LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

ABTS : 2,2 azinobis- (acide-3-éthylebenzothiazoline-6-sulfonique)

ADN : Acide désoxyribonucléique

APGIII: Angiosperm Phylogeny Group

ATP: Adenosine triphosphate

CI_{50} : concentration inhibitrice à 50%

D.O : densité optique

EOA : Espèces Oxygénées Actives

$FeCl_3$: chlorure ferrique

H_2SO_4 : acide sulfurique

HClO: acide hypochloreux

$K_2O_8S_2$: persulfate de potassium

LDL : lipoprotéines de faible densité

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NH_4OH : ammoniaque

$OH^{\bullet}$: Radical hydroxyle

PGx : glutathion peroxydase

RL : radicaux libres

SH : groupement sulfhydryle

SOD : superoxyde dismutase

T : transmittance

Vit C : vitamine C ou acide ascorbique

Vit E : vitamine E ou alpha-tocophérol

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Port de *Celtisintegrifolia* 6
Figure 2: Feuilles de *Celtisintegrifolia* 7
Figure 3: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro – oxydants 10
Figure 4: Attaque d'un hydrogène du désoxyribose de l'ADN par le radical hydroxyle. 11
Figure 5: Structure de la β-carotène. 19
Figure 6: Structures de quelques flavonoïdes. 20
Figure 7: Structure de l'acide chlorogénique 21
Figure 8: Schéma d'obtention de l'extrait éthanolique des feuilles de *C. integrifolia* et de ses fractions. 26
Figure 9: Action de l'extrait éthanolique des feuilles de *C. integrifolia* sur l'ABTS. 32
Figure 10: Action de la fraction chloroformique de *Celtis integrifolia* sur l'ABTS. 33
Figure 11: Action de la fraction d'acétate d'éthyle de *Celtis integrifolia* sur l'ABTS. 34
Figure 12: Action de la fraction aqueuse de *Celtis integrifolia* sur l'ABTS 35
Figure 13: Action de l'acide ascorbique sur l'ABTS. 36
Figure 14: Action de l'extrait et ses fractions sur l'ABTS. 36

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Principaux radicaux libres. 10
Tableau II: Rendements de l'extraction et des différentes fractions. 30
Tableau III : Groupes phytochimiques identifiés dans l'extrait et ses fractions. 31
Tableau IV: Valeurs des concentrations d'inhibition à 50% de l'extrait éthanolique, de ses fractions et de l'acide ascorbique..... 37

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 4
CHAPITRE I : PRESENTATION DE *CELTISINTEGRIFOLIA*LAM 5
(*ULMACEAE*) 5
I-1 ETUDE TAXONOMIQUE 5
I-1-1 Position systématique 5
I-1-2 Description botanique 5
I-1-2 Synonyme et noms vernaculaires 7
I-2 HABITAT ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE 8
I.3 Usages 8
I.3.1 Pharmacopée traditionnelle 8
I.3.3 Usages domestiques et artisanaux 9
CHAPITRE II : RAPPELS SUR LES RADICAUX LIBRES 9
II-1TOXICITE DES RADICAUX LIBRES 9
II-1-1 Action sur les acides nucléiques 11
II-1-2 Action sur les protéines 11
II-1-3 Action sur les lipides 12
II-2 IMPLICATION DU STRESS OXYDANT DANS LES PATHOLOGIES 12
II-2-1 Stress oxydant et athérosclérose 13
II-2-2 Stress oxydant et cancer 13
II-2-3 Stress oxydant et diabète 13
II-3 SYSTEMES ANTIOXYDANTS 14
II-3-1 Antioxydants endogènes 14
II-3-1-1 Systèmes enzymatiques 14
II-3-1-2 Systèmes non-enzymatiques 15
II-3-2 Antioxydants exogènes 17
II-3-2-1 Les vitamines 18
II-3-2-2 Les oligo-éléments 18

II-3-2-3 Les caroténoïdes 19
II-3-2-4 Les polyphénols 20
II-4 : PRINCIPE DE LA METHODE ABTS 22
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE 23
CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES 24
I-1 MATERIEL ET REACTIFS 24
I-1-1 Matériel végétal 24
I-1-2 Matériel de laboratoire 24
I-1-3 Les réactifs 25
I-2 METHODES D'ETUDE 25
I-2-1 Extraction 25
I-2-2Fractionnement 25
I-2-3 Screening chimique 27
I-2-4 Test ABTS 28
CHAPITRE II : RESULTATS 30
II.1. RENDEMENT 30
II.2 SCREENING CHIMIQUE 31
II.3 ACTIVITE ANTIOXYDANTE 32
II.3.1. Pourcentages d'inhibition 32
II.3.2. Concentration inhibitrice 50% 37
CHAPITRE III : DISCUSSION 38
III.1.EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT 38
III.2. SCREENING CHIMIQUE 38
III.3 ACTIVITE ANTIOXYDANTE 39
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 40
ANNEXES 40

INTRODUCTION

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours thérapeutique de nos ancêtres. Malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales ne furent jamais totalement abandonnées. Les hommes ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante cette pratique.

Ainsi, pour parvenir à une amélioration de l'utilisation de plantes médicinales, plusieurs investigations phytochimiques ont été faites afin d'apporter une justification scientifique quant à l'utilisation traditionnelle de ces espèces. Ces plantes représentent une source de métabolites secondaires biologiquement actifs.

De nos jours, le stress oxydant est décrit comme un facteur étiologique crucial impliqué dans diverses maladies chroniques humaines. Il correspond à un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des espèces réactives de l'oxygène et ceux qui sont responsable de leur contrôle et élimination.

Plusieurs plantes se sont révélées actives sur le stress oxydant qui est l'œuvre des radicaux libres. Ainsi, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre du jour.

Cependant, les radicaux libres oxygénés sont des molécules non appariées issues de l'oxygène. La formation des radicaux libres dérivés de l'oxygène est un processus normal dans les systèmes de respiration aérobie. Le stress oxydatif contribue à l'apparition de nombreuses pathologies telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires et les pathologies dégénératives du système nerveux **(Baabs, 1992 ; Aruoma et al.., 1998).**

C’est là où réside tout l’intérêt de notre étude qui porte sur l’evaluation de l’activité antioxydante de l’extrait éthanolique des feuilles de *Celtis integrifolia* (Ulmacées).

Ce travail sera divisé en deux parties :

- Une partie bibliographique relative à des rappels sur *Celtis integrifolia*, sur les radicaux libres et les méthodes d’étude de l’activité antioxydante.
- Une deuxième partie qui porte sur le screening chimique et la recherche de l’activité antioxydante de l’extrait éthanolique des feuilles de *Celtis integrifolia*.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : PRESENTATION DE *CELTISINTEGRIFOLIA*LAM (*ULMACEAE*)

I-1 ETUDE TAXONOMIQUE

I-1-1 Position systématique

Selon la classification APGIII **(Angiosperm Phylogeny Group, 2009),** *Celtis integrifolia* appartient :

- Règne : *Plantea*
- Embranchement : *Spermatophytae*
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones vraies
- Sous classe : Fabidées
- Ordre : Rosales
- Famille : Ulmacées
- Genre : *Celtis*
- Espèce : *integrifolia*

I-1-2 Description botanique

Celtis integrifolia est un arbre de 15 à 20 m de haut, à fut très court et bas branchu atteignant 1,5 de diamètre. Les arbres âgés présentent des empattements à la base, à cime dense, plus ou moins sphérique avec des branches horizontales ou plus ou moins retombantes L'écorce est grisâtre, lisse puis s'écaillant en larges plaques minces et dures, plus ou moins rondes, à tranches granuleuses .La figure 1 illustre l'espèce *Celtis integrifolia.*

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Figure 1: Port de *Celtis integrifolia* **(Ly, 2016).**

Les feuilles, illustrées par la figure 2, sont alternes, plus ou moins coriaces sur les deux faces. Elles sont largement ovales, à sommet acuminé ou atténué en pointe, à base asymétrique, arrondie ou plus ou moins cordée. Le limbe est à bord généralement entier mais aussi denté sur les rejets.

Figure 2: Feuilles de *Celtis integrifolia* **(Ly, 2016).**

L'inflorescence est en panicule pubescente et ramifiée, disposée sur les rameaux à l'aisselle des feuilles. Elle est composée de nombreuses fleurs males sessiles disposées à la base et de quelques fleurs femelles pédicellées et disposées au sommet de 2 à 3 cm de longueur.

Le fruit est ovoïde à globuleux, à sommet atténué de 0,8 à 1,3 cm de longueur. Il est pubescent devenant glabre, portant au sommet la cicatrice du style fourchu. Le fruit est brun à maturité, contenant une graine dure et blanche noyée dans une pulpe sucrée **(Pharmacopée Africaine, 2013)**

I-1-2 Synonyme et noms vernaculaires

- ✓ **<u>Synonyme</u> :** *Celtis toka*
- ✓ **<u>Noms vernaculaires</u> :**
- Wolof : mboul
- Sérère : ingan, ngam
- Peulh : buley
- Diola : busingilit, d'Essyl
- Bambara : gawa

- Moré : farongo
- Hawsa : duki
- Zarma : Sé
- Mandingue : gava
- Français : micocoulier africain
- Anglais : African nettle tree (**Aubreville, 1950**).

I-2 HABITAT ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Cette plante est connue localement au Sénégal (Thiès, Tivaoune), son aire couvre le Soudan, la Cote d'Ivoire et le Nigeria. Elle parait peu fréquente au Cameroun et en Centre Afrique Elle est signalée plus à l'est du soudan, en Ouganda et même en Arabie.

I.3 Usages

I.3.1 Pharmacopée traditionnelle

Les racines sont utilisées dans le traitement des rhumatismes, de la paralysie, de la stérilité, de l'asthénie et de l'épilepsie. Les écorces soigneraient les rhumatismes.

Les feuilles seraient employées pour traiter la rougeole, les abcès, les mycoses et les œdèmes (Ly, 2016).

I.3.2 Utilisations alimentaires

Les feuilles crues ou cuites sont consommées en légumes. La pulpe des fruits est comestible. Les fruits sont surtout mangés par les bergers. Par ailleurs les gousses sont consommées par le bétail.

I.3.3 Usages domestiques et artisanaux

Le bois se prête à plusieurs ouvrages comme la confection de pirogues et de mortiers. Le bois, de couleur jaunâtre est facile à travailler mais peu résistant aux insectes.

CHAPITRE II : RAPPELS SUR LES RADICAUX LIBRES

II-1TOXICITE DES RADICAUX LIBRES

Tous les organismes aérobies sont strictement dépendants de l'oxydation phosphorylante mitochondriale pour la production d'adénosine triphosphate(ATP) et l'homéostasie énergétique. L'oxygène est ainsi strictement indispensable du fait de son potentiel oxydant très élevé, ce qui le rend parallèlement très dangereux pour toutes les molécules organiques **(Xavier Leverve, 2009).**Une faible partie de l'oxygène (2 à 5 %) est convertie en espèces oxygénées actives(EOA) particulièrement réactives. Le stress oxydant se définira donc comme un déséquilibre de la balance entre la formation d'EOR à caractère pro-oxydant et les antioxydants qui régulent leur production en faveur des premières, comme le montre la figure3 **(Shimizu, 2004).**

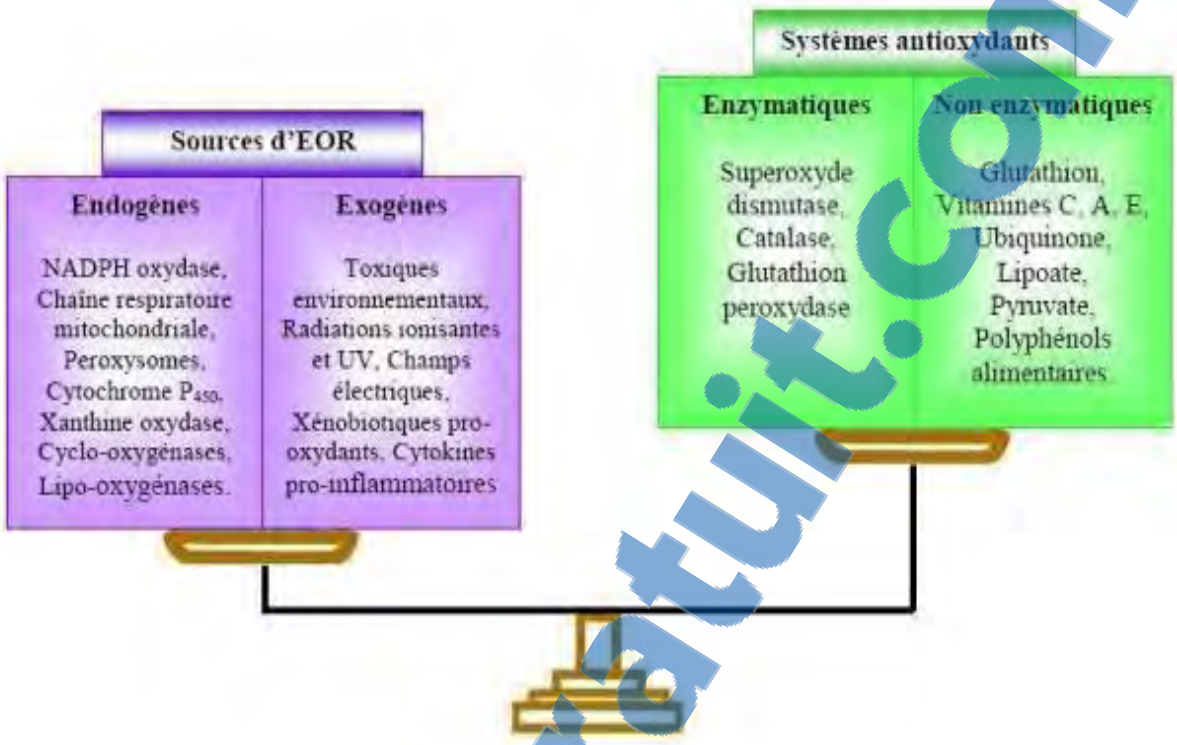


Figure 3: Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro – oxydants

Les principales espèces réactives sont consignées dans le tableau I avec leurs formules chimiques.

Tableau I: Principaux radicaux libres.

Nomenclature	**Formules chimiques**
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\cdot}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochloreux	HOCl
Oxygène singulet	$^1O_2$
Proxynitrite	ONOO-
Radical alcoxyle	$RO^{\cdot}$
Radical peroxyle	$ROO^{\cdot}$

Rapport-Gratuit.com

Ces radicaux libres (RL) pourront dès lors s'attaquer à toute série de substrats biologiques importants tels que les acides nucléiques, les protéines, les lipides etc.

II-1-1 Action sur les acides nucléiques (ADN)

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux libres. Sa dégradation par des radicaux libres peut mener à des mutations ou à la mort cellulaire. La molécule d'ADN est constituée de deux brins se faisant face et reliés par des liaisons hydrogènes. Ces liaisons faibles sont formées entre deux bases complémentaires (thymine-adénine ou cytosine guanine). Les principaux dommages radio-induits de la molécule d'ADN sont des ruptures de chaines ou bien des dégradations localisées. Les cassures simples ou double brins sont consécutives à des ruptures de liaisons sucre-phosphate **(Nadal,2009).**La première étape est, par exemple, la capture d'un hydrogène du désoxyribose en position C4' par le radical hydroxyle, illustrée par la figure 4.

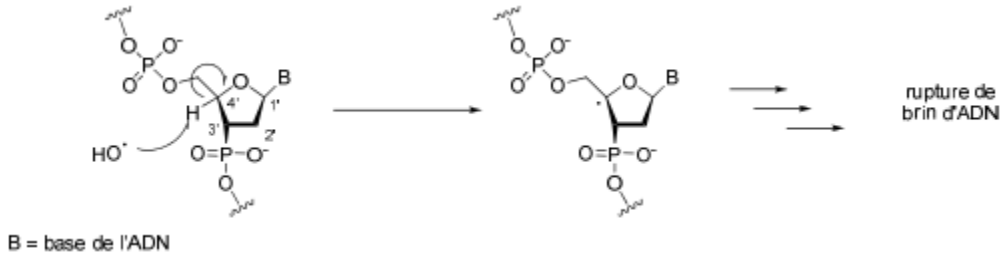


Figure 4: Attaque d'un hydrogène du désoxyribose de l'ADN par le radical hydroxyle.

II-1-2 Action sur les protéines

Les protéines apparaissent moins sensibles à l'attaque des radicaux libres que les acides gras polyinsaturés dans la mesure où elles ne présentent pas le risque de la réaction en chaine. Les dommages des radicaux libres sur les protéines peuvent entrainer la mort de la cellule si les effets d'une attaque s'accumulent

ou si les dommages sont concentrés sur un site particulier de certaines enzymes **(Guidet, 1992).** Ainsi les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire.

II-1-3 Action sur les lipides

Les lipides ont de nombreux rôles dans l'organisme : molécules énergétiques, réserves d'énergie, molécules signales, et font partie intégrante des membranes cellulaires. Parmi les lipides membranaires, les phospholipides sont les plus abondants. La partie hydrophobe des phospholipides est liée à la présence d'acides gras qui peuvent être saturés, mono insaturés, ou polyinsaturés. 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, un radical pour former le diène conjugué, oxydé en radical peroxyle **(Favier, 2003).**Cette réaction appelée peroxydation lipidique entraine une réaction en chaine, car le radical peroxyle formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué **(Esterbauer et al.., 1992).**

II-2 IMPLICATION DU STRESS OXYDANT DANS LES PATHOLOGIES

Le stress oxydant résulte d'une situation ou l'organisme ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Il est potentiellement impliqué dans la genèse de maladies plurifactorielles telles que les maladies cardio-vasculaires, le diabète, l'athérosclérose, l'obésité, le cancer et les maladies neurodégénératives.

II-2-1 Stress oxydant et athérosclérose

L'athérosclérose est une atteinte des grosses et moyennes artères par une accumulation de graisse dans la paroi artérielle. Cette accumulation de graisse forme les plaques d'athérome, qui sont composées de LDL oxydées. Suite à une réponse inflammatoire, les monocytes et les LDL pénètrent dans le sous endothélium vasculaire et les radicaux libres oxydent les LDL. Les LDL oxydées sont captées par les macrophages (monocytes activés), qui se transforment en cellules spumeuses. Celles-ci vont alors dégénérer et former une plaque. Les ERO participent également à la formation de la plaque fibreuse. Ils sont produits par des enzymes activées lors de ce processus (NADPH oxydase, NOS, xanthine oxydase). Ensuite, des éléments thrombogènes de la plaque sont libérés et activent les plaquettes circulantes. Il en résulte la formation d'un thrombus par cascade de coagulation **(Sorg, 2004).**

II-2-2 Stress oxydant et cancer

Les espèces réactives semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisqu'elles peuvent être responsables de mutation dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer **(Migliore et al, 2002).**

Les radicaux libres interviennent dans l'activation des pro- carcinogènes en carcinogènes, créant des lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs **(Favier, 2003).**

II-2-3 Stress oxydant et diabète

Lors de la pathologie diabétique, l'hyperglycémie constitue un stress oxydant **(Leverve, 2003).** Elle est responsable de l'augmentation de la glycolyse qui par accroissement du potentiel de membrane mitochondrial augmente la formation de radicaux. De plus elle inhibe la glycéraldéhyde-3 phosphate déshydrogénase

ce qui diminue la formation du cofacteur réduit $NADPH,H^+$ essentiel à la régulation de l'homéostasie redox **(Berger, 2006).**

II-3 SYSTEMES ANTIOXYDANTS

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydantes très efficace afin de diminuer la concentration des entités oxydantes dans l'organisme. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygéné, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat **(Halliwell and Gutteridge, 1990).**
L'organisme possède des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non-enzymatiques ainsi que des systèmes de protection exogènes **(Diattara, 2012).**

II-3-1 Antioxydants endogènes

II-3-1-1 Systèmes enzymatiques

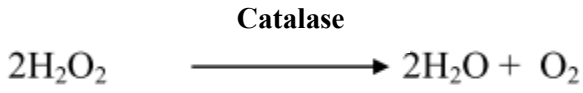
- **Superoxyde dismutase(SOD)**

La SOD est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l'anion Superoxyde en eau oxygénée et en oxygène moléculaire.
La réaction est la suivante : **(Wade, 2013)**

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

❖ **La catalase**

La catalase est une enzyme catalysant la dismutation du proxyde d'hydrogène selon la réaction suivante : **(Wade, 2013)**



❖ **La glutathion peroxydase (PGx)**

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de 4 sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine.

La GPx assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH et ROH. Cette enzyme lutte contre les radicaux libres qui, s'ils sont en trop grand nombre, vont attaquer et détruire l'ADN **(Lah, 2014).**

❖ **L'hème oxygénase**

L'hème oxygénase dégrade l'hème (pro-oxydant) en bilirubine qui est un antioxydant capable de prévenir l'oxydation des LDL **(Lah, 2014).**

II-3-1-2 Systèmes non-enzymatiques

Ces systèmes antioxydants agissent en complexant les métaux de transition comme le fer et le cuivre qui jouent un rôle important dans la peroxydation ou bien se comportent en piégeurs de radicaux libres.

❖ **La transferrine ou sidérophiline et la lactoferrine**

Elles exercent leurs effets protecteurs en complexant le fer, l'empêchant ainsi de catalyser la formation du $OH^{\bullet}$ **(Diop, 2013).**

❖ **La céruloplasmine**

Elle agit en transportant le cuivre et en neutralisant l'anion superoxyde. Elle catalyse également l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique sans libération de radicaux libres oxygénés intermédiaires **(Niang, 2014).**

❖ **L'albumine**

Elle se combine au cuivre et empêche la formation du radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$).

C'est également un piégeur de l'acide hypochloreux (HClO), un oxydant produit par la myéloperoxydase au cours de la phagocytose **(Niang, 2014).**

❖ **L'haptoglobine et l'hémopexine**

Elles auraient des propriétés antioxydantes par fixation de l'hémoglobine et de l'hème qui sont porteuses de fer qu'elles peuvent libérer et donc initier des réactions telles que la lipoperoxydation **(Guèye, 2010).**

❖ **La bilirubine**

Elle est capable de piéger les radicaux peroxyles, l'oxygène singulet. Elle protège ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires **(Diop, 2013)**

❖ **L'acide urique**

Il inhibe la lipoperoxydation en fixant le fer et le cuivre. C'est également un piégeur du radical peroxyde et de l'acide hypochloreux **(Niang, 2013).**

❖ **Les hormones**

Les hormones sexuelles femelles, par la présence d'un d'hydroxyle phénolique au niveau de leur structure chimique inhibe la peroxydation lipidique des LDL *in vitro* à des concentrations micro molaires **(Bousso, 2010).**

II-3-2 Antioxydants exogènes

Ces antioxydants sont constitués par toutes les substances d'origine alimentaire ou médicamenteuse capables d'inhiber l'action des radicaux libres.

II-3-2-1 Les vitamines

a) La vitamine E :

Est également appelé α-tocophérol. Il a été le plus étudié car il possède la plus grande biodisponibilité, ainsi qu'une capacité d'absorption et de métabolisation par le corps. Il protège les membranes de l'oxydation par réaction avec les radicaux lipidiques produits dans la réaction en chaine de la peroxydation lipidique **(Kumar et al, 2010).**

b) La vitamine C (ou acide ascorbique)

C'est un antioxydant puissant, et agit comme un piégeur d'ERO pour empêcher, ou au moins atténuer, les effets délétères causés par les ERO. Elle agit en synergie avec la vitamine E pour éliminer les radicaux libres régénère également la forme réduite de la vitamine E **(Foyer et Noctor, 2005).**

II-3-2-2 Les oligo-éléments

a)Le sélénium

Est un constituant de la glutathion peroxydase, enzyme qui joue un rôle intracellulaire antioxydant, voisin de celui de la vitamine E. Cet effet antioxydant est capital dans la détoxication des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire. Cet effet de détoxication serait responsable des effets anticancéreux et antivieillissement, attribués au sélénium **(Wolters et al, 2006).**

b) Le cuivre

Le cuivre est un oligo-élément qui participe au maintien des systèmes de défenses anti oxydantes dans l'organisme **(Bousso, 2010).**

c)Le zinc

Le zinc est un oligo-élément qui possède une double action anti-oxydante :

- Il entre en compétition avec le cuivre et le fer, qui sont des pro-oxydants à dose excessive.
- Il se lie à des molécules soufrées afin de protéger les membranes de l'attaque des radicaux libres **(Bousso, 2010).**

II-3-2-3 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments jaunes ou rouges, très répandus chez les végétaux. On en dénombre plus de 350 molécules.

Les caroténoïdes réagissent avec l'oxygène singulet, les radicaux peroxyles et al.koxyles en capturant les radicaux libres **(Krinsky, 1989).**

Parmi les caroténoïdes, on peut citer entre autres le β-carotène illustré par la figure 5, la phytoène, la leucopène, etc.

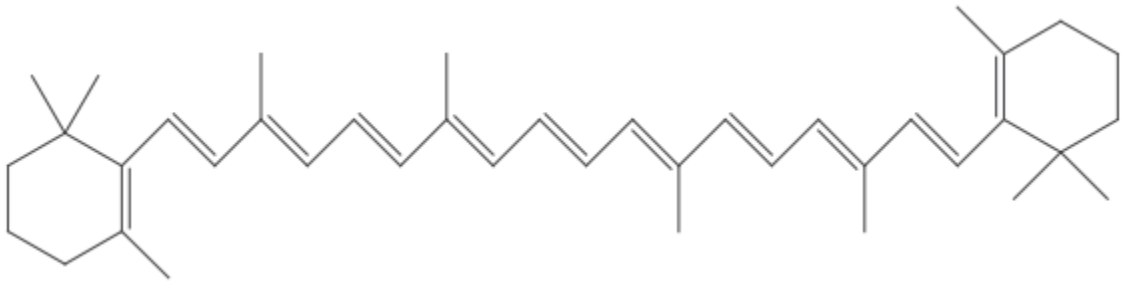


Figure 5: Structure du β-carotène.

II-3-2-4 Les polyphénols

a) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes agissent par deux mécanismes d'action :

- ✓ Soit par chélation des métaux (quercétine, catéchine)

- ✓ Soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes **(Madhavi *et al.*, 1996).**La figure 6 correspond à des structures de flavonoïdes.

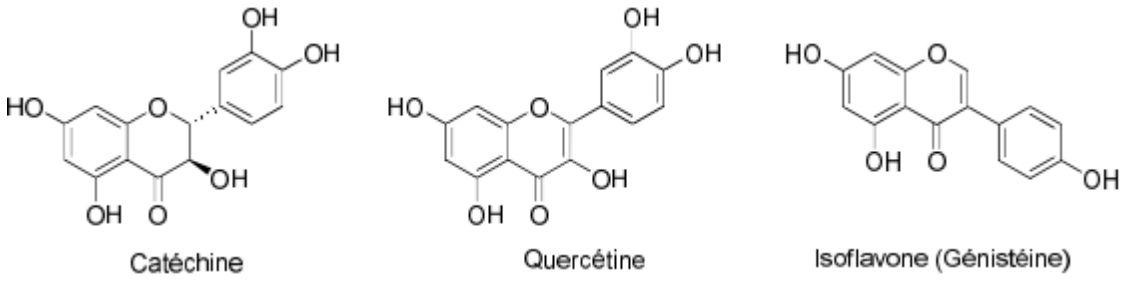


Figure 6: Structures de quelques flavonoïdes.

b) Les acides phénoliques

Les composés possédant une activité antioxydante sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique dont la structure est illustrée par la figure 7**(Bossokpi, 2002).**

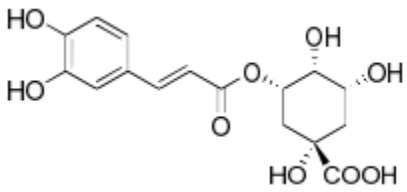


Figure 7: Structure de l'acide chlorogénique

c) Les tanins

Les tanins inhibent la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes mais aussi l'oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate. Lors de la peroxydation les tannins donnent des protons face aux radicaux libres, et ainsi que des radicaux tanniques stables. Ce qui permet de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique **(Mogode, 2004).**

II-4 : PRINCIPE DE LA METHODE ABTS

L'activité anti- radicalaire est basée sur la décoloration (mesurée à 734 nm) d'un cation radicalaire stable, ABTS°+ (2,2'- azinobis- (acide 3- ethylenzothiazoline- 6- sulfonique)) en ABTS, en présence de composés antioxydants. Cette méthode est encore appelée (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity).

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I-1 MATERIEL ET REACTIFS

I-1-1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de ***Celtis integrifolia***de la famille des Ulmacées. Ces feuilles ont été récoltées en Août 2015 dans la commune de Fandéne (région de Thiès).

Ensuite, elles ont été identifiées au laboratoire de Pharmacognosie et de Botanique de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (UCAD). La drogue végétale a été séchée pendant une semaine dans un endroit aéré dudit laboratoire, puis, elle a été réduite en une poudre fine.

I-1-2 Matériel de laboratoire

- Etuve Mamert
- Broyeur de marque « Babenberg OHG Duisburg » ;
- Spectrophotomètre UV/Vis (BTS-350) ;
- Evaporateur rotatif de marque « Buchi 461 » ;
- Centrifugeuse Rotofixe 32A ;
- Balance de précision ″Bel″ ;
- Ampoule à decanter ;
- Ballon de 1000 ml ;
- Erlenmeyer ;
- Eprouvette ;
- Verre de montre ;
- Spatule ;
- Micropipette.

I-1-3 Les réactifs

- Réactif ABTS
- Réactif de Persulfate de potassium $K_2O_8S_2$
- Ethanol
- Eau distillée
- chlorure ferrique ($FeCl_3$) (Panreac) ;
- Ammoniac (NH_4OH)
- Anhydride acétique
- Acétate d'éthyle ;
- Chloroforme ;
- Acide sulfurique (H_2SO_4)

I-2 METHODES D'ETUDE

I-2-1 Extraction

Cent grammes (100) de poudre de feuilles de *Celtis integrifolia* sont portées à ébullition modérée sous reflux dans 1L d'éthanol à 96° pendant 30 minutes. Cette opération est effectuée à deux reprises. Les extraits sont ensuite réunis puis filtrés à chaud. Le filtrat est évaporé avec l'évaporateur rotatif afin d'obtenir un résidu sec. L'extrait sec obtenu est soumis à un fractionnement liquide-liquide (figure 8).

I-2-2Fractionnement

Le fractionnement de l'extrait sec éthanolique a été réalisé avec des solvants de polarité croissante. Ainsi l'extrait sec dissout dans 250 ml d'eau distillée est introduit dans une ampoule à décanter puis épuisée à trois reprises par 250ml de chloroforme. Les trois phases chloroformiques recueillies sont rassemblées et évaporées à sec constituant ainsi la fraction chloroformique (figure 8).

La phase aqueuse est soumise de nouveau à une extraction liquide-liquide avec de l'acétate d'éthyle dans les mêmes conditions que précédemment. Les phases d'acétate d'éthyle réunies et évaporées constituent la fraction d'acétate d'éthyle. La phase aqueuse résiduelle fournit après dessiccation la fraction aqueuse.

La figure 8 résume le procédé d'extraction et de fractionnement de l'extrait éthanolique des feuilles de *Celtis integrifolia.*

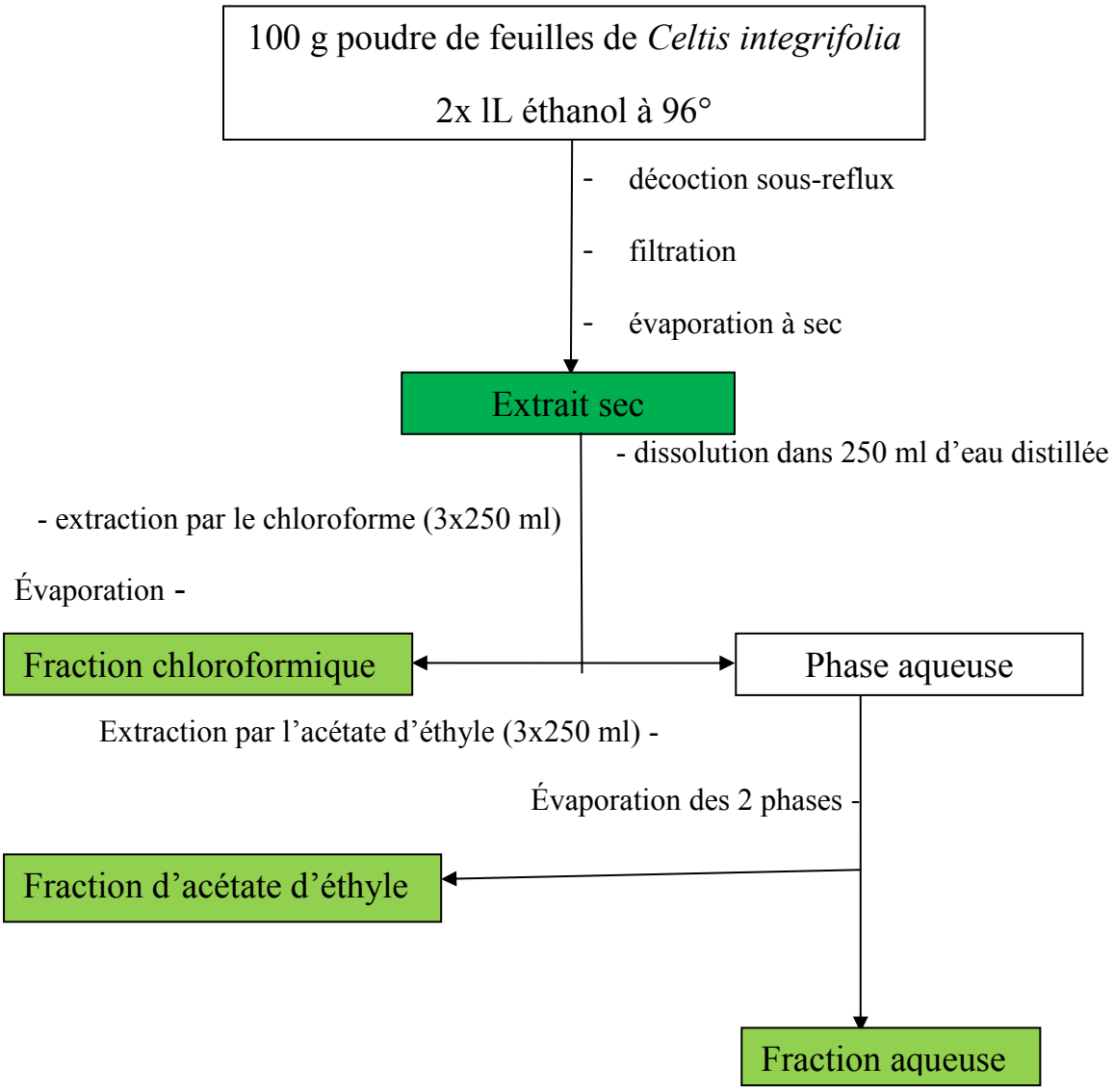


Figure 8: Schéma d'obtention de l'extrait éthanolique des feuilles de *C. integrifolia* et de ses fractions**.**

I-2-3 Screening chimique

L'étude phytochimique a pour but de rechercher les constituants chimiques des feuilles, afin d'avoir une idée sur la nature chimique des principes actifs responsables de l'effet anti radicalaire recherché. Cette recherche a été effectuée, en utilisant les méthodes classiques d'identification des grandes familles chimiques. Les groupes phytochimiques antérieurement signalés dans la composition chimique des feuilles sont ciblés **(Ly, 2016).**

a) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes donnent des colorations variées avec des solutions diluées de $FeCl_3$ du fait de la présence des fonctions phénoliques dans leurs génines.

A 1ml d'extrait éthanolique est ajouté 2 à 3 gouttes d'une solution diluée de $FeCl_3$ à 10%. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence de flavonoïdes. Cette même opération est faite avec les phases aqueuse, chloroformique et acétate d'éthyle.

b) Les coumarines

Environ 3 ml d'extrait organique sont évaporés à sec dans une capsule en porcelaine. Le résidu est dissout dans de l'eau chaude. Après refroidissement, la solution est divisée en deux tubes :

Le tube 1 constitue le témoin et ne contient que la solution aqueuse. Dans le tube 2 contenant l'extrait est ajouté 0,5 ml d'ammoniaque (NH_4OH). L'apparition d'une fluorescence intense bleu-verdâtre ou violet sous lumière UV montre la présence de coumarines et dérivés **(Bassène, 2012).**

c) Les stérols

Les stérols sont généralement des triterpènes ayant perdu au moins trois groupements méthyles. Ces composés sont mis en évidence par la réaction de Liebermann effectuée sur un extrait, en milieu chloroformique anhydre.

Environ 10 ml d'un extrait organique sont évaporés à sec dans une capsule en porcelaine. Le résidu est dissout dans 0,5 ml chloroforme et la solution est

ensuite transférée dans un tube à essais à l'aide d'une pipette, 1 à 2 ml d'acide sulfurique concentrée sont déposés délicatement sur le haut du tube à essais. A la zone de séparation des deux liquides, un anneau rouge-brun ou violet se forme. Le liquide supérieur devient gris, bleu-verdâtre ou violet en cas de présence de stérols ou de triterpènes **(Bassène, 2012).**

I-2-4 Test ABTS

I-2-4-1 Protocole opératoire

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode décrite par Bassène (2012). Le radical cation $ABTS^{\bullet+}$ est régénéré en mélangeant 50 ml d'une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) avec 50 ml de persulfate de potassium (2,5 mM). Le mélange est gardé à l'obscurité à la température ambiante pendant 12 heures avant usage. Le mélange est dilué ensuite avec de l'éthanol pour donner une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

Puis, dans une série de tubes à essais contenant 50 μl d'extrait à différentes concentrations, sont ajoutés 1,5 ml de la solution de ABTS. L'extrait éthanolique et ses fractions sont testés aux concentrations suivantes : 63-189-315-441-569 µg/ml. L'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence aux concentrations de 0,492-0,98-1,96-3,94-7,87 µg/ml.

La lecture de l'absorbance se fait au bout de 10 minutes (T_{10}) au spectrophotomètre à 734 nm en utilisant l'éthanol comme blanc.

I-2-4-2 Expressions des résultats

Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de partie testée (n=3). Les résultats sont d'abord exprimés en pourcentage d'inhibition (PI) de l'activité anti-radicalaire et en CI_{50} (Concentration en anti-radicalaire permettant de piéger 50% de radicaux libres) **(Brand-Williams *et al.*, 1995**).

✓ Calcul des pourcentages d'inhibition (PI)

Les pourcentages d'inhibition sont calculés suivant la formule suivante :

$$PI=100\ (A_0 - A_1)\ /A_0$$

A_0 = absorbance du DPPH ou de de l'ABTS

A_1 = absorbance après ajout de l'extrait à une concentration donnée après un temps donné.

✓ Détermination des CI_{50}

La détermination de CI_{50} a été effectuée grâce au logiciel Statgraphics Plus 5.0. La CI_{50} s'obtient à partir du graphe représentant les pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration (µg/ml). Cette valeur dépend de la concentration de DPPH ou d'ABTS utilisée pour le test **(Fall, 2013).**

I-2-4-3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées par une analyse normale de variance (ANOVA) utilisant le test de Fischer. La différence est considérée comme significative si $p < 0,05$ *versus* témoin négatif.

CHAPITRE II : RESULTATS

II.1. RENDEMENT

Le rendement exprime la quantité d'extrait sec obtenue par unité de poids sec de l'échantillon de départ **(Bassene, 2012).**

L'extraction éthanolique de 100g de poudre de feuilles de ***Celtis integrifolia*** a donné un extrait sec de 17g soit un rendement de 17%. Le fractionnement liquide-liquide des 17g d'extrait sec a permis d'avoir 5g de fraction chloroformique, 10g de fraction aqueuse et 1g de fraction d'acétate d'éthyle.

Le tableau II résume les rendements de l'extrait éthanolique et ceux des différentes fractions obtenus après épuisement successif de l'extrait éthanolique par des solvants de polarité croissante (chloroforme, acétate d'éthyle et eau)

Tableau II: Rendements de l'extrait et des différentes fractions.

	Poids secs (g)	**Rendement 1 en %**	**Rendement2 en%**
Extrait éthanolique	17	17	----------
Fraction chloroformique	5	-	29,41
Fraction d'acétate d'éthyle	1	-	5,88
Fraction aqueuse	10	-	58,82

Rendement 1 : par rapport aux 100 g de poudre des feuilles.

Rendement 2 : par rapport au poids de l'extrait éthanolique sec (17g).

Le tableau nous montre les rendements des fractions chloroformique, acétate d'éthyle et aqueuse par rapport au poids de l'extrait qui sont respectivement de 29,41 ; 5,88 et 58,82%.

II.2 SCREENING CHIMIQUE

Les réactions de caractérisation effectuées sur l'extrait éthanolique et ses différentes fractions ont révélé la présence de trois (3) groupes de métabolites secondaires selon le tableau III

- Les flavonoïdes
- Les stérols et triterpenes
- Les coumarines

Tableau III: Groupes phytochimiques identifiés dans l'extrait et ses fractions.

Métabolites Secondaires	Extrait total	Fraction chloroformique	Fraction d'acétate d'éthyle	Fraction aqueuse
Flavonoïdes	+	-	+	+
Stérols	+	+	+	-
Coumarines	+	+	+	-

+: Présence - : Absence

Le tableau III montre que les flavonoïdes sont présents dans l'extrait total et dans les fractions d'acétate d'éthyle et aqueuse. Ils n'ont pas été décelés dans la fraction chloroformique.

Les stérols et les coumarines ont la même répartition au sein des fractions. En effet, ils sont présents dans l'extrait éthanolique et les fractions chloroformique et d'acétate d'éthyle. Ils sont absents de la fraction aqueuse.

II.3 ACTIVITE ANTIOXYDANTE

II.3.1. Pourcentages d'inhibition

✓ Extrait total

A toutes les concentrations testées, l'extrait éthanolique des feuilles de *Celtis integrifolia* inhibe significativement l'ABTS comme l'atteste la figure 9 ($p < 0,005$ *versus* témoin négatif).

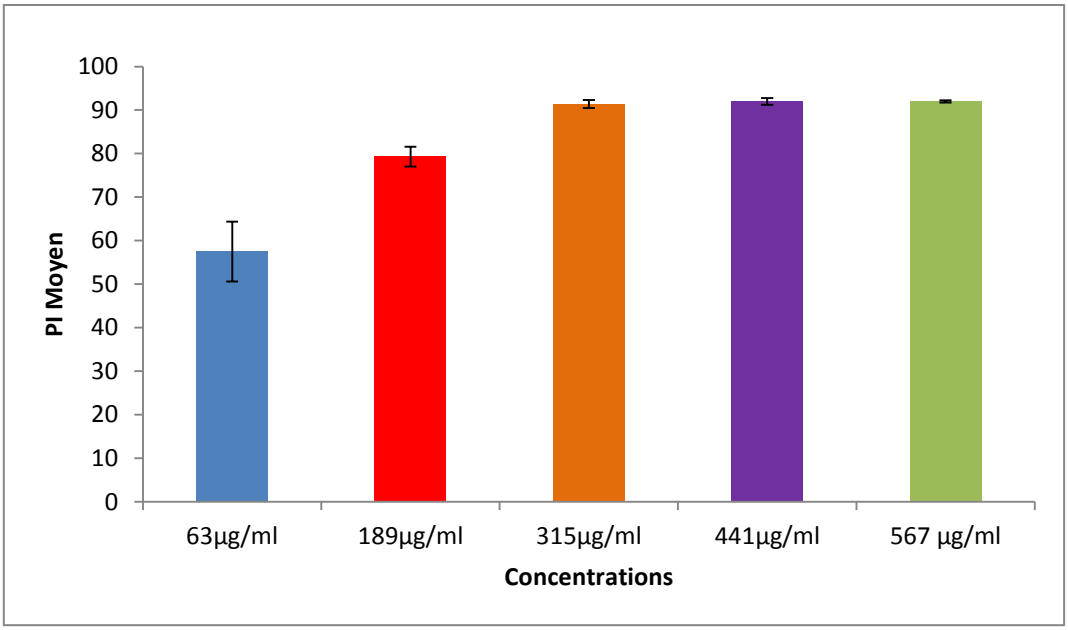


Figure 9: Action de l'extrait éthanolique des feuilles de *C. integrifolia* sur l'ABTS.

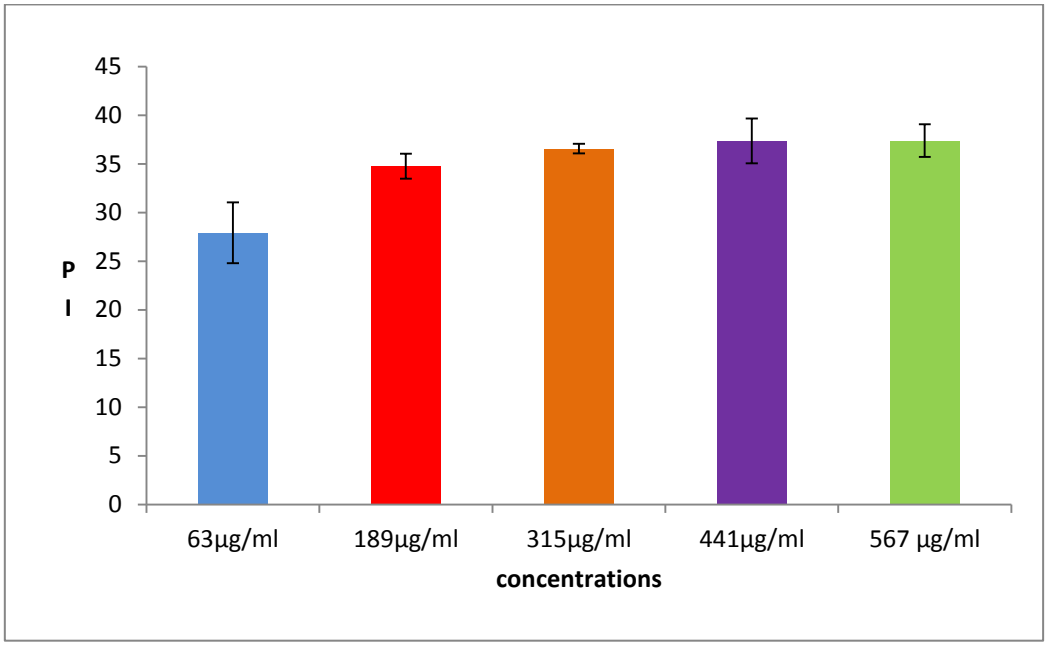
A une concentration de 63 µg/ml, l'extrait présente un pourcentage d'inhibition de 54,47% ±6,86. La plus forte activité est notée avec les concentrations de 441 et 567µg/ml qui ont des PI respectifs de 91,67±0,76% et 91,76±0,24%.

Les analyses statistiques montrent des différences significatives entre les effets des différentes concentrations testées ($p < 0,005$).

✓ Fraction chloroformique

A toutes les concentrations testées, la fraction chloroformique de *Celtis integrifolia* inhibe de manière significative l'ABTS ($p<0,05$ *versus* témoin négatif) comme l'atteste la figure10.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



* : p<0,05 versus témoins négatif.

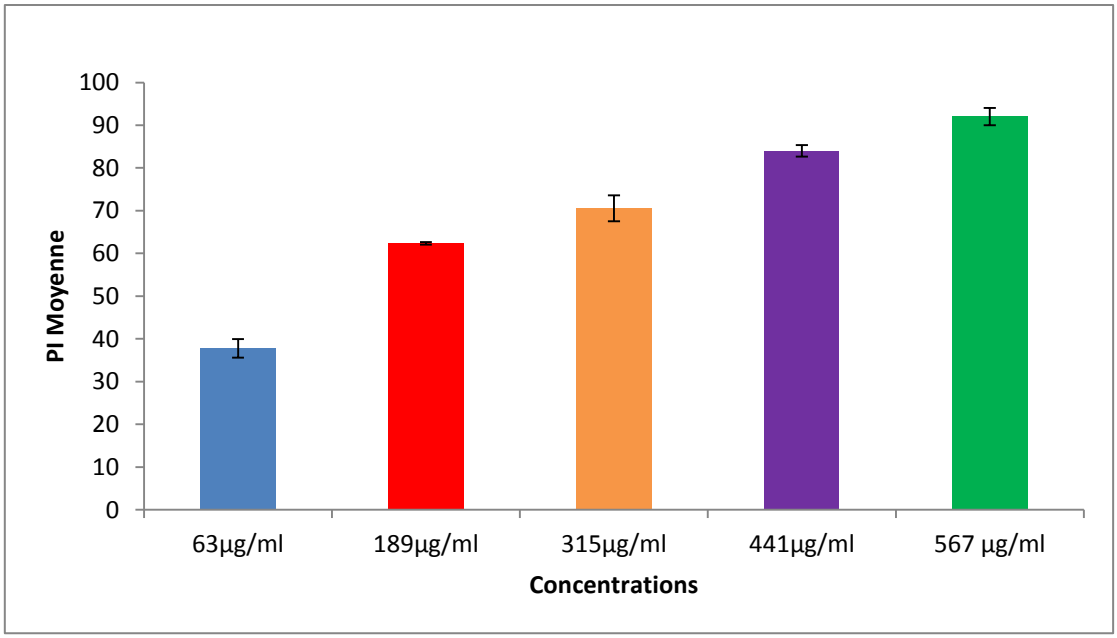
Figure 10: Action de la fraction chloroformique de *Celtis integrifolia* sur l'ABTS.

A la concentration de 63 µg/ml, la fraction chloroformique présente un PI de 27,92% ±3,12%. A 315 µg /ml, le PI obtenu est de 36,59% ±0,50%.

La plus forte activité est obtenue avec les concentrations de 441 µg/ml et 567 µg/ml qui présentent respectivement un PI de 37,36%±2,30 et 37,40%±1,68.

- ✓ **Fraction d'acétate d'éthyle**

La fraction d'acétate d'éthyle des feuilles de *Celtis integrifolia* inhibe significativement l'ABTS de manière dose-dépendante à toutes les concentrations testées comme le montre la figure 11 (p<0,05 *versus* témoin négatif).



* : p<0,05 versus témoin négatif.

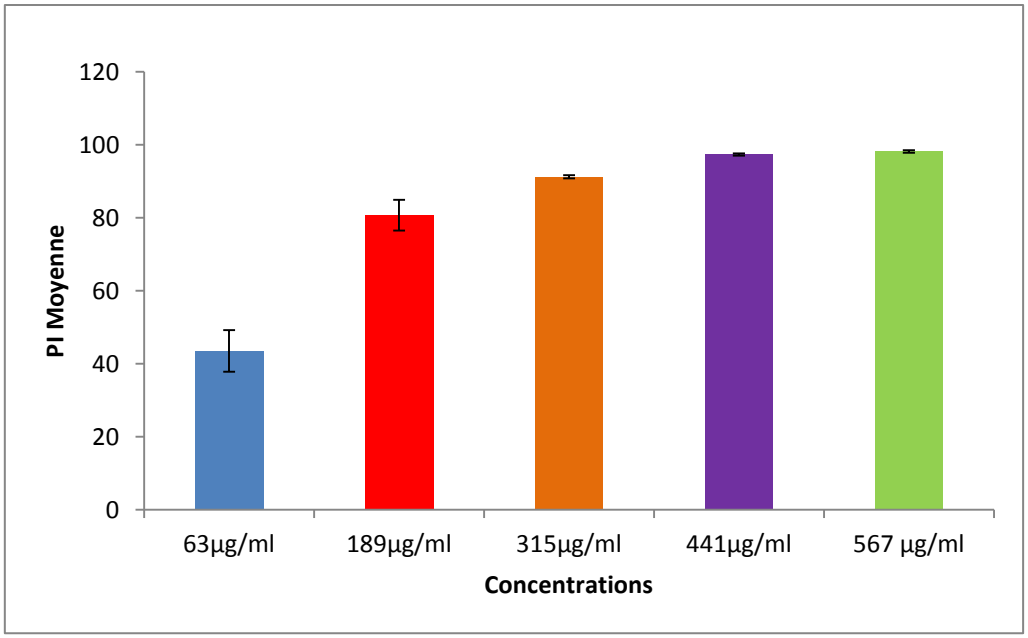
Figure 11: Action de la fraction d'acétate d'éthyle de *Celtis integrifolia* sur l'ABTS.

A la plus faible concentration (63 µg/ml), la fraction d'acétate d'éthyle présente un PI de 37,78±2,15%. A 315 µg/ml, le PI passe 70,55±3,01%.

Aux deux plus fortes concentrations testées (441 et 567 µg/ml), les PI obtenus sont respectivement 84%±1,37%et 92,39±2,01%.

✓ Fraction aqueuse

La fraction aqueuse des feuilles de *Celtis integrifolia* inhibe significativement l'ABTS de manière dose-dépendante à toutes les concentrations testées comme l'atteste le figure 12.



* : p<0,05 versus témoin négatif.

Figure 12: Action de la fraction aqueuse de *Celtis integrifolia* sur l'ABTS

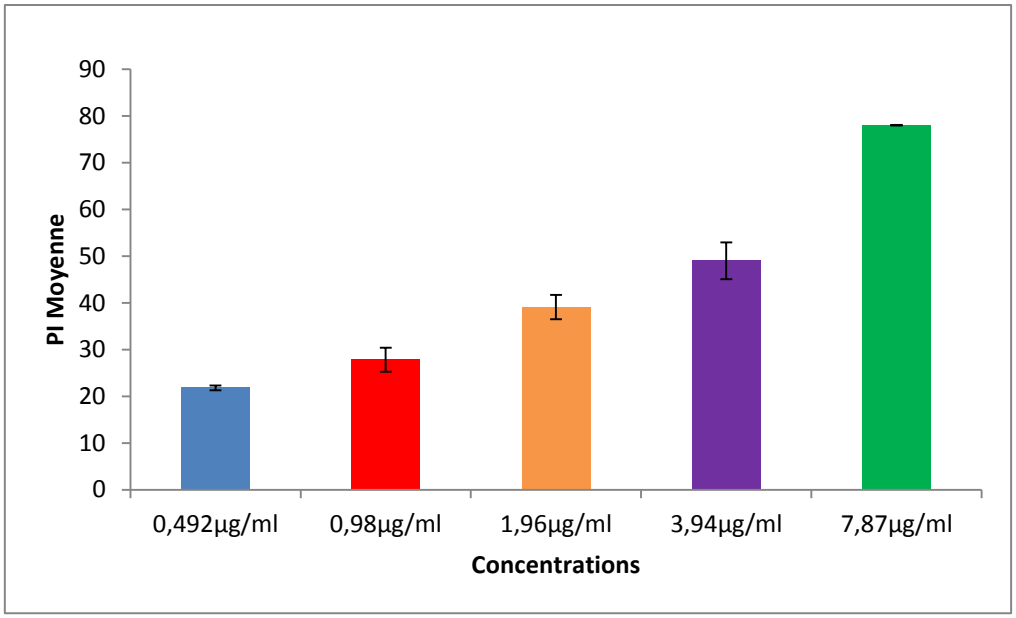
Aux différentes concentrations testées (63-189-315-441-567 µg/ml), les PI obtenus sont respectivement 43,53±5,69%-80,69±4,23%-91,24±0,43%-97,37±0,30%-98,18±0,36%.

Une différence significative est notée entre les effets des différentes concentrations testées (p<0,05).

✓ L'acide ascorbique

L'acide ascorbique a été testé à des concentrations plus faibles que celles utilisées pour tester l'extrait et ses différentes fractions.

A toutes les concentrations testées, l'acide ascorbique inhibe significativement l'ABTS de manière dose-dépendante comme le montre la figure13.



* : p<0,05 versus témoin négatif.

Figure 13: Action de l'acide ascorbique sur l'ABTS.

Aux concentrations de 0,49 et 0,98 µg/ml, l'acide ascorbique présente respectivement des PI de 21,79±0,50 % et 27,82.±2,57%.

Les plus fortes activités inhibitrices sont obtenues avec les concentrations de 3,94 et 7,87 µg/ml qui ont des PI respectifs de49, 43 ±3,95%et 78,11±0,08%.

La figure14résume l'action de l'extrait et ses fractions sur l'ABTS.

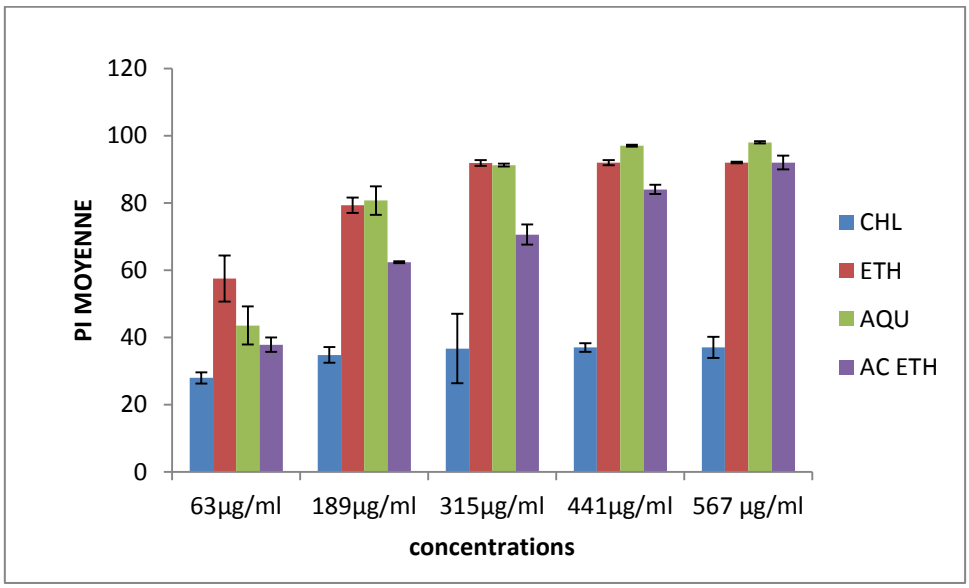


Figure 14: Action de l'extrait et ses fractions sur l'ABTS.

II.3.2. Concentration inhibitrice 50% (CI_{50})

Les CI_{50} obtenues à partir du logiciel Statgraphics sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV: Valeurs des concentrations d'inhibition à 50% de l'extrait éthanolique, de ses fractions et de l'acide ascorbique.

Produits	EE	FC	FAE	FA	AA
CI_{50} (µg/ml)	41,4 ± 8,9*	1670 ± 39,9*	126 ± 4,2*	87 ± 15,9*	4,04 ± 0,4*

EE : Extrait Ethanolique ; FC : Fraction Chloroformique ; FAE : Fraction d'Acétate d'Ethyle ; FA : Fraction Aqueuse ; AA : Acide Ascorbique.
* : $p<0,05$ *versus* témoin négatif (différence significative).

L'extrait éthanolique des feuilles de *Celtis integrifolia* présente une CI_{50} de 41,4 ± 8,9µg/ml, inférieure à celles de ses fractions (elle est plus active que ses fractions). La fraction chloroformique a la CI_{50} la plus élevée (1670±39,9µg/ml).Les fractions d'acétate d'éthyle et aqueuse ont des CI_{50} respectives 126±4,2 et 87±15,9µg/ml. Quant à l'acide ascorbique, il possède la plus petite valeur (CI_{50} = 4,04 ± 0,4µg/ml) et représente le produit le plus actif.

CHAPITRE III : DISCUSSION

III.1.EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT

L'extraction est une étape très importante avant la méthode quantitative et qualitative proprement dite. Elle est influencée par la méthode d'extraction choisie en fonction des composés phytochimiques à étudier. L'éthanol utilisé pour l'extraction a été choisie pour sa capacité d'extraire les composés polaires et certains composés apolaires. Ainsi l'extraction éthanolique de la poudre de feuilles de *Celtis integrifolia* a fourni un rendement de 17%.

Le fractionnement de l'extrait éthanolique avec des solvants de polarité croissante (chloroforme, acétate d'éthyle et eau) permet d'obtenir successivement des fractions contenant des composés apolaires liposolubles, des composés moyennement polaires et des composés polaires hydrosolubles.

Le meilleur rendement obtenu après fractionnement a été obtenu avec la fraction aqueuse qui présente un rendement de 58,82%, suivie de la fraction chloroformique qui a un rendement de 29,41%.La fraction acétate d'éthyle présente le plus faible rendement 5,88%. Ces résultats montrent la forte présence de composés polaires dans les feuilles de *Celtis integrifolia.* Néanmoins on note aussi la présence de composés apolaires.

III.2. SCREENING CHIMIQUE

Le screening chimique est une étape préliminaire permettant de révéler la présence de métabolites secondaires connus pour leur activité physiologique et possédant des vertus médicinales. Les réactions de caractérisation chimiques effectuées sur l'extrait éthanolique et ses différentes fractions révèlent la présence d'importants métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les coumarines et les stérols.

Cependant on note une différence de répartition des composés trouvés dans l'extrait et les fractions. Les coumarines sont présentes dans l'extrait éthanolique, les fractions acétate d'éthyle et chloroformique et absentes dans la fraction aqueuse. Les stérols sont uniquement présents dans les fractions acétate d'éthyle et chloroformique. Les flavonoïdes sont fortement présents dans l'extrait éthanolique et la fraction aqueuse. Par contre ils sont présents à l'état de traces dans la fraction d'acétate d'éthyle et absents dans la fraction chloroformique. Ces composants phénoliques de type flavonique sont connus pour leur capacité d'inhibition des radicaux libres.

III.3 ACTIVITE ANTIOXYDANTE

La méthode à l'ABTS est le test utilisé pour évaluer le potentiel antioxydant des feuilles de *Celtis integrifolia.*

L'activité anti-radicalaire est basée sur la neutralisation (mesurée à 734nm) d'un cation radicalaire stable, ABTS°+ en ABTS, en présence de composés antioxydants. Par cette méthode on considère que l'activité radicalaire n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme des piégeurs de radicaux libres.

L'acide ascorbique qui est un antioxydant standard a un pouvoir antioxydant supérieur à celui des autres produits testés, avec une CI_{50} de 4,04±0,4 µg/ml.

L'extrait éthanolique (CI_{50} : 41,4±8,9 µg/ml) a montré une meilleure activité antiradicalaire comparativement à ses fractions. Parmi les produits issus du fractionnement de l'extrait éthanolique, la fraction aqueuse (la plus polaire des fractions) a montré la meilleure activité (CI_{50} : 87±15,9 µg/ml). D'après les résultats du screening chimique, la fraction aqueuse ne renferme que des flavonoïdes. Ce qui nous permet de suggérer que ce groupe de composants chimiques seraient en partie le support de l'activité antiradicalaire. Cependant la meilleure activité de l'extrait éthanolique par rapport à cette fraction laisse

penser que d'autres composants qui agiraient en synergie dans l'extrait auraient été séparés lors du fractionnement.

Les polyphénols tels que les flavonoïdes sont connus pour leur bonne capacité antioxydante. Ainsi par exemple le thé vert et le thé noir ont un pouvoir antioxydant lié à leur forte teneur en polyphénols **(Rechner*et al..*, 2002 ; Campanella *et al..*, 2003).**

La fraction aqueuse riche en composés phénoliques en particulier les flavonoïdes peut expliquer son activité antioxydante.

En outre, **Djamila (2012)** a montré que les coumarines sont douées d'une propriété antioxydante. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les hydroxyles, superoxydes et peroxyles. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles des flavonoïdes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'utilisation des plantes dans le traitement des maladies est une pratique qui date de l'antiquité. Dans les pays en développement qui ne bénéficient pas beaucoup des avancées technologiques de la médecine moderne et où les médicaments sont rares ou d'un coût relativement trop élevé, les plantes retrouvent leur place dans notre quotidien pour les besoins de santé.

Malgré leur fréquente utilisation et leur potentialité comme sources de nouveaux principes actifs, les plantes sont peu exploitées lorsque l'on considère le fort pourcentage d'espèces non encore étudiées soit pour leur composition chimique soit pour leurs propriétés pharmacologiques.

Les radicaux libres sont utiles dans certains métabolismes, mais aussi dans la lutte contre certains xénobiotiques (bactéries). Cependant, en cas de surproduction dépassant les capacités d'élimination de l'organisme, ces radicaux libres s'attaquent aux composantes normales cellulaires telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques entre autres, entrainant le stress oxydant à l'origine de plusieurs maladies comme l'hypertension artérielle, le cancer, les maladies rhumatismales, le diabète etc. Ces radicaux libres peuvent être neutralisés à travers la chimio-prévention utilisant les composés antioxydants présents dans l'alimentation de l'homme et dans les plantes médicinales. Ainsi, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre du jour.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique des feuilles de *Celtis integrifolia,* plante appartenant à la famille des *Ulmaceae*.

En effet, *Celtis integrifolia* est un arbre de 15 à 20 m de haut, à fût très court et bas, branchu, atteignant 1,5 m de diamètre. Les feuilles sont alternes, plus ou

moins coriaces sur les deux faces. Elles sont largement ovales, à sommet acuminé ou atténué en pointe, à base asymétrique, arrondie ou plus ou moins cordée.

Ainsi l'extraction éthanolique de 100 g de poudre des feuilles de *Celtis integrifolia* a donné un extrait sec de 17 g soit un rendement de 17%. Le fractionnement liquide-liquide des 17 g d'extrait sec a permis d'avoir 5 g de fraction chloroformique soit un rendement de 29,41% ; 1 g de fraction d'acétate d'éthyle soit un rendement de 5,88% ; et 10 g de fraction aqueuse soit un rendement de 58,82%.

Les réactions de caractérisation chimiques effectuées sur l'extrait éthanolique et ses différentes fractions ont révélé la présence de métabolites secondaires tels que les flavonoides, les coumarines et les stérols.
L'activité antioxydante des feuilles de *Celtis integrifolia* a été étudiée en évaluant leur capacité à piéger l'ABTS+°

A toutes les concentrations testées, l'extrait éthanolique et ses différentes fractions inhibent significativement l'ABTS ($p<0,05$ versus témoin négatif).
Afin de comparer leur pouvoir antioxydant, les concentrations inhibitrices à 50% (CI_{50}) de l'extrait et de ses différentes fractions ainsi que celle de l'acide ascorbique ont été déterminées. Les résultats obtenus montrent que l'extrait éthanolique présente le meilleur pouvoir antioxydant parmi les extraits avec une CI_{50} de 41,4±8,9 µg/ml suivie de la fraction aqueuse avec une CI_{50} de 87, ±15,9 µg/ml. La fraction d'acétate d'éthyle et la faction chloroformique présentent des CI_{50} respectives de 126, ±4,2 et 1670, ±39,9 µg/ml.

Cependant l'acide ascorbique qui est un antioxydant standard a un pouvoir antioxydant supérieure à celui de l'extrait éthanolique avec une CI_{50} de 4,04±0,4 µg/ml.

Enfin, les résultats obtenus mettent en exergue, l'effet prometteur des feuilles de *Celtis integrifolia* quant à leur pouvoir antioxydant contre les effets néfastes du stress oxydatif.

Ce travail ayant montré la capacité antioxydante des feuilles de *Celtis integrifolia*, des perspectives d'études pourraient s'orienter l'isolement de molécules antiradicalaires. Une étude sur la toxicité à moyen et long terme s'avère nécessaire dans le but de garantir une sécurité d'emploi et permettre ainsi la mise au point de médicaments traditionnels améliorés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Aruoma O. I. (1998)**: Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. Journal of American Oil Chemist Society 75: 199-212.

2. **Awika J.M. et Rooney L.W., 2004**: Sorghum phytochemical and their potential impact on human health. 65,1199-1221.

3. **Babbs C. F. (1992):** Oxygen radicals in ulcerative colitis. Free Radical Biology and Medicine, 13: 169-181.

4. **Bassène E. (2012**): Initiation à la recherche sur les substances naturelles : Extraction- Analyse- Essais biologiques. Presses universitaires de Dakar, 150p.

5. **Berger MM. Nutritional manipulation of oxidative stress**: review of the evidence. Nutrition Clinique et Métabolisme, 2006,20(1): 48-53.

6. **Bousso B.S.M.D. (2010): Le stress oxydatif:** les antioxydants naturels et de synthèse.Thèse Doct.pharm., n°93, Dakar, 102p.

7. **Bossoki I.P. (2002)** : Etude des activités biologiques de *Fagaraxanthoxyloides* LAM(*Rutaceae*). Thèse Doct. Pharm., Bamako, 133p.

8. **Diattara D. (2014):** Etude de l'activité antioxydante des feuilles et écorces du tronc de Pterocarpus erinaceus poir. (Fabaceae). Thèse Doct. Pharm, n°52, Dakar.

9. **Diop S.S. (2013) :** Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des baies d'une plante de la flore chinoise : Lycium barbarum LINNE. Thèse Doct. Pharm, n°12, Dakar, 57p.

10. **Djamila D., (2012) :** Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées. Master chimie appliquée, 40 pages.

11. **Esterbauer H.Gebicki J., Puhl H., Jurgens G., (1992):** The role of lipid peroxidation and antioxidation in oxidative modification of LDL, Free Rad.Biol. Med., 13, p.341.

12. **Favier A., (2003).Le stress oxydant:** intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.

13. **Foyer CH., Noctor G. (2005):** Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant cell. 17(7): 1866-1875.

14. **Gueye D. (2012):** recherché bio-autographique de l'activité antioxydante de neuf plantes de la flore sénégalaise. Thèse. Doct. Pharm., n°32, 89p.

15. **Guidet B. (1992) :** Radicaux libres, moyens de défense extracellulaire. Med. Chir. Dig., 21 : 149-451.

16. **Halliwell B., Gutteridge JM:** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol. 1990, 186: 1-85.

17. **Jiri S., Marketa R., Olga K., Petr S., Vojtech J., Libuse T., Ladislav H., Miroslava B., Josef Z., Ivo P., Rene K.,** 2010. Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. Molecules. (15): 8618-8640.

18. **Krinsky N.I. (1989):** antioxidant functions of carotenoids. Free rad. Biol. Med, 7: 617-635.

19. **Kumar SV, Saritha G, Fareedullah Med (2010):** Role of antioxidant and oxidative stress in cardiovascular diseases, Annals of Biological Research, 1(3): 158-173.

20. **Lah C.T. (2014):** Contribution à l'activité antioxydante des calices de trois variétés d'Hibiscus sabdarifa au Sénégal. Thèse. Doct. Pharm., n°37, Dakar, 66p.

21. **Leverve X:** Hyperglycemia and oxidative stress: complex relatonship with attractive propects. Intensive care Med, 2003, 29(4): 511-4.

22. **Ly C. (2016):** Screening chimique et Eude de l'activité antioxydante des feuilles de Celtis integrifolia (Ulmaceae). Thèse. Doct. Pharm.Dakar.

23. **Madhavi D.L., Deshpand S., S. lunkle D. K. (1996):** Food antioxidants technological, toxilogical and health perspectives. Marcel Dekker, New York, 101p.

24. **Migliore L. Coppédé F:** Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. Mutat. Res., 2002, 512(2-3): 135-53.

25. **Mogode D. J (2004):** Etude photochimiques et pharmacologique de Cassia nigricans Valh (Cesalpiniaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Thèse. Doct. Pharm., Bamako, 135p.

26. **Nadal B. (2009) :** Synthèse et évaluation de nouveaux agents de protection contre les rayonnements ionisants. Thèse. Doct. Chimie organique, n°9602, Paris sud XI, 260p.

27. **Niang M. (2014) :** Etude de l'activité antioxydante de deux Cesalpiniaceae de la flore sénégalaise : Piliostigma reticulatum (DC) Hochst (feuilles et écorces) et Tamarindus indica L. (feuilles et gousses). Thèse. Doct. Pharm., n°10, Dakar.77p.

28. **Niang M. (2013) :** Etude de l'activité antioxydante des feuilles de quatre Combretacées de la flore sénégalaise : Combretum micranthum G. Don, C. glutinosum perr. ex DC, C. aculeatum Vent et Guiera senegalensis J.F.G med. Thèse Doct. Pharm, n°74, Dakar, 73p.

29. **Rechner A.R., Wagner E., Van Buren L., Van De Put F., Wiseman S., and Rice- Evans C.A. (2002):** Black tea represents a major source of dietary phenolics among regular tea drinkers. Free Radic. Res.; 36:1127-1135.

30. **Shimizu H. (2004):** Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. Stroke, 35 (9): 2072-2077.

31. **Sorgo O. oxidative stress:** theoretica model or a biological reality? C.R Biol, 2004, 327 (7): 649-62.

32. **Dudonne S., Vitrac X., Coutiére P., Woillez M. and Merillon JM (2009):** Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays.

33. **Wade V. (2013):** Etude de l'activité antioxydante de quatre Euphorbiaceae de la flore sénégalaise : Euphoebia balsamifera (LINN), Euphorbia hirta (L), Phyllantus acidus (L) et Phyllanthus amarus (SCHUM et THONN). Thèse Doct. Pharm., n°71, Dakar, 71p.

34. **Wolters M, Hermans S, Golf S, Katz N, Hahn A (2006):** Selenium and antioxidant. Vitamin status of elderly German women. Eur J clin Natur. 60 (1): 85-91.

WEBOGRAPHIE

- www.wikipedia.org
- www.google.com
- www.pubmed.com
- www.seyilaabe-htkm.com

ANNEXES

Annexe 1: Pourcentages d'inhibition de l'extrait éthanolique et de ses fractions.

	Concentration (µg/ml)				
Echantillon	63	189	315	441	569
E.E	**54,47**±6,89*	**79,31**±2,29*	**91,38**±0,90*	**91,67**±0,76*	**91,76**±0,24*
F.C	**27,92**±3,12*	**34,77**±1,29*	**36,59**±0,50*	**37,36**±2,30*	**37,40**±1,68*
F.A.E	**37,78**±2,15*	**62,35**±0,28*	**70,55**±3,01*	**84**±1,37*	**92,39**±2,01*
F.A	**43,53**±5,69*	**80,69**±4,23*	**91,24**±0,43*	**97,37**±0,30*	**98,18**±0,36*

E.E = Extrait Ethanolique ; F.C = Fraction Chloroformique ; F.A.E= Fraction d'Acétate d'Ethyle ; F.A= Fraction Aqueuse.

* : différence significative ($p < 0,05$ *versus* témoin négatif)

Annexe 2: Pourcentages d'inhibition de l'acide ascorbique.

Concentration (µg/ml)	0,492	0,98	1,96	3,94	7,87
PI (en %)	21,79±0,5*	27,82±2,57*	39,08±2,5*	49,43±3,95*	78,11±0,08*

* : différence significative ($p < 0,05$ *versus* témoin négatif)

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes Condisciples.

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la Santé Publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :
Le président du jury

Vu :
Le Doyen……

Vu et Permis d'imprimer
Pour le recteur, le Président de l'assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et par délégation
Le Doyen

RESUME

Celtis integrifolia Lam est une plante qui est beaucoup sollicité pour les soins en médecine traditionnelle. Mais peu d'étude ont été menées sur ses potentiels biologiques. Le but de cette étude est d'évaluer le potentiel antioxydant des feuilles de *Celtis integrifolia.* Le matériel végétal a été récolté puis séché à l'abri du soleil.

L'extraction est faite par décoction alcoolique et les fractions sont obtenues par fractionnement liquide-liquide en utilisant les solvants de polarité croissante.

La capacité réductrice de chaque échantillon est évaluée à l'aide de la méthode ABTS. Le rendement d'extraction du décocté alcoolique des feuilles est de 17%.Les fractions chloroformique, d'acétate d'éthyle et aqueuse représentent respectivement 5-1 et 10% des feuilles.

Pour la méthode ABTS la meilleure valeur de CI_{50} obtenue est celle de 4,04 ± 0,4µg/ml pour l'acide ascorbique et la plus faible est la fraction chloroformique avec une valeur de 1670 ± 39,9 µg/ml.

A travers ce travail, nous avons pu montrer que l'utilisation des feuilles de *C. integrifolia* en médecine traditionnelle a des fondements scientifiques.

Ces activités seraient probablement liées aux fortes teneurs en composés phénoliques notamment les flavonoïdes.

D'autres études de tests d'activités antioxydantes devraient être menées dans le sens de confirmer l'utilisation des feuilles comme antioxydant.

Mots clés : Feuilles de *Celtis integrifolia*, activité antioxydante, ABTS, composés phénoliques

Email: amycollecoulibaly88@gmail.com