43 0.61 0.7 0.81	Bleu Bleu Rouge Verte	0.28 0.46 0.6 0.98	Bleu Rouge Bleu Verte
ESEt	0.3 0.53 0.66 0.76 0.9	Rouge Bleu Rouge Rouge Verte	0.3 0.46 0.62 0.78 0.9	Bleu Bleu Verte Rouge Verte <sup>37</sup>	0.7 0.93	Bleu Verte	0.46 0.6 0.78 0.98 5	Bleu Rouge Bleu Verte Verte



**Figure 14** : Chromatogrammes observés sous UV à 365 nm des extraits.

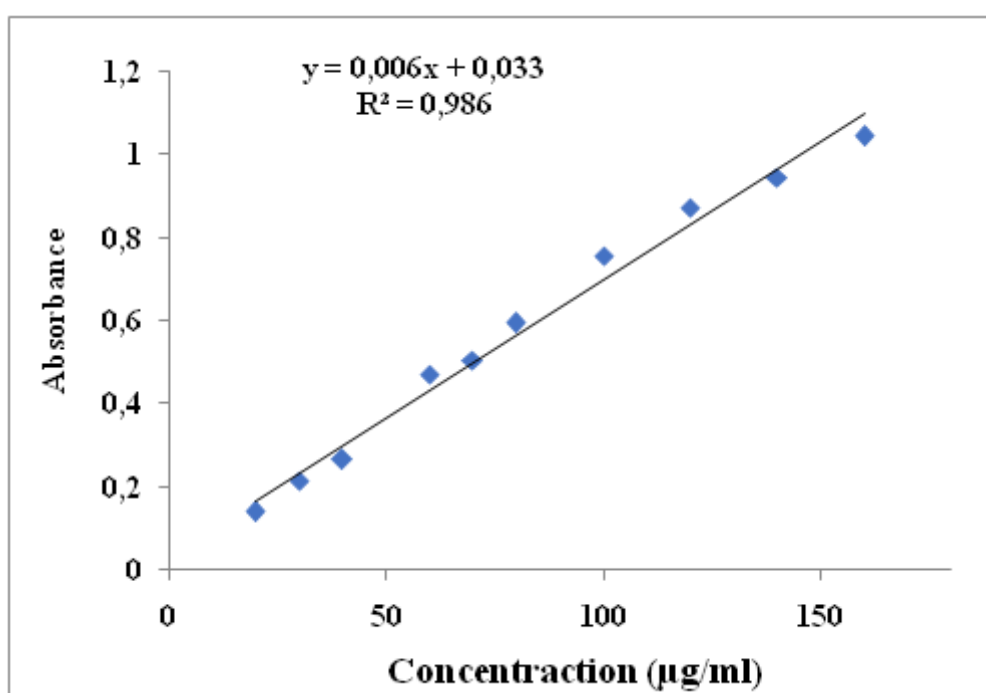
Les extraits ont montré après observation à l'UV (366 nm) une richesse en constituants chimiques. Dans ces extraits, de nombreux flavonoïdes ont été détectés. , l'analyse montre plusieurs tâches, de différentes couleurs, à des Rf différents, la majorité des spots apparaissent en vert indique la présence de chalcone, le rouge indique l'anthocyanidine-3-glucoside et le bleu indique le flavone.

#### 4. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

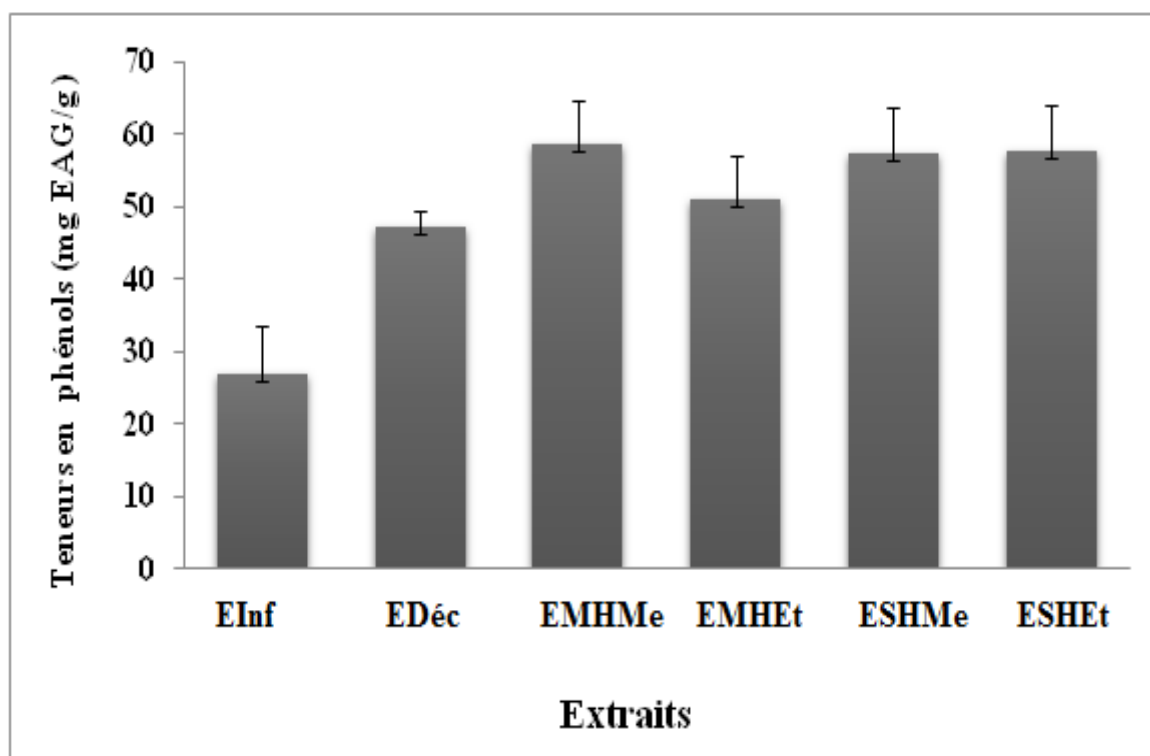
Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (10-140 µg/ml).

La gamme de concentrations d'acide gallique utilisée pour le dosage des polyphénols et les absorbances respectives mesurées à 765nm est représentée dans la figure suivante.



**Figure 15 :** Courbe étalonnage de l'acide gallique.

La sélection du solvant d'extraction est une étape fondamentale dans l'optimisation des conditions d'extraction solide – liquide des antioxydants. Les solvants organiques sont les plus utilisés pour l'extraction. Afin d'extraire les polyphénols, trois types de solvants sont utilisés à savoir l'éthanol, méthanol et l'eau distillée. Les résultats obtenus, de l'effet de la nature du solvant, sur la teneur en polyphénols extraite les différents extraits préparés à partir des feuilles de *Fraxinus excelsior* sont représentés dans la figure 16.



**Figure 16 :** Teneurs en polyphénols pour différents extraits préparés à partir des feuilles de *Fraxinus excelsior*.

Les résultats décrits ci-dessus révèlent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant et de la méthode d'extraction sur les polyphénols, dont la plus grande teneur, enregistrée par la méthode de soxhlet et la macération, qui présentent une forte sélectivité envers les composés polyphénoliques. De plus, les résultats montrent que la sélectivité d'extraction est presque similaire quelque soit le solvant utilisé, le meilleur rendement est enregistré par l'extrait hydrométhanolique qui est extraire par macération, l'extrait hydroéthanolique et hydrométhanolique extraire par la technique de soxhlet avec une teneur de 58.733, 57.533 et 57,366 mg EAG/g respectivement, suivis par l'extrait hydroéthanolique extraire par macération avec une teneur de 50,966 mg EAG/g.

Tandis que, le plus basse teneur est remarquée dans l'extrait de décoction (47.266 mg EAG/g) qui est significativement supérieure à celle de l'extrait d'infusion (26.833 mg EAG/g). L'augmentation de la température améliore l'extraction des polyphénols, en rendant les membranes cellulaires plus perméables, et augmente la solubilité et le coefficient de diffusion des composés à extraire. Elle diminue la viscosité du solvant ce qui facilite son

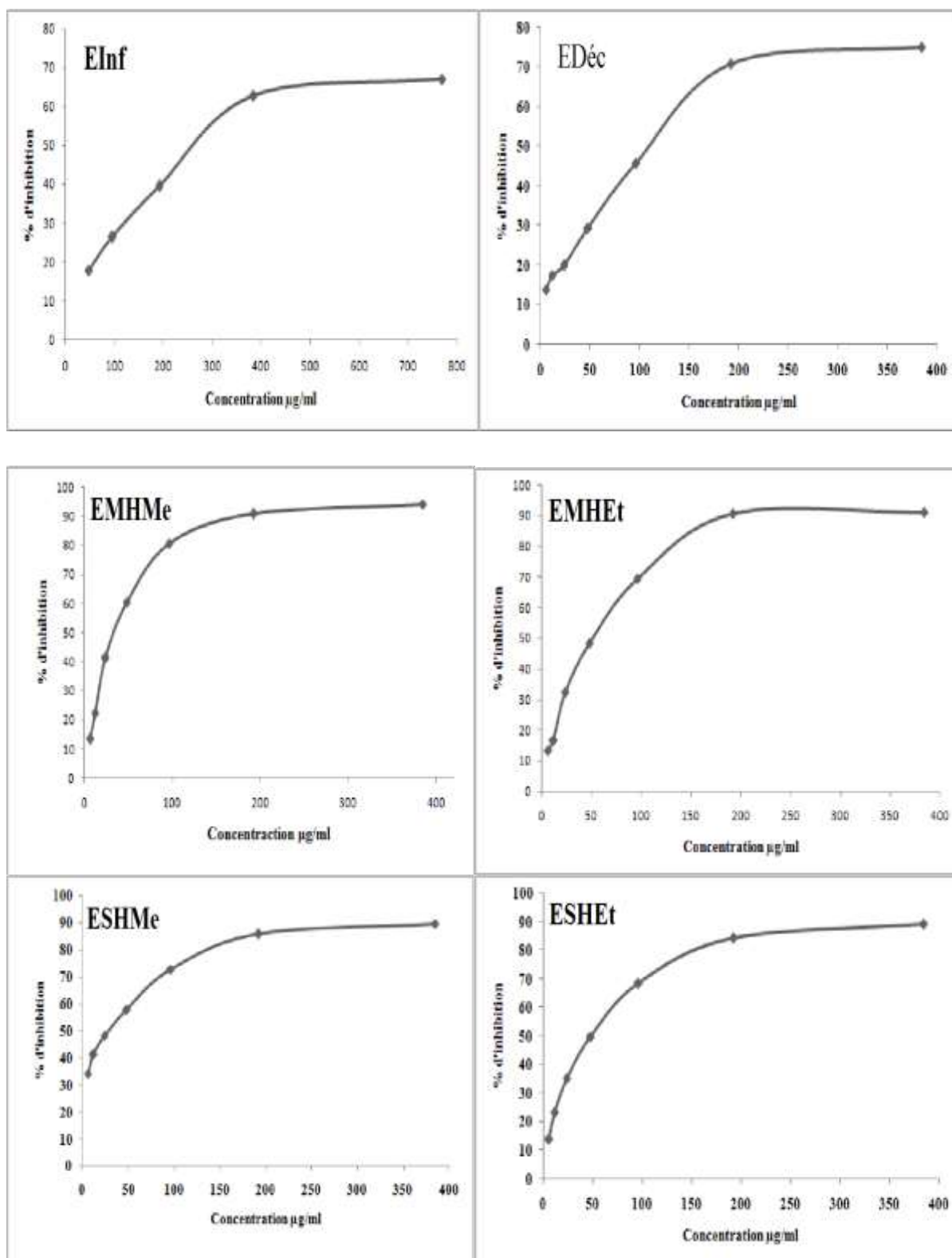
passage dans les substrats solides. Cependant, les températures excessives peuvent causer la dégradation des composés phénoliques, ou cela peut provoquer une diminution de la sélectivité de l'extraction, ce qui limite les températures d'extraction à un certain seuil [71].

Ces résultats révèlent aussi que les extraits hydrométhanolique sont plus riches que ceux des extraits aqueux. De nombreuses études montrent que le solvant hydroalcoolique est le solvant le plus utilisé pour une haute récupération de composés phénoliques [73] [74].

### **5. L'activité antioxydante par le radical 2,2'-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH)**

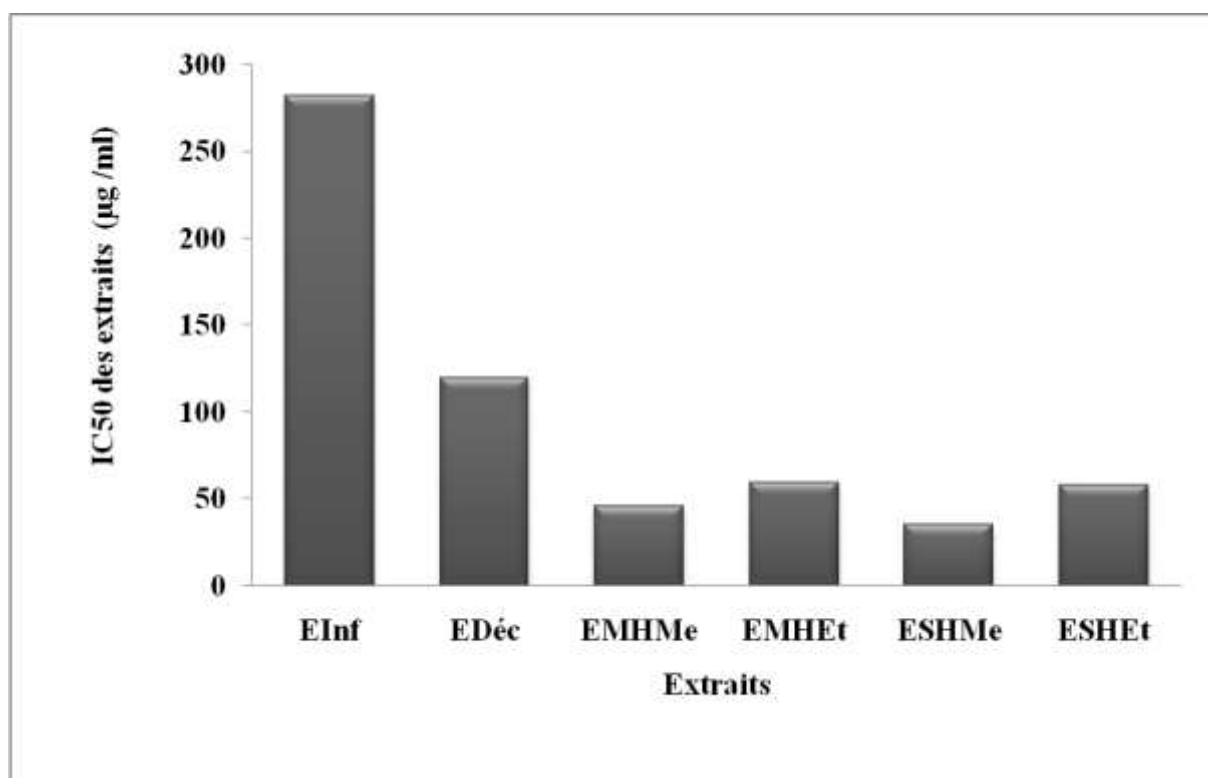
L'activité antioxydante des différents extraits vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical par les antioxydants donneurs d'hydrogène présents dans l'extrait qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 515 nm [67].

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents extraits. Cette courbe ayant une allure exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH· en sa forme non radicalaire.



**Figure 17 :** Les pourcentages d'inhibition de DPPH en fonction de la concentration des différents extraits.

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en IC<sub>50</sub>, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). Ces IC<sub>50</sub> sont déterminés graphiquement, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé. Les valeurs des IC<sub>50</sub> des différents extraits préparés à partir des feuilles de *Fraxinus excelsior* sont illustrées dans la figure 18.



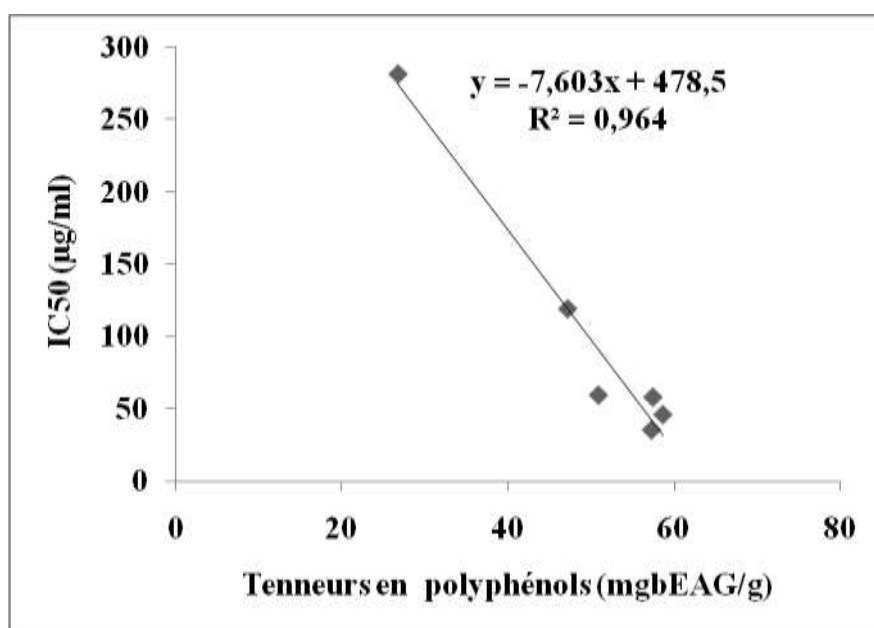
**Figure 18 :** Valeurs des IC<sub>50</sub> des différents extraits préparés à partir des feuilles de *Fraxinus excelsior*.

D'après les résultats, les extraits méthanoliques sont les extraits les plus actifs avec des IC<sub>50</sub> pour macération et soxelet de l'ordre de 35,39 et 46,005 µg/ml respectivement, suivie par les extraits éthanoliques avec des IC<sub>50</sub> pour macération et soxelet de l'ordre de 58,13 et 59,59 µg/ml respectivement. Les fractions aqueuses représentent les extraits les moins actifs avec des IC<sub>50</sub> de 119,31 µg/ml pour décoction et de l'ordre de 281,81 µg/ml pour infusion.

A des fins comparatives, quatre antioxydants standards sont utilisés, la rutine, la quercétine et l'acide gallique, ils ont montré une activité antiradicalaire puissante avec des  $IC_{50}$  de l'ordre de 4.25, 3.22 et 0.58  $\mu\text{g/ml}$  respectivement.

La comparaison de ces valeurs avec celles des antioxydants standards, montrent que tous les extraits testés s'avèrent moins actifs. Dont l'extrait le plus actif (EMMe) est 8 fois moins actif que la rutine, 11 fois que la quercétine et 61 fois que l'acide gallique, tandis que l'extrait le moins actif (EInf) est 66 fois moins actif que la rutine, 87 que la quercétine et 486 fois que l'acide gallique.

Afin de confirmer que l'activité antioxydante des extraits issue de leurs richesses en composés phénoliques, nous avons essayé de trouver une corrélation entre les valeurs d' $IC_{50}$  calculées par la méthode de DPPH de chaque extrait avec leur contenu en polyphénols (figure 19).



**Figure 19 :** Corrélation entre les valeurs d' $IC_{50}$  (test DPPH) et les teneurs en phénols totaux de différents extraits préparés.

L'étude a montré l'existence d'une corrélation forte entre les valeurs d' $IC_{50}$  du test DPPH et les teneurs en phénols avec  $R^2 = 0.964$ . D'après les résultats obtenus, on peut confirmer que l'activité antiradicalaire est liée à la concentration en produits phénoliques. En effet, les composés phénoliques sont reconnus comme des substances potentiellement

antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène, l'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur capacité de réduire les radicaux libres ( $R^{\bullet}$ ) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle. Cette réaction donne naissance au radical aroxyde ( $FLO^{\bullet}$ ) et à la molécule radicalaire rendu stable (RH), le  $FLO^{\bullet}$  subira par la suite un réarrangement structurale permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux aroxyde [75].

## 6. L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de *Fraxinus excelsior* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose ou méthode des disques vis-à-vis de deux souches bactériennes.

Les résultats de l'évaluation antibactérienne des extraits sont repris ci-dessous (tableau 08). Dans le tableau sont inclus les valeurs en (mm) zones ou diamètres d'inhibitions, représentant la grandeur du halo formé par les microorganismes inhibés par l'activité antibactérienne.

**Tableau 08** : les zones d'inhibition des extraits.

Souches bactériennes	Diamètre d'inhibition en mm			
	Inf	Déc	ESHMe	ESHEt
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	00	9	9	7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	00	8	9	9



**Figure 20** : L'activité antibactérienne des extraits de *Fraxinus excelsior* a vis-à-vis *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Nous avons observé que tous les extraits sont manifestés une activité modeste vis-à-vis les deux souches bactériennes. La plus forte activité a été obtenue avec l'extrait méthanolique avec une zone d'inhibition de 9 mm contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. D'autre part l'extrait d'infusion n'a aucun effet sur les deux bactéries.

# **CONCLUSION GENERALE**

### Conclusion générale

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'étude qualitative, quantitative et biologique des extraits aqueux et hydroalcooliques des feuilles de *Fraxinus excelsior*.

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la récupération des composés actifs. Elle dépend à la fois du solvant d'extraction et de la méthode d'extraction. Nous avons tenté, d'extraire les composés phénoliques totaux par extraction solide-liquide en utilisant trois solvants, choisis de manière à solubiliser un maximum de composés. Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondants dans notre plante nous a permis de calculer le rendement de chaque extrait, la détermination des rendements a montré une rentabilité importante en extraits hydroalcoolique.

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins et les stéroïdes, ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques. La présence des flavonoïdes dans nos extraits qui est mise en évidence par un essai de caractérisation en tube est confirmée par CCM, ces molécules sont considérées comme les composés antioxydants les plus actifs.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux dans les extraits analysés montre que tous les extraits sont les plus riches en ces métabolites.

Le dosage des composés phénoliques contenus dans les six extraits a révélé des teneurs considérables en polyphénols avec des quantités appréciables en flavonoïdes.

Le potentiel antiradicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de DPPH dont les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité, donc cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antibactérien, les résultats microbiologiques ont montré que les extraits de *Fraxinus excelsior* ont une activité faible sur les espèces bactériennes testées.

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus in-vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances de source naturelle biologiquement actives, il serait intéressant de compléter ce travail par :

- La purification et l'identification des principes actifs ;
- Tester d'autres activités biologiques comme l'activité antidiabétique et anti-inflammatoire, immunomodulatrices en vue de confirmer les utilisations traditionnelles des deux plantes.

## **Références bibliographiques**

### Références bibliographiques

- [1] Coulerie P. Étude phytochimique et pharmacologique de plantes de Nouvelle-Calédonie à potentialités anti-dengue, Thèse de doctorat. Université Nouvelle Calédonie. (2012). P. 20.
- [2] Teixeira da Silva JA. Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of Biotechnology*. (2004). 3 (12):706-720.
- [3] Justin NK, Edmond S, Ally RM and Xin H. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (2014). 2:377-392.
- [4] Farombi EO .African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *African Journal of Biotechnology*, (2003). 2 (12):662-671.
- [5] Nelly CB. Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie. Thèse Doctorat en pharmacie. Université Toulouse III. (2013). P.147-148.
- [6] Visen P, Saraswat B, Visen A, Roller M, Bily A, Mermet C, He K, Bai N, Lemaire B, LafayS, Ibarra A. Acute effects of *Fraxinus excelsior* L. seed extract on postprandial glycemia and insulin secretion on healthy volunteers. *Journal of Ethnopharmacology* , (2009).126 :226–232.
- [7]Mdawar O. Les accrues de frêne (*Fraxinus excelsior* L.) à l'interface environnement/sylviculture dans les Pyrénées Centrales : distribution spatiale et croissance. Thèse Doctorat en pharmacie. Université Toulouse III. (2009)P.11.
- [8] Pautasso M, Aas G, Queloz V, Holdenrieder O. European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback – A conservation biology challenge. *Biological Conservation*. (2013) 158:37–49.
- [9] Paul.S, Ferdinand. P, (2<sup>e</sup> tirage, juillet 2005). Guide des plantes médicinales ‘analyse, description et utilisation de 400 plantes, Ed office des delachaux et niestlé.(page123).
- [10] Kostova I, Iossifova T. Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia*. (2007) 78:85-106.
- [11] Heymonet C. Les plantes à visée anti inflammatoire utilisées en phytothérapie. Thèse Doctorat en pharmacie. Université lorraine, (2013). P.83.

- [12] Csupor D . Assessment report on *Fraxinus excelsior* L. or *Fraxinus angustifolia* Vahl, folium. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). European Medicines Agency. (2012). 1-16.
- [13] Bai N, He K, Roller M, Ching- Shu Lai CS, Shao X, Pan MH, Ho CT. Secoiridoid glucosides from *Fraxinus Excelsior* with effects on LPS- induced nitrite production in RAW 264.7 macrophages and human cancer cell lines, in: Africa natural plant products: Discoveries and challenges in chemistry. *Health and Nutrition Vol 2*, (2013).
- [14] Djarroumi A, Nacef M, 100 plantes médicinales d'Algérie, Edition Houma, Alger. p. 77.
- [15] Boudjouref M. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de Magister en Biochimie. Université Ferhat Abbes, Sétif. Algérie. (2011).p.99.
- [16] Newman DJ, Cragg GM. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* (75): 311-335(2012).
- [17] Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA et Stevens P. Botanique Systématique: une perspective phylogénétique. Ed 1: Deboeck. Bruxelles.(2002), P. 84.
- [18] Irchhaiya R, Kumar A, yadav A, Gupta N, Kumar S, Gupta N, Kumar S, Yadav V, Prakash A and Gurjar H. Metabilites in plants and its classification. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* (2015) 4(1):287-305.
- [19] Meltzer H.M. et Maltrud. Candetary falconoid influence the development of coronary heart disease. *scand. J. Nuth* ,(1997).
- [20] Hesse M. Alkaloids: Nature's Curse of Blessing? ; Ed: Wiley-Vch,(2002). P. 1-12.
- [21] Bouchery. N. Soins des leishmanioses dans le sud du Honduras, une alternative : *Clematis dioica*. Thèse de doctorat. Université de Lille 2,(2007).
- [22] Hanson JR.Natural products: the secondary metabolites. Ed. Royaume-Uni : Royal society of chemistry, Italy,(2003). p.137.

- [23] Baricevic D, Sosa S, Della LR, Tubaro A, Simonovska B, Krasna A, Zupancic A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. (2001).75:125–132.
- [24] Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2<sup>ème</sup> Ed, Tec & Doc. Lavoisier. Paris (1993).
- [25] William G, Hopkins M. Physiologie végétale. Traduction de la 2<sup>ème</sup> édition américaine par serge Rambour, Bibliothèque Nationale, (2003). (Paris): 268-273.
- [26] Shuang-Li X, Da-Bin H, Ni H and Anlin L. Preparation and biological activity of saponin from *Ophiopogon japonicus*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. (2012). 6(26):1964-1970.
- [27] Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. (2010).2(12):1231-1246.
- [28] Yao LH , Jiang YM , Shi J , Tomas-Barbereran FA , Datt N, Singanusong R and Chen SS. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*. (2004).59:113-122.
- [29] Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. (2000). 63:1035-1042.
- [30] Larousse-Bordas . Encyclopedia of Medicinal Plants (2nd Edition) Copyright © 1996, 2001 Dorling Kindersley Limited, Londres Text copyright © 1996, 2001 Andrew Chevallier, Edition originale en langue française(1997).
- [31] Balbino L. Santos, Mona N. Oliveira, Paulo L. C. Coelho, Bruno P.S. Pitanga and al . Flavonoids suppress human glioblastoma cell growth by inhibiting cell metabolism, migration, and by regulating extracellular matrix proteins and metalloproteinases expression. *Chem-Biol. Inter*. (2015). 242: 126-138.
- [32] Carocho . M, Ferreira. I.C.F.R, A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food. Chem. Toxicol*. (2013).51: 1-5.

- [33] Kamra DN, Agarwail N, Chaudhary LC. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. International Congress Series. (2006). (1293) : 156–163.
- [34] Makkar HPS. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research. (2003). (49) : 241-256.
- [35] Peronny S. La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI(Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. Discipline Eco- Ethologie,(2005).
- [36] Atefeibu E.S.I.Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibacterienne d'Acacia Nilotica Var Andesonii .Thèse de Doctorat, université cheikh Anta Diop de Dakar.(2002), p. 33.
- [37] Bruneton. J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3ème Ed Tec & Doc Lavoisier. Paris, (1997).
- [38] Song. J.H, Kim. S.K, Chang. K.W, Han. S.K, Yi. H.K, Jeon. J.G. In vitro inhibitory effects of Polygonum cuspidatum on bacterial viability and virulence factors of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus. Arch. Oral Biol. (2006). 5: 1131-1140.
- [39] Song. J.M, Lee. K.H, Seong. B.L. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. Antivir. Res. (2005). 68: 66-74.
- [40] Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole. (2005). 554-558.
- [41] Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, (2003). p. 317.
- [42] Favier, A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, (2003)108-115.
- [43] Gauche, E., Hausswirth, C. Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice. Science & Motricité. (2006). 58 : 43-66.

- [44] Gardès-Albert AM, Bonnefont DR, Abedinzadeh Z et Jore D. Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité Chimique*. (2003) **270**:91-95.
- [45] Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.*(2006). 64: 390-396.
- [46] Zadak Z, Hyspler R, Ticha A, Hronek M, Fikrova P, Rathouska J, Hrniciarikova D and Stetina R. Antioxidants and vitamins in clinical conditions. *Physiological Research*. (2009). **58**:13-17.
- [47] Baba. S.A, Malik. S.A. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *J.T.U Sci*. (2015). 9: 449-454
- [48] Aourousseau, B. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Prod. Anim.* (2002)15 (1): 67-82.
- [49] Van Antwerpen, P. Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles. (2006).
- [50] Koechlin-Ramonatxo. C. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr. Clin. Métab.* (2006). 20: 165-177.
- [51] Nauciel C. Bactériologie médicale, Masson(Ed).Paris. (2000).
- [52] Leclerc. H, Gaillard. J.L, Simonet. M. Microbiologie générale. La bactérie et le mode bactérien. Doin Editeurs. Paris. (1995).
- [53] Lullmann H et mohor k. Atlas de poche de pharmacologie. 3<sup>ème</sup> édition. flammarion France,(2003). P. 274.
- [54] Kaufmann S H E. Host response to intracellular pathogens. New York,(1997). P. 345.
- [55] Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. (2003). 66:1022-37.

- [56] Billing J and Sherman PW. Antimicrobial function of spices. *Quarterly Review of Biology.* (1998). 73: 49.
- [57] Bergogne-Berezin E and Dellamonica P. *Antibiothérapie en pratique clinique.* Ed. Masson, Paris, (1995). p. 486.
- [58] Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H and Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology.* (2000). 56 : 3-12.
- [59] Ulanowska K., Majchrzyk A., Moskot M., Jak\_\_bkiewicz-Banecka J. and W\_Âgrzyn G. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia,* (2007). 62: 132-135.
- [60] Essawi T and Srour M. Screening of some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal Of Ethnopharmacology.* (2000).70: 343-349.
- [61] Burt S. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in food a review . *Int.J.Food Microbiol.* (2004).94:223-253.
- [62].Diallo D, Sanog R, Yasambou H, Traoré A, Coulibaly K and Maïga A .Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana*Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *ComptesrendusChimie.* (2004).7:1073-1080.
- [63].Markham KR. *Techniques of Flavonoid Identification.* Academic Press. London (1982). P. 133.
- [64]. SofoworaA. Screening plants for bioactive agents. In: *Medicinal plants and traditional medicinal in Africa.* Second ed. Sprettrum Books Ltd, Sunshine House, Ibadan.Nigeria (1993).
- [65]. Trease. G.E, Evans. W.C .*Pharmacognosy.* 15 th Ed, Springer. Berlin, (2002).
- [66]. Lahouel M. Interaction flavonoides-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine . 2005.

- [67] Maisuthisakul P, Suttajit M and Pongsawatmmit R. Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some that indigenous plants. *Food Chemistry*. (2007). 100:1409-1418.
- [68] Boudjelal A . Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (Ajuga iva, Artemisia herba alba et Marrubium vulgare) de la région de M'Sila, Algérie. Thèse Doctorat. Université d'Annaba.(2012) P. 21.
- [69] Baghiani A, Ameni D, Boumerfeg S, Adjadj M, Djarmouni M, Cheref N, Khennouf S and Arrar L ,Studies of antioxidants and xanthine oxidase inhibitory potentials of root and aerial parts of medicinal plant *Capparis spinosa* L. *American Journal of the Medical Sciences* (2012).. 2:25-32.
- [70] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Performance Standards for Anti-Microbial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement. Wayne. PA. USA: National Committee for Clinical Laboratory Standard (2001). NCCLS. Document M100-S11.
- [71] Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., Musci, M. Spectrophotometric and coulometric Detection in the high-performance liquid chromatography of flavonoids and optimization of sample treatment for the determination of quercetin in orange juice. (2000).*Journal of ChromatographyA* 881, 449-460.
- [72] Xia EQ, Deng GF, Guo YJ and Li HB. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*. (2010).11:622-646.
- [73] Sahreen S, Khan MR and Khan RA. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*. (2010). 122:1205-1211.
- [74] Bouzid W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane M C and Ayachi A. Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de L'Aubepine Monogyne. *Lebanese Science Journal*. (2011).12(1):59-69.
- [75] Dhiman A, Nanda A and Ahmad S. A quest for staunch effects of flavonoids: Utopian protection against hepatic ailments. *Arabian Journal of Chemistry*. (2016). 9: S1813-S1823.