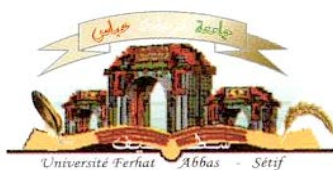


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°/SNV/2015

THÈSE

Présentée par

AMENI Djamila

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

Effets Antioxydants des Extraits de la plante médicinale *Daphne gnidium* L. utilisée en Algérie.

Soutenue publiquement le 03/03/2015

DEVANT LE JURY

Président	KHENNOUF Seddik	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	BAGHIANI Abderrahmane	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	KHELIFI TOUHAMI Fatima	Pr. Univ Constantine 1
	ZELLAGUI Saleh	Pr. Univ Oum El Bouaghi
	NECIB Youcef	Pr. Univ Constantine 1

Laboratoire de Biochimie Appliquée

DEDICACES

A mes très chères parents MOUSSA et SALIHA

Affable, honorable, aimable : vous présentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Vos prières et vos bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous 'accorder santé, longue vie et bonheur. Je vous aime si fort.

A ma grand-mère paternelle HDJILA

A la mémoire de la grande dame qui a tant sacrifié pour nous.

A ma grand-mère maternelle ZAHRA

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours pour toi.

A mon très cher frère NACER, son épouse LYNDA et leurs filles MALEK et RYMA

Mon cher frère qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi.

A mon frère NABIL, sa femme et ses petits enfants SERINE et AHMED

A ma sœur SOUHILA, son mari FERHAT et sa fille HIBA

A mes très chers frères et sœurs ; FARID, ADEL, SAMIA et MOUNA

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection

A mes chères cousines

Zoulikha, Tiziri, Nawel, Sara, Hanane, Salima et Moucha

A mes chères amies

Houria, Saliha, Amel, Malaaz, Sabrina, Hakima, Tawes et Lynda

REMERCIEMENTS

Quand il y a la soif d'apprendre Tout vient à point à qui sait attendre.

Ma thèse a été réalisée au sein du laboratoire de Biochimie Appliquée de l'Université Ferhat Abbas de Sétif 1, sous la direction du Professeur Abderrahmane BAGHIANI que je tiens à remercier pour la disponibilité, la confiance, les conseils, l'encouragement, l'encadrement et le soutien moral qu'il a su m'apporter tout au long de ces années de coopération. Je tiens également à le remercier de toute la patience dont il a su faire preuve au cours de la correction de ma thèse.

Au professeur Seddik KHENNOUF, j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de présider le jury.

Aux professeurs Fatima KHELIFI TOUHAMI de l'université de Constantine 1, au professeurs Amar ZELLAGUI de l'université de Oum El Bouaghi et au professeur Youcef NECIB de l'université de Constantine 1, je voulais vous s'exprimer toute ma reconnaissance pour avoir accepté de bien vouloir examiner et juger ce travail.

Aussi, je voudrai exprimer cette reconnaissance à monsieur le professeur Lekhmici ARRAR de notre laboratoire qui nous a toujours aidé pour avancer dans la recherche de différentes solutions.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire de Biochimie Appliquée et toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

La présente étude vise à déterminer la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes, et à évaluer certaines activités biologiques des extraits hydromethanolique (EBr), chloroformique (ECh) et acétate d'éthyle (EAc) de la partie aérienne de *Daphne gnidium* L. (PADG) utilisée dans la médecine traditionnelle. La teneur la plus élevée en polyphénols totaux est observée dans l'ECh (10.52 ± 0.87 mg EAG/g extrait). Les flavonoïdes se trouvent en quantité plus importante dans l'EAc (133.07 ± 2.84 mg EQ/g extrait). Les flavonoïdes majoritaires des extraits de PADG, identifiés par une HPLC/DAD, sont représentés par les dérivés d'acide férulique (30.68%), d'acide cinnamique (22.36%) dans l'EBr, le dérivé d'acide cinnamique (38.61%), un dérivé d'apigénine (20.01%) dans l'ECh, le méthyl apigénine glucoside (18%), quercétine 3-O-glucoside (17.55%) et lutéoline glucoside (15.06%) dans l'EAc. Tous les extraits de PADG ont montré un effet inhibiteur sur l'activité xanthine oxydase humaine (HXO) et bovine (BXO) fraîchement préparées. L'EAc est le puissant inhibiteur de la BXO avec une IC_{50} de 0.021 ± 0.001 mg/ml, tandis qu'il est le plus faible inhibiteur de la HXO avec IC_{50} de 4.809 ± 0.0004 µg/ml. L'utilisation des méthodes enzymatique et non enzymatique a révélé que tous les extraits possèdent une activité superoxyde scavenger. L'EBr a montré l'activité superoxyde scavenger la plus puissante avec une valeur d' IC_{50} de 0.54 ± 0.01 mg/ml. Le test au DPPH a confirmé la puissante activité scavenger de l'EBr. L'ECh a montré l'effet scavenger des radicaux hydroxyles le plus élevé suivie par l'EAc et l'EBr. Le test de la capacité chélatrice des ions ferreux montre que l'EBr est l'extrait le plus actif avec une IC_{50} de 0.40 ± 0.04 mg/ml. L'activité réductrice des extraits de PADG, mesurée par les tests de pouvoir réducteur et FRAP, a montré que l'ECh possède la plus importante capacité réductrice des ions ferriques, suivi par l'EAc et l'EBr. L'ECh possède un effet inhibiteur de l'oxydation de bêta-carotène ($I\% = 92.11\%$), semblable à celui du BHT ($I\% = 96.77\%$). Cette activité est confirmée par le test de ferrique-thiocyanate. Sous l'action oxydante d'AAPH, l'EAc et l'EBr ont montré un effet protecteur des érythrocytes plus élevé que celui de l'ECh avec des pourcentages d'hémolyse après 1h d'incubation de 0% et 1.9%, respectivement. En conclusion, cette étude indique que les extraits de PADG contiennent des composés à activités antioxydantes et radicales scavenger.

Mots clefs : *Daphne gnidium* L., polyphénols, antioxydants, xanthine oxydoréductase (XOR), radicaux libres, capacité chélatrice, pouvoir réducteur, peroxydation lipidique.

الملخص

تهدف الدراسة الحالية إلى تحديد المحتوى الفينولي والفلافونويدي وبعض النشاطات البيولوجية لمستخلصات الهيدروميثانوليك (EBr) والكلوروفورم (CHE) والإيثيل أستات (EAE) للجزء الهوائي لنبات *Daphne gnidium* L. (SDG) المستعملة في الطب الشعبي. لوحظ التركيز الأعلى لعديدات الفينول عند CHE (0.87 ± 10.52 مغ مكافئ لحمض الغاليك/غ من الوزن المجفد)، بينما وجدت الفلافونويدات بتركيز أعلى عند EAE (2.84 ± 133.07 مغ مكافئ للكرستين/غ من الوزن المجفد). باستخدام تقنية DAD/HPLC، أهم الفلافونويدات التي تم استخلاصها أولاً هي مشتقات حمض الفيرليك (30.68 %) ومشتقات حمض السيناميك (22.36 %) في CE، مشتقات حمض السيناميك (38.61 %) ومشتقات الأبيجينين (20.01 %) في CHE، الميثيل أبيجينين السكري (18.05 %) والكرستين O3-غليكوزيد (17.55 %) والليثولين السكري (15.06 %) في EAE. أظهرت جميع مستخلصات SDG تأثيراً تثبيطياً لنشاطية انزيم الكزنتين بنوعيه البقري (BXO) والبشري (HXO). كان EAE الأكثر تثبيطاً للكزنتين أكسيداز البقري (BXO) بـ IC_{50} قيمته 0.001 ± 0.021 مغ/مل، بينما كان له التأثير التثبيطي الأضعف على الكزنتين أكسيداز البشري بـ IC_{50} قيمته 0.004 ± 4.809 ميكروغ/مل. بينت المستخلصات قدرة إزاحية لجذر فوق الأكسيد باستعمال كل من الطرق الأنزيمية وغير أنزيمية. أظهر CE النشاطية الإزاحية الأقوى لجذر فوق الأكسيد بـ IC_{50} قيمته 0.01 ± 0.54 مغ/مل. يؤكد اختبار DPPH أن CE يمتلك النشاطية الإزاحية الأعلى للجذر. أظهر CHE النشاطية الإزاحية الأعلى لجذور الهيدروكسيل متبوعاً بـ EAE و CE. أظهرت تجربة القدرة على استخلاص أيونات الحديد أن CE هو الأكثر فاعلية بـ IC_{50} قيمته 0.04 ± 0.4 مغ/مل. أظهرت النشاطية الإرجاعية لمستخلصات SDG المقدرة بطريقتي RP و FRAP أن CHE امتلك القدرة الإرجاعية الأكبر لأيونات الحديد متبوعاً بـ EAE و CE. يمتلك CHE نسبة تثبيط (92.11 %) في طريقة أكسدة حمض اللينولييك مقارنة لتلك المسجلة عند BHT (96.77 %). هذه النشاطية تم تأكيدها بطريقة ferric-thiocyanate. تحت التأثير التأكسدي بـ AAPH، أظهر EAE و CE تأثيراً وقائياً لكريات الدم الحمراء من الانحلال أكبر من CHE بنسبة انحلال (H%) قدرت بعد

ساعة من الحضان وبقيمتي 0 % و 1.9% على التوالي. على العموم، أشارت هذه الدراسة إلى أن مستخلصات SDG تحتوي على مركبات لها نشاطية مضادة للأكسدة ومزيجة للجذور الحرة.

الكلمات المفاتيح: *Daphne gnidium* L.، عديدات الفينول، مضادات الأكسدة، الكزنتين أكسيدوريدكتاز، الجذور الحرة، القدرة الاستقلابية، القدرة الارجاعية، فوق أكسدة الليبيدات.

Abstract

The aim of the present study was to determine polyphenols, flavonoids and some biological activities of hydromethanolic (CE), chloroform (CHE) and ethyl acetate extracts (EAE) from the shoots of *Daphne gnidium* L., (SDG) traditionally used in folk medicine. The high concentration of polyphenols was observed in CHE (10.52 ± 0.87 mg GAE/g lyophilisate). Flavonoids were found to be highest in EAE (133.07 ± 2.84 mg QE/g lyophilisate). By means of HPLC/DAD, the main flavonoids in the SDG extracts were tentatively identified as ferulic acid derivatives (30.68%) and cinnamic acid derivatives (22.36%) in CE, cinnamic acid derivative (38.61%) and apigenin derivative (20.01%) in CHE and methyl apigenin glucoside (18.05%), quercetin 3O-glucoside (17.55%) and luteolin glucoside (15.06%) in EAE. All extracts of the SDG showed an inhibitory effect on human (HXO) and bovine (BXO) xanthine oxidase activity. The EAE was the most inhibitor on bovine xanthine oxidase (BXO) with an IC_{50} value of 0.021 ± 0.001 mg/ml, whereas it was the lowest inhibitor on human xanthine oxidase (HXO) with an IC_{50} value of 4.809 ± 0.0004 μ g/ml. The extracts exhibited a superoxide scavenging capacity by using both enzymatic and nonenzymatic methods. CE showed strong superoxyde scavenger activity with an IC_{50} of 0.54 ± 0.01 mg/ml. DPPH test confirms that a CE have a highest radical scavenger activity. The CHE showed a highest scavenging activity against hydroxyl radicals followed by EAE and CE. Ferrous ion chelating capacity assay showed that CE is the most active extract with an IC_{50} value of (0.40 ± 0.04 mg/ml). The reducing activity of the SDG extracts, measured by reducing power and FRAP assays, was showed that CHE had the highest ferric reducing capacity, followed by EAE and CE. CHE possess an inhibition ratio of (92.11%) in the linoleic acid oxidation assay close to that of BHT (96.77%). This activity is confirmed by the ferric-thiocyanate method. Under the oxidative action of AAPH, EAE and CE showed higher protective effect against erythrocytes hemolysis than the CHE, with a percentage of hemolysis (H%) values determined after 1 h of incubation of 0% and 1.9%, respectively. Overall, this study indicates that SDG extracts contains compounds with an antioxidants and radicals scavenger activity.

Key words: *Daphne gnidium* L., polyphénols, antioxidants, xanthine oxidoreductase (XOR), free radicals, chelating capacity, reducing power, lipids peroxidation.

LISTE DES ABREVIATIONS

$\cdot\text{OH}$	radical hydroxyle
$^1\text{O}_2$	oxygène singulier
8-NO(2)-G	8-nitroguanine
8-OxoG	8-hydroxyguanosine
A	adénine
$\text{A}^\cdot$	dérivés radicalaires phénoliques
AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
Acyl-CoA	acyl coenzyme A
ADN	acide disoxyrébonucléique
AGPI	acide gras polyinsaturé
AH	composés phénoliques
AP	apuriniques/apyrimidiniques
Arg	argénine
ATP	adénosine triphosphate
BER	base excision repair
BHT	butylated hydroxytoluene
C	cytosine
CAT	catalases
CDB	coupure double brin
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
Cit	citrulline
COX	cyclooxygénases
CSB	coupure simple brin
CTE	chaines de transport des électrons
Cu/Zn-SOD	cuivre/Zinc Superoxydes dismutases
CYP	cytochromes P450
cyt c	cytochrome c
DPPH	2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	dithiothritol
EAc	extrait de l'acétate d'éthyle
EAq	extrait aqueux

EBr	extrait brut
ECh	extrait chloroforme
EDTA	etylenediaminetetraacetic acid
EET	acide époxyeicosteienoic
EHx	extrait hexane
eNOS	endothéliale Nitric Oxide Synthase
EPO	peroxydase des éosinophiles
ERN	Espèces réactives de nitrogènes
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EtOAc	acétate d'éthyle
FADH ₂	flavine adénine dinucléotide réduite
Fl-O [•]	radical aroxyle
Fl-OH	flavonoïdes
FTC	Fe ⁺² -Thiocyanate
G	guanine
GPx	glutathion peroxydase
GR	glutathione réductase
GRX	glutaredoxine
GS [•]	radical thiyl
GSH	glutathione réduit
GSSG	glutathione oxydée
HNE	hydroxynonenal
HOBr	acide hypobromeux
HOCl	acide hypochloreux
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
LDL	low density lipoprotein
LOX	lipooxygénases
MDA	malonaldialdéhyde
Mn-SOD	manganèse superoxyde dismutase
MPO	myeloperoxydase
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NBT	nitroblue tetrazolium
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase
NOS	nitric Oxide Synthase
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
PKC	protéines kinase C
PMS	phenazine methosulfate
PRx	thioredoxine peroxydase
Q10	ubiquinone
R $\cdot$	radicaux libres
RH ₂	espèce réduite
RLs	radicaux libres
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROH	alcools
ROOH	dérivés lipidiques
ROOH	hydroperoxydes organiques
ROS	Reactive Oxygen Species
RS $^{\cdot}$	radical thiyl
SCN $^-$	thiocyanate
SDS	sodium dodecyl sulphate
SH	sulfhydryle
SOD	superoxydes dismutases
T	thymine
TRX	thioredoxine
Vit C	vitamine C
XDH	xanthine déshydrogénase
XO	xanthine oxydase
XOH	xanthine oxydase humaine
XOR	xanthine oxydoréductase
α -TO $\cdot$	radical tocophérol

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Réduction à un électron de l'oxygène moléculaire (O_2) pour former un radical libre ; l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....	4
Figure 2. Les espèces réactives majeures dans la cellule et leurs dérivés.....	10
Figure 3. Mécanisme de la production des ROS par la XOR et leur implication dans la réponse inflammatoire et les lésions post-ischémiques (Martin <i>et al.</i> , 2004).....	18
Figure 4. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Favier, 2003).....	20
Figure 5. Mécanismes de défense antioxydants (Sorg, 2004).....	28
Figure 6: Squelette de base des flavonoïdes.....	30
Figure 7. Les différentes classes de flavonoïdes.....	31
Figure 8. Les sites possibles pour la chélation des métaux (D'après Pietta, 2000).....	36
Figure 9. Effet scavenger des espèces réactive de l'oxygène ($R^{\cdot}$) par les flavonoïdes. Le radical libre $Fl-O^{\cdot}$ peut réagir avec un autre radical pour avoir une structure quinone stable (Pietta, 2000).....	36
Figure 10. Quelques images de <i>Daphne gnidium</i> L.....	39
Figure 11. Les étapes du fractionnement de l'extrait brut de <i>D. gnidium</i> L.....	44
Figure 12. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne $\pm$ SD de trois mesures).....	56
Figure 13. La courbe d'étalonnage de la quercetine et de la rutine (moyenne $\pm$ SD de trois mesures).....	57
Figure 14. Les spectres UV des extraits de <i>D. gnidium</i> L. visualisés à 330 nm. A, EBr; B, ECh; C, EAc.	63
Figure 15: Spectre d'absorption UV-Vis (A) et électrophorèse (SDS-PAGE) (B) de la XO purifiée.	67
Figure 16. L'inhibition de la XO par les extraits de <i>D. gnidium</i> . B : Bovin, H : Humain, EBr : Extrait brut, ECh : Extrait chloroformique, EAc : Extrait acétate d'éthyle. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.....	69
Figure 17. Comparaison de l'effet inhibiteur de différents extraits de <i>D. gnidium</i> L. avec celui de l'allopurinol sur l'activité (A) ; XOB, (B) ; XOH. Les valeurs	

sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD (XOB ; $p \leq 0.01$), (XOH ; $p \leq 0.001$).....	71
Figure 18. Comparaison de l'effet inhibiteur sur l'activité XOB et XOH de l'allopurinol et de différents extraits de <i>D. gnidium</i> L. ($p \leq 0.001$).....	72
Figure 19. L'effet scavenger des extraits de <i>D. gnidium</i> sur l' $O_2^{\cdot-}$ généré par le système X/XO. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.....	75
Figure 20. L'action inhibitrice des antioxydants sur la génération de l' $O_2^{\cdot-}$ par la XO est composée de trois réactions (A, B et C). [A] Inhibition de la XO par les antioxydants. [B] La réduction de la XO par les antioxydants. [C] Le piégeage de l' $O_2^{\cdot-}$ par les antioxydants (Masuoka et al., 2012).....	76
Figure 21. Comparaison entre l'effet inhibiteur sur l'activité XO et l'effet scavenger sur l' $O_2^{\cdot-}$ généré par la XO de différents extraits de <i>D. gnidium</i> ($p \leq 0.001$).....	77
Figure 22. L'effet scavenger des extraits de <i>D. gnidium</i> sur l' $O_2^{\cdot-}$ généré par le système PMS-NADH/NBT. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.....	78
Figure 23. Comparaison de l'effet scavenger sur l' $O_2^{\cdot-}$ entre la quercétine (Q), l'acide gallique (Ac. Gal) et les différents extraits de <i>D. gnidium</i> . Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.001$).....	79
Figure 24. Comparaison de l'effet scavenger sur l' $O_2^{\cdot-}$ généré par le système X/XO et celui généré par le système PMS-NADH/NBT. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.001$).....	80
Figure 25. Effet piégeur de différents extraits de <i>D. gnidium</i> sur le radical DPPH. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.82	82
Figure 26. Comparaison de l'activité antiradicalaire de différents extraits de <i>D. gnidium</i> et des standards (Ac. Gal, acide gallique ; Q, quercétine ; Rut, rutine). Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD (Comparaison entre les extraits et la comparaison entre les standards ; $p \leq 0.01$. La comparaison entre les extraits et les standards ; $p \leq 0.001$).....	83

Figure 27. Effet scavenger sur le radical hydroxyle de l'ascorbate et différents extraits de <i>D. gnidium</i> . Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.....	86
Figure 28. Comparaison de l'effet scavenger du radical hydroxyle de l'ascorbate et différents extraits de <i>D. gnidium</i> . Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.001$).....	87
Figure 29. Effet chélateur sur les ions de fer ferriques (Fe^{+2}) de différents extraits de <i>D. gnidium</i> . Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.....	90
Figure 30. Comparaison de l'effet chélateur sur les ions de fer ferriques (Fe^{+2}) de différents extraits de <i>D. gnidium</i> avec celui d'EDTA. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD. (La comparaison entre les extraits ; $p \leq 0.01$, la comparaison entre les extraits et l'EDTA ; $p \leq 0.001$).....	91
Figure 31. La cinétique du réduction des ions de fer ferriques (Fe^{+3}) aux ion de fer ferreux (Fe^{+2}) par l'acide gallique, le BHT et les différents extraits de <i>D. gnidium</i> . Les valeurs sont la moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.....	94
Figure 32. Cinétique de la réduction du TPTZ- Fe^{3+} en TPTZ- Fe^{2+} par (a) les extraits de <i>D. gnidium</i> (0.0147 mg/ml) et (b) les antioxydants standards (250 μM), (Vit C; vitamine C ou acide ascorbique, Ac. Gal; acide gallique, Q; quercétine, Rut; rutine). Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD.....	96
Figure 33. Effet inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique dans le système β -carotène-acide linoléique en absence et en présence de BHT et de différents extraits de <i>D. gnidium</i> . Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD.....	100
Figure 34. Comparaison de l'effet inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique dans le système β -carotène-acide linoléique, après 24 heures d'incubation, de différents extraits de <i>D. gnidium</i> avec celui de BHT. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.01$).....	101
Figure 35. Cinétique de la peroxydation lipidique en présence et en absence des extraits de <i>D. gnidium</i> et des antioxydants standards. Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD.....	103

- Figure 36.** Comparaison de la capacité inhibitrice de l'oxydation de l'acide linoléique démontré par la méthode de Fe^{+2} -Thiocyanate (FTC) des extraits de *D. gnidium* et des antioxydants standards. Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.01$)..... 104
- Figure 37.** Cinétique de la disparition progressive des cellules érythrocytaires provoquée par les radicaux peroxydes générés par la décomposition thermique d'AAPH en présence et en absence des extraits de *D. gnidium* et des antioxydants standards. Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD..... 107
- Figure 38.** Comparaison de pouvoir antihémolytique de différents extraits de *D. gnidium*, la vitamine c et la quercétine. Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD..... 108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Dosage des polyphénols totaux et les flavonoïdes des extraits de <i>D. gnidium</i> L.....	57
Tableau2. Résultats de la purification de la XOR à partir du lait humain et bovin.....	65
Tableau 3. Le paramètre EC1 de différents extraits de la partie aérienne de <i>D. gnidium</i> et des antioxydants standards à 4 et à 30 minutes.....	97

SOMMAIRE

Introduction.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Stress oxydant.....	4
1.1. Les espèces réactives majeures dans la cellule.....	5
1.1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).....	7
1.1.2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).....	8
1.1.3. Le radical hydroxyle ($\cdot OH$).....	9
1.1.4. Le monoxyde d'azote ($NO\cdot$).....	11
1.2. Sources des radicaux libres.....	11
1.2.1. Sources exogènes.....	11
1.2.2. Sources endogène.....	13
1.2.2.1. Les chaînes de transport des électrons (CTE).....	13
1.2.2.2. Les voies métaboliques de l'acide arachidonique.....	14
1.2.2.3. Le système cellulaire.....	15
1.2.2.4. La xanthine oxydase (XO).....	16
1.2.2.5. Nitric Oxide Synthase (NOS).....	18
1.3. Cibles cellulaires des oxydants.....	19
1.3.1. La peroxydation lipidique.....	19
1.3.2. L'oxydation des protéines.....	20
1.3.3. L'oxydation de l'ADN.....	21
1.4. Systèmes antioxydants.....	23
2. Les polyphénols.....	29
2.1. Les acides phénoliques.....	29
2.2. Les flavonoïdes	29

2.3.1. Structure chimique et classification	30
2.3. Les tannins	32
2.4. Activités biologiques des polyphénols	32
3. La plante <i>Daphne gnidium</i> L. (Daphne garou, Lezzaz)	39
3.1. Classification	39
3.2. Utilisation traditionnelle de la plante	40
3.3. Composition et propriétés biologiques	40

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel	42
1.1. Matériel biologique	42
1.2. Les réactifs	42
2. Méthodes	42
2.1. Extraction des flavonoïdes de <i>D. gnidium</i> L.....	42
2.2. Analyse des extraits de <i>D. gnidium</i> L.....	44
2.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	44
2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	45
2.2.3. Chromatographie Liquide à haute performance (CLHP/HPLC).....	45
2.3. Purification de la xanthine oxydoréductase humaine et bovine (H/B-XOR).....	45
2.3.1. Préparation de l'extrait brut	46
2.3.2. Préparation de la XOR pure	46
2.3.3. Contrôle de la pureté de la XOR	47
2.3.3.1. Electrophorèse sur Gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	47
2.3.4. Estimation de l'activité enzymatique de la XOR.....	48
2.4. Inhibition de l'activité XO par les extraits de <i>D. gnidium</i> L.....	48
2.5. Effet des extraits de <i>D. gnidium</i> L. sur l'O ⁻ ₂ produit par la XO.....	49

2.6. Effet scavenger sur l'anion superoxyde par le système PMS-NADH/NBT.....	49
2.7. Test au 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	50
2.8. Test de piégeage (scavenger) du radical hydroxyle.....	50
2.9. Effet chélateur des extraits de <i>D. gnidium</i> L.	51
2.10. Pouvoir réducteur des extraits de <i>D. gnidium</i> L.	52
2.11. Pouvoir réducteur des extraits de <i>D. gnidium</i> L. évalué par la technique FRAP	52
2.12. Test de blanchissement de β -carotène	53
2.13. Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de <i>D. gnidium</i> L. ; la méthode de Fe^{+2} -Thiocyanate (FTC).....	54
2.14. Test d'hémolyse.....	55
2.15. Analyse statistique.....	55

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Dosage des polyphénols totaux et les flavonoïdes de <i>D. gnidium</i>	56
2. La Chromatographie Liquide de Haute Performance (HPLC)	60
3. Purification de la xanthine oxydoréductase bovine et humaine (B-H-XOR)	65
4. Inhibition de l'activité XO par les extraits de <i>D. gnidium</i>	68
5. Effet scavenger des extraits de <i>D. gnidium</i> sur l' $\text{O}_2^{\bullet -}$ produit par la XO	74
6. Effet scavenger de l'anion superoxyde par le système PMS-NADH/NBT	78
7. Test au 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	81
8. Test de piégeage (scavenger) du radical hydroxyle	85
9. Effet chélateur des extraits de <i>D. gnidium</i>	88
10. Pouvoir réducteur des extraits de <i>D. gnidium</i>	93
11. Test de blanchissement de β -carotène.....	99
12. Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de <i>D. gnidium</i> L. (méthode de Fe^{+2} -Thiocyanate ; FTC)	102

13. Activité antihémodolytique	106
Conclusion	111
Références	116

Introduction

L'oxygène, apparu voici trois milliards d'années dans l'atmosphère terrestre, est une molécule indispensable à la vie. L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale en produisant 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique. Ce processus n'est toutefois pas parfait car 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène ou Reactive Oxygen Species (ROS) particulièrement réactionnelles (Koppenol, 2001). Dans une première étape, le radical libre anion superoxyde est formé, ce qui conduit par la suite à la production d'autres ROS comme le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et le monoxyde d'azote qui à son tour conduira à la formation des autres espèces réactives de nitrogène ou Reactive Nitrogen Species (RNS). Ces espèces réactives peuvent jouer un rôle physiologique important comme dans la phagocytose des bactéries par les cellules polymorphonucléaires (Swain et *al.*, 2002) et la signalisation cellulaire. Mais, de part leur nature instable, ces espèces réactives sont toxiques et interagissent avec toute une série de substrats biologiques importants. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des cassures au niveau de l'ADN avec possibilité de mutation et des processus de peroxydation lipidique peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule. Une production physiologique de ces espèces est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (superoxyde dismutases (SOD), catalase, glutathion peroxydases (GPx), peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, céruléoplasmine) qui maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation de ROS ou RNS. Un autre système de défense secondaire composé de phospholipases, d'ADN endonucléases et ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN

et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail et al., 2002). Dans une situation physiopathologique, un déséquilibre du statu prooxydants/antioxydants surviendra ; état de stress oxydatif. Cela, est bien suggéré d'être à l'origine de développement de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose et la cancérogénèse. Pour minimiser les effets néfastes de ce phénomène, un apport exogène des antioxydants est nécessaire. De multiples études ont suggéré le rôle crucial des antioxydants naturels dans le traitement des maladies liés au stress oxydatif. Les polyphénols constituent un des groupes les plus nombreux et largement distribué dans le royaume des végétaux, avec des propriétés biologiques importantes et en particulier leur activité antioxydante.

Pour cette raison, on a choisi, dans la présente étude, la plante *Daphne gnidium* L. comme une source d'antioxydants naturels. Cette plante est un arbuste de la famille des *Thyméléacées*, largement utilisée dans la médecine traditionnelle des pays méditerranéen. En Algérie, la partie aérienne de *D. gnidium* a été utilisée avec l'huile d'olive contre les douleurs inflammatoires.

Le présent travail est structuré en deux parties:

- l'extraction et analyse phytochimique de différents composés phénoliques de la partie aérienne de la plante.
- le deuxième volet est consacré à l'étude de l'activité antioxydante *in vitro* et *ex vivo* ;
 - La purification et l'étude de l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase.
 - Evaluation du pouvoir piégeur (scavenger) vis-à-vis du radical superoxyde généré par un système enzymatique (xanthine/xanthine oxydase) et non enzymatique (PMS-NADH/NBT), du radical hydroxyle et d'un radical libre relativement stable (DPPH).
 - Etude de l'activité chélatrice des métaux de transition et du pouvoir réducteur.

- Effet anti-lipoperoxydant en utilisant le système acide linoléique/ β -carotène et la méthode au thiocyanate ferrique (FTC).
- Etude de l'effet protecteur des extraits contre l'hémolyse oxydative des érythrocytes.

1. Stress oxydant

Les oxydants, en chimie, sont des composés aptes à oxyder les molécules cibles. Cela peut se produire par l'une de ces trois actions : arrachement d'un atome d'hydrogène, arrachement d'un électron ou par addition de l'oxygène (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Les radicaux libres (RLs) sont très bien connus comme des agents oxydants. Ce sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbital externe (Sanders and Greenamyre, 2013), ce qui les rend instables et réactifs. Ils dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) (Wu et *al.*, 2013) (**figure 1**).

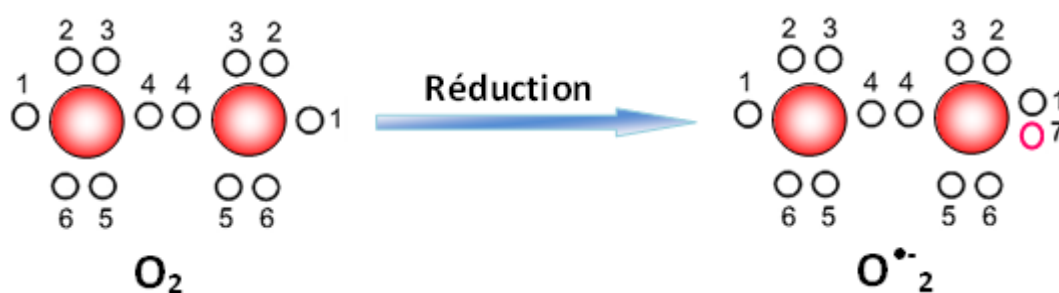


Figure 1. Réduction à un électron de l'oxygène moléculaire (O_2) pour former un radical libre ; l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$).

Noter que le terme « espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou Reactive Oxygen Species (ROS) » ne réfère pas seulement aux radicaux libres oxygénés, mais encore aux dérivés réactifs de l'oxygène non radicalaires (Peroxyde d'hydrogène ; H_2O_2) (Halliwell and Gutteridge., 2007). De même, les espèces réactives de nitrogènes (ERN ou RNS : Reactive Nitrogen Species) renferment les espèces radicalaires et non radicalaires dérivés de nitrogène. Les ROS et RNS sont produites au cours du métabolisme physiologique de la cellule (Pavithra and Vadivukkarasi, 2015). Ils ont un rôle double paradoxale ; ils peuvent être des agents délicats qui servent l'organisme ou des agents pathogènes (Fibach and Dana, 2015).

Les effets bénéfiques des espèces réactives se produisent à des concentrations faibles impliquant leurs rôles physiologiques dans les mécanismes de défense contre les agents infectieux et dans de nombreux systèmes de signalisation cellulaires. Les effets nocifs de ces deux types d'espèces réactives, connu sous les termes « stress oxydatif et stress nitrosatif », résulte d'une surproduction de ces espèces réactives et/ou une défaillance de mécanismes antioxydants (Wu et *al.*, 2013). Autrement dite, le stress oxydant résulte au cours des réactions métaboliques, utilisant l'oxygène, et représente un désordre dans l'équilibre du statu réactionnel pro-oxydants/antioxydants. Une production excessive des espèces réactives peut donc endommager les acides nucléiques, les lipides et les protéines cellulaires (Smith et *al.*, 2013), en inhibant de ce fait leurs fonctionnements physiologiques.

1.1. Les espèces réactives majeures dans la cellule

Les deux premiers radicaux libres générés par la cellule sont l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote. Ils sont réactifs et peuvent aisément réagir pour donner naissance aux différentes espèces réactives soit de l'oxygène soit de nitrogène (Powers and Jackson., 2008) (figure 2).

1.1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)

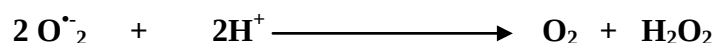
Le superoxyde est le premier radical oxygéné produit par les organismes en aérobiose et considéré comme un radical père de tous les radicaux oxygénés (Romao et *al.*, 2015 ; Wang et *al.*, 2014 ; Raedschelders et *al.*, 2012). L'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire conduit à la formation de l'anion superoxyde, il se produit principalement lors des fuites électroniques de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Powers and Jackson., 2008).



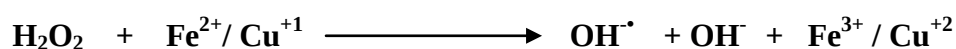
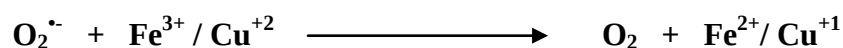
L' $\text{O}_2^{\bullet -}$ n'est pas tellement réactif et même il s'agit pas d'un puissant oxydant, mais il possède une grande distance de diffusion de son site de production (Bandyopadhyay *et al.*, 2004). Cet anion est chargé négativement, il est relativement imperméable à travers les membranes biologiques (Powers and Jackson., 2008 ; Fuchs., 1992), excepté en présence des canaux membranaires anioniques (Romao *et al.*, 2015 ; Newsholme *et al.*, 2012) qui permettent son passage membranaire. Le superoxyde possède une longue demi-vie, en comparaison aux autres radicaux libres, ce qui lui permet de diffuser à l'intérieur des cellules et augmenter le nombre de ses cibles (Powers and Jackson., 2008). Le superoxyde peut réagir rapidement avec d'autres radicaux libres tel le $\text{NO}^{\bullet}$ en réduisant sa demi-vie (Romao *et al.*, 2015) et avec quelques centres fer-soufre des protéines (Halliwell and Gutteridge, 2007). Il peut interagir avec d'autres molécules pour générer d'autres espèces réactives secondaires de l'oxygène soit directement ou généralement par des mécanismes enzymatiques ou des processus qui utilisent les métaux comme catalyseurs (Fatehi-Hassanabad *et al.*, 2010). Dans les cellules phagocytaires telles les neutrophiles et les macrophages, l' $\text{O}_2^{\bullet -}$ est le principal agent bactéricide (Bandyopadhyay *et al.*, 2004). Une dismutation spontanée ou catalytique de l'anion superoxyde constitue une source majeure de H_2O_2 dans la cellule (Kim *et al.*, 2000). A pH physiologique, le superoxyde peut se protoner pour donner le radical hydroperoxyde ($\text{HO}_2^{\bullet}$) ce qui facilite son transport membranaire (Salvador, 2001). Comme les espèces actives redox, le superoxyde peut réduire certaines biomolécules (cytochrome *c*) et oxyder d'autres comme la vitamine C (Powers and Jackson., 2008). Dans les systèmes biologiques, la dismutation de l' $\text{O}_2^{\bullet -}$ peut conduire également à la formation de l'oxygène singulier ($^1\text{O}_2$). Ce dernier possède une courte demi-vie mais il est perméable aux membranes avec une très grande vitesse de diffusion. Le $^1\text{O}_2$ est la forme électronique excitée de l'oxygène et ce n'est pas un radical car ne contient pas un électron non apparié (Powers and Jackson., 2008).

1.1.2. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce non radicalaire, non chargé et peut facilement diffuser à travers les membranes cellulaires (Halliwell, 1992). Il se forme par une dismutation spontanée ou catalytique du radical superoxyde.

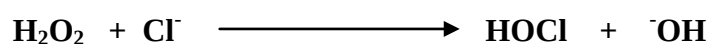


Cette espèce est cytotoxique mais elle est relativement un faible agent oxydant (Powers and Jackson., 2008). La cytotoxicité de H₂O₂ est due principalement à sa capacité de produire le radical hydroxyle dont il est une source potentielle de ce radical (Zhang et *al.*, 2015) . En présence des métaux de transition (le fer ou le cuivre) qui sont maintenues sous leur forme réduite par l'anion superoxyde (réaction de Haber-Weiss), le peroxyde d'hydrogène se transforme en radical hydroxyle (réaction de Fenton) (Bokare and Choi, 2014 ; Halliwell, 1995). La réaction globale est comme suivante :



Le peroxyde d'hydrogène est incapable d'oxyder directement l'ADN ou les lipides mais il est capable d'inactiver certains enzymes (Halliwell and Gutteridge, 2007). Dans les conditions physiologiques, le H₂O₂ est essentiel pour la biosynthèse des hormones thyroïdiens, activation des facteurs de la transcription nucléaire, activation des cascades thyrosine et essentiel pour l'activité des phospholipases (Kim et *al.*, 2000). Il agit encore comme une molécule de signalisation et régulateur des gènes intervenants dans les réponses immunitaires et de multiples processus physiologiques (Habibi, 2014). Le peroxyde d'hydrogène joue un rôle crucial dans la régulation de la mort cellulaire programmée (apoptose). Il a été montré que l'exposition à des faibles doses de H₂O₂ intervient dans l'apoptose d'un très grand nombre de

type cellulaire (Buttke and Sandstrom, 1994). Le H_2O_2 , en présence des concentrations physiologiques des ions de chlore (Cl^-), peut se transformer en acide hypochloreux (HOCl) par une myeloperoxydase (MPO) ; enzyme sécrétée par les phagocytes (Taniyama and Griendling, 2003).



Le HOCl endommage de variable biomolécules en agissant sur l'oxydation des groupements thiols, des lipides, la vitamine C et le NADPH avec la génération d'une variété de produits secondaires (Halliwell and Gutteridge., 2007). Dans sa forme acide, cet oxydant peut traverser les membranes cellulaires et causer de ce fait la fragmentation et l'agrégation des protéines par des réactions multiples (Halliwell and Gutteridge., 2007).

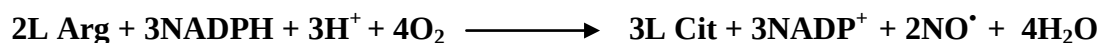
1.1.3. Le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$)

Le radical hydroxyle est hautement réactif, imperméable aux membranes biologiques mais il a un puissant potentiel oxydant (Powers and Jackson., 2008; Bandyopadhyay et al., 2004). Le degré élevé de sa réactivité lui confère une diffusion restreinte aux molécules de petits diamètres (Halliwell, 1991), généralement au voisinage de son site de formation (Powers and Jackson., 2008). Il possède une très courte demi-vie, environ 10^{-9} S, (Kehrer, 2000). Il se combine aux composants cellulaires dont la constante de combinaison est environ 10^9 - $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$ (Halliwell, 1995). C'est l'espèce radicalaire la plus toxique des ROS et sa grande réactivité rend sa détection dans l'organisme presque impossible où sa démonstration se fait par la révélation des produits spécifique de ses réactions (Powers and Jackson., 2008). Le radical hydroxyle n'existe pas dans les conditions physiologiques car ses précurseurs ($\text{O}_2^{\cdot-}$ et H_2O_2) sont piégés par leurs respectifs enzymes antioxydants (Kanter et al., 1985). A cause de la grande affinité, réactivité et des sites spécifiques du ce radical, il n'y'a aucun système de défense physiologique ou enzymatique contre cet oxydant (Bandyopadhyay et al., 2004).

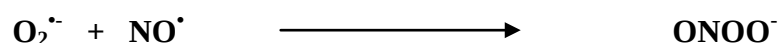
Ainsi, la présence de ce radical est un indicatif d'une large destruction tissulaire (Freeman and Carpo, 1982). L'interaction de radical hydroxyle avec les purines et les pyrimidines produit plus de 100 types de nucléotides modifiés dans l'ADN (Oliński et *al.*, 2003).

1.1.4. Le monoxyde d'azote (NO[•])

Le monoxyde d'azote est une petite molécule qui contient un électron non apparié, un radical libre. Il est généré dans différents tissus par des nitrique oxyde synthases (NOS) spécifiques qui métabolisent le L-argénine en citrulline et le monoxyde d'azote (Duran et *al.*, 2010 ; Powers and Jackson, 2008 ; Palmer et *al.*, 1988).



Le NO[•] se lie facilement aux métaux de transition dont sa principale action dans la cellule est sa capacité à se lier aux ions ferreux de guanyl cyclase (GTP : guanosine-5'-triphosphate) en activant cet enzyme qui résulte à la formation de cGMP (guanosine monophosphate cyclique) et l'initiation de la voie de signalisation de la vasodilatation (Gaucher et *al.*, 2013). La liaison de NO[•] aux ions ferreux de l'hémoglobine joue encore un rôle crucial dans son inactivation et son élimination (Powers and Jackson, 2008). Le NO[•] est l'oxydant le plus abondant des radicaux réactifs, il agit comme une importante molécule de signalisation dans une large variété de processus physiologiques tels la régulation de la pression sanguine, la transmission neuronale et la régulation immunitaire (Vasilets et *al.*, 2015 ; Howard et *al.*, 2014). Le monoxyde d'azote est soluble dans les phases aqueuse et lipidique, il diffuse rapidement à travers les membranes plasmiques et le cytoplasme. Dans les sites enflammés, telle l'obésité, le système immunitaire produit à la fois le superoxyde et le monoxyde d'azote qui réagissent ensemble pour former une quantité importante de l'anion peroxydinitrite (ONOO⁻).



Ce dernier est un puissant agent oxydant qui agit sur la fragmentation d'ADN et cause la peroxydation lipidique (Pacher et *al.*, 2006). Le peroxynitrite peut se réagir aux divers biomolécules par des réactions à un ou à deux électrons, il réagit aisément avec le dioxyde de carbone (CO_2) pour former une espèce hautement réactif ; le nitroso peroxocarbonate (ONOOCO_2^-), ou se protone en nitroperoxyde (ONOOH) qui se radiolyse en radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) et le dioxyde d'azote ($\text{NO}_2^\cdot$) ou il subit un réarrangement pour former le nitrate (NO_3^-) (Nordberg and Arn'ér, 2001). Cette espèce de nitrogène et sa forme protoné ou le nitroperoxyde (ONOOH) endommagent l'ADN et agissent sur l'arrachement des groupements thiols et la nitration des protéines (Powers and Jackson, 2008).

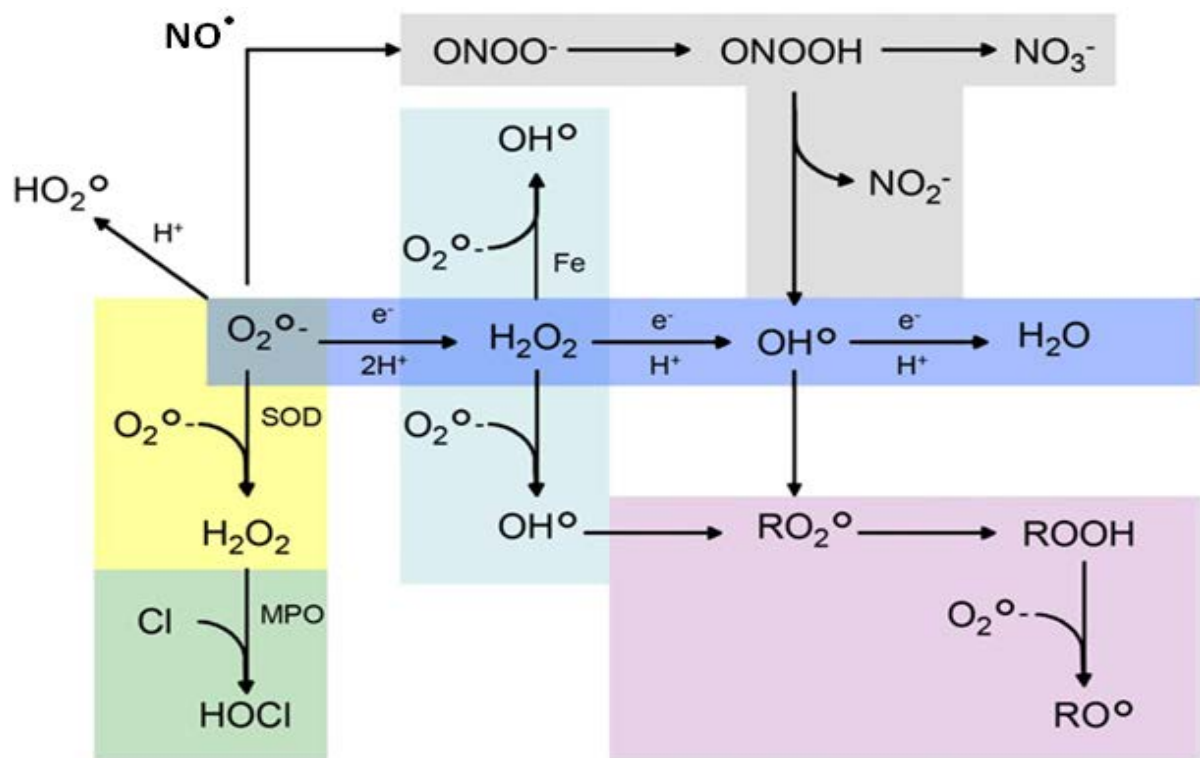


Figure 2. Les espèces réactives majeures dans la cellule et leurs dérivés.

1.2. Sources des radicaux libres

La cellule est toujours exposée à une large variété de ROS et RNS d'origine exogène et/ou endogène.

1.2.1. Sources exogènes

Dans la cellule, la majorité des composés redox se trouve sous forme réduite (RH_2). Ces composés réagissent avec l'oxygène moléculaire (réactions d'auto-oxydations) ; c'est généralement le cas de plusieurs composés qui procèdent leurs réactions par la voie d'un électron pour produire le radical superoxyde (Bartosz, 2003). L'auto-oxydation des catécholamines est probablement une source importante des radicaux libres dans quelques tissus. Pour cette raison, le 6-hydroxydopamine est suggéré être la neurotoxine impliquée dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson (Soto-Otero et *al.*, 2002). L'auto-oxydation de l'adrénaline et d'autres catécholamines peut être une source majeure de stress oxydant dans le muscle cardiaque (Behonick et *al.*, 2001). Dans le système biologique, les ions en métal (en particulier les ions ferreux et de cuivre) catalysent l'auto-oxydation des groupements thiols des protéines (Thomas and Mallis, 2001) et les radicaux thiyls ($RS^\cdot$) formés peuvent se réagir avec l'oxygène en produisant le superoxyde (Exemple : le radical thiyl de glutathion). Les ions en métal des métalloprotéines sont aussi ciblés par l'auto-oxydation. Dans les érythrocytes, la principale source des ROS est l'auto-oxydation de l'hémoglobine. En présence des donneurs d'électrons, une réduction à deux électrons de l'hémoglobine peut avoir lieu et conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène (Bartosz, 2003). La forme réduite des groupements prosthétiques des enzymes et des coenzymes peut aussi réagir avec l'oxygène et donner naissance au radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène qui sont généralement formés comme des sous produits des réactions enzymatiques impliquant la réduction de ces groupements (Bartosz, 2003).

Une autre source exogène des ROS est la molécule d’ozone (O_3), elle est essentielle pour éliminer la toxicité des radiations UV-C et sa présence dans la couche extrême de l’atmosphère est très importante, mais elle agit aussi comme une espèce destructive des tissus biologiques (Bhalla, 1999; Kohen, 1999) par sa décomposition en radical hydroxyle (Khuntia et *al.*, 2015). L’ozone n’est pas un radical mais il est un puissant agent oxydant qui peut oxyder directement les composants biologiques (Rao and Davis, 2001).

L’exposition de l’organisme vivant aux radiations ionisées ou non ionisées constitue une autre source de ROS (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007 ; Shadyro et *al.*, 2002 ; Pentland, 1994). Les radiations ionisées peuvent induire des endommagements aux cellules vivantes comme l’altération de l’AND et les mutations génétiques, la mort cellulaire et le cancer (Riley, 1994). La pluparts des effets toxiques des radiations ionisées sont dus par la médiation des ROS (Tulard et *al.*, 2003). L’exposition de la cellule aux rayonnements γ conduit à la production d’une large gamme des espèces radicalaires et non radicalaires par l’ionisation des molécules d’eau intracellulaire ($\cdot OH$, H_2O_2). De même, l’exposition aux rayonnements non ionisées telles UV-C (290 nm), UV-B (290-320 nm) et UV-A (320-400 nm) peut indirectement former une variété de ROS incluant 1O_2 , H_2O_2 et $O^{\cdot -}_2$, le clivage hémolytique de H_2O_2 par les rayonnements UV produit le $\cdot OH$ (Kohen and Nyska, 2002).

Les polluants de l’air, les gaz échappés des véhicules, la fumée des cigarettes et les contaminants industriels qui contiennent une grande quantité des dérivés de monoxyde d’azote, constituant encore une source importante de ROS qui attaquent et endommagent l’organisme que ce soit par interaction directe avec la peau ou après inhalation dans les poumons (Koren, 1995 ; Victoria, 1994).

Les médicaments sont aussi une source majeur de ROS (Rav et *al.*, 2001 ; Naito et *al.*, 1998). Certains médicaments utilisent les ROS comme des médiateurs de leurs mécanismes

d'action et les autres les produisent indirectement. Les médicaments calmants ou sédatifs et les gaz anesthésiques contribuent également à la production des ROS (Chinev et *al.*, 1998).

Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides et herbicides) et de produits chimiques (alcools) produisent les ROS comme des produits secondaires de leur métabolisme *in vivo* (Jones et *al.*, 2000 ; Obata et *al.*, 2001 ; Wormser et *al.*, 2000 ; Elsayed et *al.*, 1992).

L'invasion par des agents pathogène, des bactéries et des virus peut conduire à la formation de plusieurs espèces oxygénées que se soit par les envahisseurs eux mêmes ou suite à une réponse endogène induite par les phagocytes et les neutrophiles (Kohen and Nyska, 2002).

La plus importante source des oxydant sont les aliments (Kanner and Lapidot, 2001; Lijinsky, 1999 ; Ames, 1986), une large portion des aliments qu'on consomme sont oxydés et contiennent différents types des oxydants tels les peroxydes, les aldéhydes, les acides gras oxydés et les métaux de transition (Ames, 1986).

1.2.2. Sources endogène

1.2.2.1. Les chaines de transport des électrons (CTE)

Les mitochondries sont une source majeur des espèces oxygénées dans la cellule (Yan et *al.*, 2013 ; Desai et *al.*, 2010 ; Poyton et *al.*, 2009). Le superoxyde est produit en permanence comme un produit secondaire de la respiration cellulaire (Raha and Robinson, 2000). Lors du passage des électrons de complexe I au complexe IV de la chaine respiratoire mitochondriale, une fuite d'électrons se produit toujours et conduit à la formation de superoxyde (1% de total des électrons transportés) (Velayutham et *al.*, 2011 ; Green et *al.*, 2004). Dans des conditions physiologiques, ce radical est converti en peroxyde d'hydrogène par la Mn-SOD de la matrice mitochondriale (Green et *al.*, 2004). La formation de H₂O₂ et sa transformation en radical hydroxyle se produit particulièrement au cours de

dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Raha and Robinson, 2000). Les complexes I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) et III (ubiquinone-cytochrome c réductase) de la chaîne respiratoire mitochondriale sont responsables de la plupart de superoxyde produit (Velayutham et *al.*, 2011 ; Raha and Robinson, 2000). *In vivo*, le complexe I est le responsable majeur de la production des ROS mitochondriales (St-Pierre et *al.*, 2002).

D'autres chaînes de transport d'électron se trouvent aussi au niveau des peroxysomes et des microsomes et contribuent également à la production du superoxyde dans les cellules en aérobiose. Au niveau des microsomes, les cytochromes P450 et b5 sont des sources des radicaux libres en libérant le superoxyde. Ils produisent encore des radicaux qui dérivent des xénobiotiques. Les cytochromes réductases, impliqués dans le cycle de ces cytochromes, libèrent aussi le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Bernhardt, 1996; Cederbaum, 1991). Dans les peroxysomes se forme le H_2O_2 et $O^{\bullet}_2$ et implique une série d'enzymes oxydases peroxysomales incluent acyl-CoA oxydase et la xanthine oxydase (Klaunig et *al.*, 2011). En outre, la présence de l'enzyme iNOS conduit à la formation de radical $NO^{\bullet}$ (Fransen et *al.*, 2012). La quantité des oxydases et de H_2O_2 produites varie parmi les cellules et les tissus. Dans le foie du rat, les peroxysomes produisent environ 35% de tout le H_2O_2 cellulaire et qui fait 20% du total de l'oxygène consommé (Schrader and Fahimi, 2006).

L'enveloppe nucléaire contient également une chaîne de transport d'électron de fonction inconnue qui peut libérer le superoxyde en présence du NADH ou du NADPH. Cette source des ROS peut être d'une grande importance due à sa proximité de génome nucléaire (Vartanian and Gurevich, 1989).

1.2.2.2. Les voies métaboliques de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est catabolisé par trois voies principales dans la cellule ; La première voie est celle des cyclooxygénases (COX) qui sont des enzymes clefs dans la

cascade synthétique des prostaglandines. Ce mécanisme physiologique peut contribuer à la production des ROS soit directement au cours de la conversion catalytique de prostaglandine G2 en H2 (Kim et *al.*, 2001), soit indirectement à travers les altérations provoqués par les prostaglandines au cours des processus inflammatoires (Lemos et *al.*, 2009).

La voie alternative de la production des ROS est celle des cytochromes P450 (CYP) qui catalysent le métabolisme de l'acide arachidonique en acide époxyeicosteïnoïque (EET). Les CYP époxygénases, en particulier les CYP 2C9, sont une source importante des ROS intervenants dans la diminution de bioviabilité de NO[•] et l'activation de NFκB (Fleming et *al.*, 2001). Des études récentes ont montré l'implication de différents isoformes des CYP vasculaires dans la production significative des ROS.

La troisième voie de catabolisme d'acide arachidonique est celle des lipooxygénases (LOX) qui interviennent par leurs réactions de peroxydations à la formation des LDL oxydés (Folcik et *al.*, 1995; Yla-Herttuala et *al.*, 1995).

1.2.2.3. Le système cellulaire

Les globules blancs, incluent les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les mononucléaires (monocytes) et les lymphocytes, dans leurs mécanismes de défense contre les bactéries et les corps étrangers (Forman and Torres, 2001) sont des principaux producteurs de ROS endogènes et d'autres facteurs agissant en synergie avec les ROS (Ginsburg, 1998). Suite aux stimuli, une consommation vingt fois doublée de l'oxygène par ces cellules est produite, phénomène de la flambée respiratoire, qui est accompagnée par l'augmentation de la quantité du glucose catabolisé et une production de NADPH par la voie des pentoses phosphate (Babior et *al.*, 2002). Le NADPH sert comme un donneur d'électrons pour les complexes enzymatiques membranaires. Le complexe NADPH oxydase utilise ces électrons pour réduire l'O₂ et produire l'O₂^{•-}. La dismutation de l'O₂^{•-} produit le H₂O₂ qui, en présence

des métaux de transition, se transforme en radical $\cdot\text{OH}$ (Kohen and Nyska, 2002). Les enzymes lysosomales, la myéloperoxydase des neutrophiles et des monocytes/macrophages et la peroxydase des éosinophiles (EPO) catalysent l'oxydation des halogènes (Cl_2 , Br_2 , et I_2) par le H_2O_2 pour former les acides hypohalous (HOCl ou HOBr). La MPO produit principalement l'acide hypocloreux (HOCl) tandis que l'EPO produit en prédominance l'acide hypobromeux (HOBr) (Caramori and Papi, 2004).

Le NADPH oxydase se trouve aussi dans des cellules non phagocytaires telles que les cellules endothéliales, les cellules vasculaires de muscles lisses, les fibroblastes et la plupart des cellules de l'organisme (Geiszt, 2006). Il produit de petites quantités de ROS qui agissent (influencent) sur la croissance, la migration, la prolifération et l'activation des cellules vasculaires (Cai, 2005 ; Touyz *et al.*, 2003). Cette production physiologique de ROS implique dans la régulation de volume vasculaire par modulation directe de la vasodilatation (Shimokawa and Matoba, 2004) ou indirectement par la diminution de la bioviabilité de monoxyde d'azote par sa transformation en peroxynitrite (ONOO^-) par son interaction avec le peroxyde (Kajiya *et al.*, 2007).

1.2.2.4. La xanthine oxydase (XO)

Le système enzymatique xanthine oxydoréductase (XOR) est bien longtemps identifié comme une potentielle source cellulaire de la génération de l'anion superoxyde (Romao *et al.*, 2015). La XOR est largement distribuée dans l'organisme vivant, elle se trouve chez les bactéries (Woolfolk and Downard, 1977), les végétaux et l'homme (Kooij *et al.*, 1992). Dans les tissus des mammifères, la XO a été longtemps connue pour être un constituant majeure de la membrane des globules gras du lait bovin (Martin *et al.*, 2004). La XOR est un molybdoenzyme, a deux formes interconvertibles, la xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO). Les deux formes catalysent la conversion de l'hypoxanthine en

xanthine et la xanthine en acide urique qui est le produit final du catabolisme des purines chez l'homme (Waud and Rajagopalan, 1976). Les deux formes réduisent l'oxygène moléculaire mais la forme D peut réduire aussi le NAD qui est son préférable accepteur d'électrons (Martin *et al.*, 2004).

La XOR produit de l'O₂^{•-} et de H₂O₂, ces deux espèces oxygénées peuvent être des précurseurs des autres espèces réactives soit de l'oxygène (ROS) ou de nitrogène (RNS) qui sont impliquées dans les grands dommages cellulaires et tissulaires. La XOR joue un rôle important dans différentes formes de pathologies humaines telles que les maladies inflammatoires, les lésions post-ischémiques, les dommages tissulaires et vasculaires et les maladies cardiaques chroniques (Pacher *et al.*, 2006).

La XOR joue un rôle principal dans les phénomènes inflammatoires (Meneshian and Bulkley, 2002). Ceci a été suggéré suite à l'hypothèse impliquant la contribution de l'enzyme dans les lésions post-ischémiques qui a été proposée par Granger et ses collaborateurs (1981) (**figure 3**). Les lésions post-ischémiques surviennent suite à une diminution de la perfusion sanguine vers des tissus spécifiques ce qui conduit à la mort cellulaire (Martin *et al.*, 2004). Au cours de l'ischémie, le statut d'énergie cellulaire est épuisé, conduisant à un déséquilibre de gradients ioniques transmembranaire et à une augmentation du flux calcique intracellulaire. Ceci déclenche la conversion irréversible de la XDH en XO par l'activation des protéases Ca²⁺-dépendantes. Concomitamment, l'ATP cellulaire est catabolisé en substrats de la XO, l'hypoxanthine et la xanthine, dont leur accumulation pendant l'état ischémique permet la production de l'O₂^{•-} et de H₂O₂ lors de la ré-oxygénation post-ischémique (reperfusion) (Raedschelders *et al.*, 2012). Les espèces radicalaires produites au cours de l'ischémie-reperfusion vont impliquer dans les lésions tissulaires post-ischémiques, mais aussi elles vont être comme des agents initiateurs de l'infiltration des neutrophiles aux sites enflammés. Les neutrophiles activés produisent à leur tour, par différents systèmes enzymatiques, des grandes

quantités d'espèces radicalaires qui seront impliquées dans différentes lésions tissulaires d'origine inflammatoires et elles agissent aussi sur la digestion des agents infectieux (Carden and Granger, 2000).

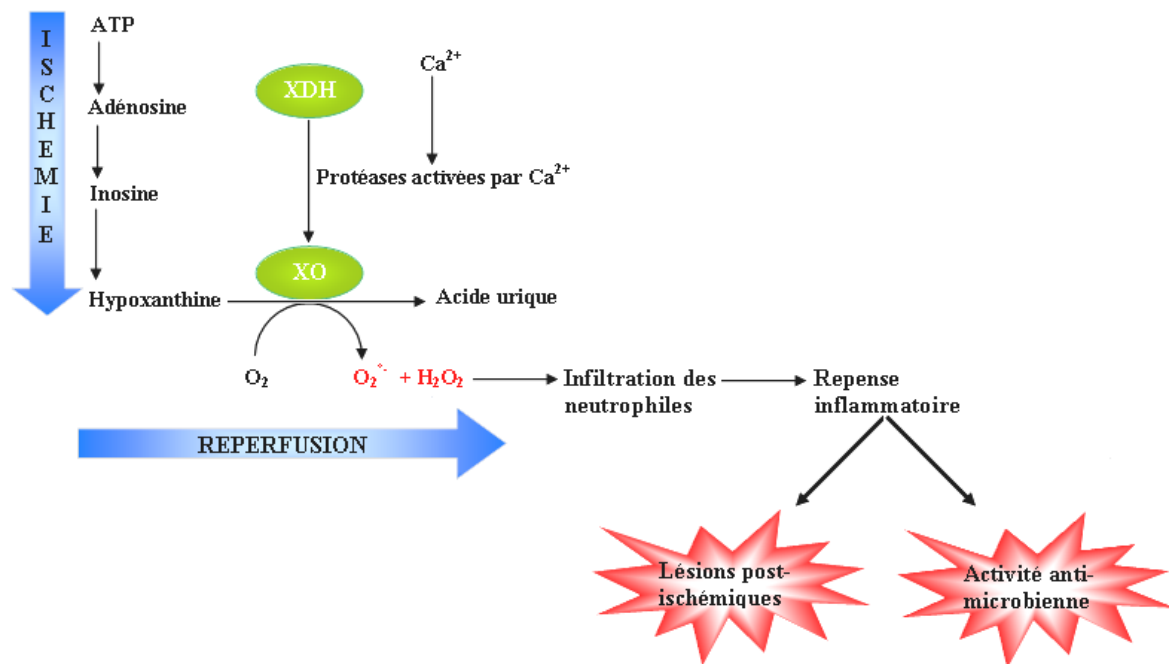


Figure 3. Mécanisme de la production des ROS par la XOR et leur implication dans la réponse inflammatoire et les lésions post-ischémiques (Martin *et al.*, 2004).

1.2.2.5. Nitric Oxide Synthase (NOS)

Le radical monoxyde d'azote est synthétisé à partir de L-arginine par différents types cellulaires. Sa production se fait par les enzymes NOS qui se trouvent sous trois isoformes ; neuronale (nNOS), inducible (iNOS), et endothéliale (eNOS) (Vasilets *et al.*, 2015 ; Gaucher *et al.*, 2013 ; Dröge, 2002 ; van der Vliet *et al.*, 1999). Plusieurs tissus expriment un ou plusieurs de ces isoformes. L'expression de la nNOS et eNOS est constitutive mais leur activité est régulée par la concentration intracellulaire en calcium, alors que l'expression de la

iNOS est induite, dans les macrophages, par différents stimuli (cytokines, lipopolysaccharides et d'autres stimuli immunologiques) (Dröge, 2002). Les trois isoformes de NOS sont des générateurs importants du radical NO[•] (Vasilets et *al.*, 2015 ; Madamanchi, 2005 ; van der Vliet et *al.*, 1999). Ce dernier permet la production des autres RNS (NO[•]₂, ONOO⁻, ONOOH) qui se diffusent rapidement dans l'organisme et ils sont sécrétés dans les urines (van der Vliet et *al.*, 1999).

1.3. Cibles cellulaires des oxydants

En raison de leurs réactivités élevées, les ROS/RNS ont la prédisposition à causer des endommagements à la cellule. Les biomolécules, notamment l'ADN, les lipides et les protéines (Fibach and Dana, 2015), sont la cible privilégiée des oxydants où leurs oxydation provoque des lésions directes à la cellule mais aussi des lésions secondaires dues aux caractères cytotoxique et mutagène des métabolites libérés surtout lors de l'oxydation lipidique (Favier, 2003).

1.3.1. La peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés (AGPI), localisés dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires, sont les plus susceptibles à l'attaque radicalaire (Sanders and Greenamyre, 2013 ; Kruidenier and Verspaget, 2002). Le [•]OH est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué. Ce dernier s'oxyde en radical peroxy qui forme une réaction en chaîne, car son contact avec un autre acide gras forme le peroxyde et un nouveau radical diène conjugué. Les hydroperoxydes peuvent se transformer en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) alors que le radical peroxy, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différentes aldéhydes toxiques dont le malonaldialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonenal (HNE) (**figure 4**). Ces aldéhydes ont montré une réactivité avec les

protéines et l'ADN et forment des adduits sur ces macromolécules (Klaunig et *al.*, 1998 ; Uchida and Stadtman, 1993). Les acides gras oxydés peuvent altérer l'intégrité et la fonction des membranes lipidiques, et sont en conséquence détachés et libérés par les phospholipases (Stafforini et *al.*, 2006).

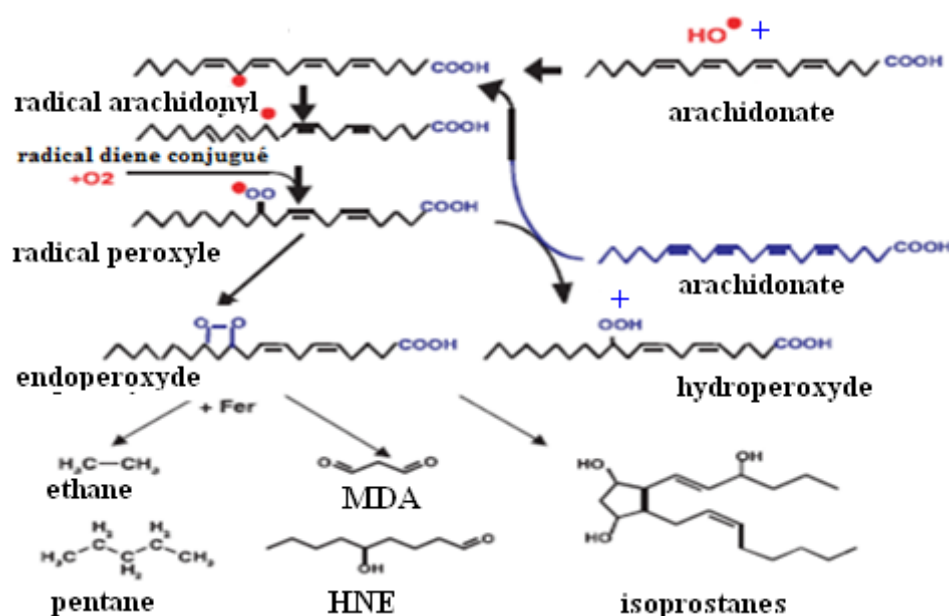


Figure 4. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Favier, 2003).

1.3.2. L'oxydation des protéines

Les ROS peuvent agir directement ou indirectement sur les protéines et induisent l'oxydation de la chaîne polypeptidique, le clivage des liaisons peptidiques, des interactions protéine-protéine et des modifications sur la chaîne latérale des acides aminés (Kelly and Mudway, 2003). De même leurs interactions avec les sucres et les lipides engendrent des sous produits qui réagissent avec les protéines (Freeman et *al.*, 2009 ; Klaunig et *al.*, 1997). Les ROS peuvent endommager les protéines d'une manière réversible telle que l'oxydation de groupement sulfhydryle (SH) de la méthionine, ou irréversible comme la modification des groupements amines de la chaînes latéral des acides aminés spécifiques en groupements

carbonyles (Sanders and Greenamyre, 2013). La composition en acides aminés, en particulier les résidus cystéine et méthionine, peut rendre la protéine plus susceptible à l'attaque oxydatif (Kelly and Mudway, 2003). Les dommages oxydatifs des protéines peuvent avoir des conséquences biologiques importantes. Ils peuvent altérer les niveaux d'expression et/ou conférer une perte toxique ou un gain de fonctions. L'oxydation des enzymes, des récepteurs et des anticorps peuvent influencer le fonctionnement cellulaire ; les protéines oxydées peuvent exercer des effets sur la régulation, le métabolisme, le transport et les voies de transduction de signal qui peuvent altérer des fonctions cruciales dans la cellule (Sanders and Greenamyre, 2013).

1.3.3. L'oxydation de l'ADN

Le stress oxydant et l'accumulation des ROS/RNS peuvent engendrer de multiples lésions à l'ADN, incluent des modifications directes des bases nucléotidiques, formation des sites apuriniques/apyrimidiniques, coupure de la chaîne simple brin (CSB) et beaucoup moins fréquent des coupures double brin (CDB).

Parmi toutes les bases nucléotidiques, la guanine (G) est plus susceptible aux modifications oxydatives car elle possède le plus faible potentiel réducteur. Le radical hydroxyle interagit avec le noyau imidazole de la guanine et conduit à la formation de 8-hydroxyguanosine (8-OxoG) qui est présent dans une large variété de maladies (Cooke *et al.*, 2003). Cette modification oxydante représente une potentielle lésion mutagénique d'ADN, car le 8-OxoG peut subir un réarrangement dans sa configuration qui lui permet d'apparier d'une manière aberrante à l'adénine et favoriser ainsi la transversion de G vers le T (Bruner *et al.*, 2000). Le peroxy-nitrite est capable aussi d'interagir avec la guanine pour former le 8-nitroguanine (8-NO(2)-G) qui est considéré comme un marqueur des dommages nitrosatifs

d'ADN. Des modifications similaires, oxydatives/nitrosatives, ont été encore rapportées sur l'adénine, la thymine et la cytosine (Dizdaroglu and Jaruga, 2012).

Ces modifications oxydantes directes des bases nucléotidiques est à l'origine de la création des sites apuriques/aprimidiniques (AP) le long d'ADN où la présence de 8-OxoG stimule le système de réparation par excision de bases (BER : base excision repair) ayant pour résultat l'élimination de la guanine oxydée par les glycosylases, 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) (Hazra et *al.*, 2001).

Les ROS interagissent encore avec la partie glucidique des nucléotides et forment une variétés de produits oxydants conduisant à la formation des sites AP par le détachement des bases libres ou par initiation de l'activité de système réparation par excision de bases (BER ; AP endonucléases) (Wilson et *al.*, 2003; Demple and DeMott, 2002). Dans des conditions physiologiques, il est estimé qu'il ya production de 50,000 à 200,000 sites abasiques/cellule/jour.

Le stress oxydant peut induire aussi, sur la molécule d'ADN, une coupure de la chaine simple brin (CSB) et double brin (CDB). La CSB se produit après l'interaction de radical hydroxyle avec le désoxyribose et la génération ultérieure de radical peroxy. Ce dernier est alors responsable de la coupure des liaisons phosphodiester qui forment la structure de chaque brin hélicoïdal d'ADN (Dedon, 2008). Cela peut se produire aussi par le système de réparation par excision de base (BER) au cours de réparation des sites AP (Hegde et *al.*, 2008). Les CSB étroitement associés sur le brin complémentaire d'ADN peuvent aussi résulter à la formation des CDB. In vitro, le peroxynitrite a été montré comme un médiateur potentiel des CDB (Jia et *al.*, 2009).

Le système de réparation cellulaire doit corriger ces modifications oxydantes d'ADN avant ou au cours de la réplication sinon ils provoquent la mort cellulaire, les mutations, induction de la transcription et les voies de signalisation, des erreurs dans la réplication et

l'instabilité de génome et tous ça a été associé aux processus cancérogénèses (Valko *et al.*, 2006 ; Klaunig and Kamendulis, 2004 ; Cooke, 2003 ; Marnett, 2000).

1.4. Systèmes antioxydants

L'exposition continue aux divers types de stress oxydatif, issus de multiples sources, conduit la cellule et tout l'organisme à développer un mécanisme de défense antioxydant pour mieux se protéger contre les métabolites réactifs. Ce mécanisme antioxydant peut agir avec de multiples stratégies incluent : (1) l'élimination catalytique ou enzymatique des espèces réactives ; (2) le piégeage, (scavenger), des espèces réactives par des agents à faibles poids moléculaires d'origines cellulaires ou proviennent de régime alimentaire ; (3) la minimisation de la disponibilité des pro-oxydants comme les métaux de transitions ; et (4) la protection des biomolécules par les protéines, qui enlèvent ou facilitent la réparation des protéines endommagées (Halliwell and Gutteridge, 1999).

La première stratégie antioxydante est enzymatique et consiste à éliminer ou à détruire les superoxydes et peroxydes. Les superoxydes dismutases (SOD) sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation dont l'un des superoxydes sera oxydé et l'autre sera réduit (Fridovich, 1975) pour former une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène, respectivement. Chez l'homme, la SOD existe sous trois isoformes et chaque forme nécessite la présence d'un métal de transition, à une action redox active, dans leur site actif pour accomplir la fonction catalytique sur le superoxyde (Suzuki *et al.*, 2000). Deux isoformes sont localisées dans la cellule et la troisième se trouve dans l'espace extracellulaire. La première utilise le cuivre et le zinc comme cofacteur (Cu/Zn-SOD), elle se trouve dans le cytosol et l'espace intermembranaire mitochondriale, la deuxième est associée au manganèse (Mn-SOD), elle se trouve dans la matrice mitochondriale et la troisième est associée encore au cuivre et le zinc (Cu/Zn-SOD) et se localise dans l'espace extracellulaire

(Powers and Jackson, 2008). Le produit final de la dismutation, H_2O_2 , est peut être éliminé par les catalases (CAT) et les membres de la famille des peroxydases tel que le glutathion peroxydase (GPx). Les catalases sont des homotétramères à cofacteur fer, localisés en prédominance dans les peroxysomes (Fransen et *al.*, 2012) et sont responsables de l'élimination d'une grande quantité de peroxyde d'hydrogène (Abuja and Albertini, 2001). Malgré que les catalases ont montré une faible affinité aux peroxydes mais ils devraient être utiles lors des productions élevées ou accumulation de H_2O_2 (Pamplona and Costantini, 2011). Les glutathion peroxydases sont des enzymes à sélénium largement distribués dans le cytoplasme, mais aussi dans les mitochondries et les peroxysomes (Singh et *al.*, 1994). Chez l'homme, cinq isoformes de GPx à sélénium ont été identifiés (Behne and Kyriakopoulos, 2001), ils catalysent la réduction de H_2O_2 et les hydroperoxydes organiques (ROOH) en molécules d'eau (H_2O) et alcools (ROH), respectivement, en utilisant le glutathion réduit (GSH) et dans certains cas la thioredoxine (TRX) ou le glutaredoxine (GRX) comme donneurs d'électrons (Holmgren et *al.*, 2005). En plus de ces enzymes antioxydants primaires, la cellule est disposée d'un autre système enzymatique contribue au maintien de l'équilibre redox. La thioredoxine réductase est une enzyme antioxydante contribue à la réduction des hydroperoxydes et fonctionne comme une NADPH-deshydroascorbate réductase pour la régénération de la vitamine C (Arner and Holmgren, 2000). Les peroxiredoxines (PRx : thioredoxine peroxydase) sont des peroxydases monomériques thiol-dépendant, ils peuvent réduire le peroxyde d'hydrogène en molécules d'eau, les alkyles hydroperoxydes en alcools et le peroxynitrite en nitrite (ONO^-) (Knoops et *al.*, 2011).

Une autre stratégie antioxydante est de nature non enzymatique, elle est réalisée par des antioxydants à faible poids moléculaires. Quelques protéines sont des chélateurs de métaux de transition, de ce fait ils empêchant la génération des radicaux hydroxyles (Halliwell and Gutteridge, 1990) par la réaction d' Haber-Weiss. Le fer intracellulaire est

capté par la ferritine et le fer extracellulaire est capté par la transferrine et le lactoferrine (Seib et *al.*, 2006). La transferrine est capable de piéger jusqu'à deux atomes de fer ferrique (Fe^{3+}). L'oxydation de Fe^{2+} en ion ferrique (Fe^{3+}) est réalisée par des ferroxidases (ceruloplasmine), cette activité oxydante favorise la capture du fer par la ferritine et limite ainsi la quantité de ce métal qui pourrait former des ROS dans les vaisseaux sanguins. Les lactoferrines ne participent pas au transport du fer et leur affinité pour ce métal est bien plus élevée que celle de la transferrine (Seib et *al.*, 2006). Dans les polynucléaires, générateurs d' H_2O_2 , le rôle de la lactoferrine serait d'éviter toute réaction de cet hydroperoxyde avec le fer (Seib et *al.*, 2006). L'albumine une autre protéine plasmatique qui joue le même rôle que la transferrine mais en captant l'ion cuivreux, elle peut aussi inhiber l'oxydation des lipoprotéines induite par les métaux de transition (Stocker and Keaney, 2004). L'albumine se trouve liée à une bilirubine, un autre composé de grand pouvoir antioxydant (Stocker et *al.*, 1987). L'albumine libre ou liée peut réduire le radical $\alpha\text{-TO}^\bullet$ et peut inhiber la peroxydation lipidique (Neuzil and Stocker, 1994).

D'autres antioxydants de faible poids moléculaire agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou en ions stables (Kinsky, 1989). Ces antioxydants peuvent être des composés endogènes dont le plus important est le glutathion, mais aussi les thioredoxines, les glutaredoxines et l'urate. D'autres composés apportés par les aliments peuvent avoir le même comportement. Le glutathion est un tripeptide à un groupement thiol formé de trois acides aminés, glutamate-cystéine-glycine, présent soit sous forme réduite (GSH) soit sous forme oxydée (GSSG) (Kohen and Nyska, 2002). Le GSH peut réagir directement aux divers radicaux en leur donnant un atome d'hydrogène (Yu, 1994). Il peut réduire les radicaux libres tels que HOCl , $\text{LO}^\bullet$, $\text{LOO}^\bullet$, $\text{l'O}_2^\bullet$ et d'autres radicaux de nitrogène et de carbone pour former le radical thiyl ($\text{GS}^\bullet$) (Halliwell and Gutteridge, 1999). Le GSH réduit le H_2O_2 et/ou les peroxydes organiques grâce à la

réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx) (Seib et al., 2006). Le GSH implique aussi dans la réduction de certains antioxydants comme les vitamines E et C oxydés (Powers and Jackson, 2008). En outre, il prévient l'oxydation des protéines à un groupement SH (Gul et al., 2000), il intervient dans la réparation des lésions d'ADN d'origine oxydative et le protège contre l'apoptose induite par les espèces réactives et les cytokines (Xu et al., 1998 ; Zucker et al., 1997), ainsi il peut agir comme un agent chélateur des ions de cuivre et prévient leur participation à la réaction d'Haber-Weiss (Kohen and Nyska, 2002).

L'acide urique est un sous produit de catabolisme des purines chez l'homme et il est potentiellement un important antioxydant à faible poids molécules dans les liquides biologiques humains (Hellsten et al., 1997). L'urate, la forme physiologique de l'acide urique, réagit avec le radical hydroxyle et se transforme en radical urate qui sera, par la suite, régénéré par l'acide ascorbique (Vit C) (Kohen and Nyska, 2002). Ce composé représente 60% de l'activité antioxydante plasmatique et elle peut directement piéger l'^1O_2 , $LOO^{\bullet}$, $CO^{\bullet}_3$, $NO^{\bullet}_2$ et $l'ONOO^-$ (Stocker and Keaney, 2004). L'urate peut prévenir la nitration des protéines par la chélation des métaux de transition tels que le cuivre et le fer et les empêche de participer aux réactions redox (Kohen and Nyska, 2002).

Le co-enzyme Q10 (ubiquinone) est synthétisé par la cellule et serve comme un cofacteur de la chaîne de transport d'électron mitochondriale (Powers and Jackson, 2008). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique et de l'oxydation protéique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxydes, comme il peut aussi impliquer dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (Stocker and Keaney, 2004).

La plus importante source des antioxydants réducteurs est représentée par l'alimentation. Un grand nombre de molécules antioxydantes se trouve dans les légumes verts, les fruits et les poissons, y compris de petites molécules telles que l'acide ascorbique,

les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols (Kohen and Nyska, 2002). La vitamine C ou l'acide ascorbique est hydrosoluble, elle est largement distribuée dans les tissus des mammifères et fonctionne mieux dans les environnements aqueux (Powers and Jackson, 2008). La vitamine C peut piéger directement l' $O_2^{\bullet-}$, l' $OH^{\bullet}$ (Comhair and Erzurum, 2002 ; Carr and Frei, 1999) et les radicaux hydroperoxydes lipidique (Carr and Frei, 1999). Ainsi, elle prévient la formation des radicaux hydroperoxydes au niveau des lipoprotéines plasmatique (LDL) par son effet réducteur sur le radical tocophérol ($\alpha\text{-TO}^{\bullet}$) formé lors de sa réaction au radical peroxyde lipidique (Sies et al., 1992). L'acide ascorbique peut réduire aussi le radical thiyl ($GS^{\bullet}$), permettant de ce fait la régénération de glutathion réduit (GSH) qui est un agent antioxydant (Stocker and Keaney, 2004). Contrairement à la vitamine C, la vitamine E (tocophérol) est hydrophobe, c'est l'antioxydant le plus répandus dans la nature, se trouve lier aux membranes pour terminer les réactions en chaine de la peroxydation lipidique par le piégeage des radicaux peroxydes (LOO) (Davies, 1995 ; Avissar et al., 1994). La vitamine E est représentée par huit structures isomères dont tous possèdent des activités antioxydantes mais la forme la plus active est l' α -tocophérol ($\alpha\text{-TocH}$), car les autres formes ne sont pas retenues et absorbées par les tissus de l'organisme (Kohen and Nyska, 2002). L' $\alpha\text{-TocH}$ réagit rapidement avec les radicaux peroxydes avant que ces radicaux peuvent réagissent avec les acides gras et les protéines (Siân et al., 2006). L' $\alpha\text{-TocH}$ peut interagir directement avec l' $O_2^{\bullet-}$ (Fukuzawa and Gebicki, 1983), le radical $OH^{\bullet}$ (McCay, 1985 ; Fukuzawa and Gebicki, 1983) et l' 1O_2 (Kohen and Nyska, 2002). Le radical tocophérol ($\alpha\text{-TO}^{\bullet}$) formé peut être régénéré par la vitamine C ou être métabolisé et excrété dans les urines (Siân et al., 2006). Similairement à la vitamine E, les caroténoïdes sont des pigments liposolubles, de couleur jaune, orangée à rouge, synthétisés par les plantes et les microorganismes. Ils font partie des micronutriments qui participent aux défenses de l'organisme contre les ROS (Cuzzocrea et al., 2001). Ce sont des piègeurs de l' 1O_2 et LOO, mais ils peuvent également neutraliser les radicaux libres

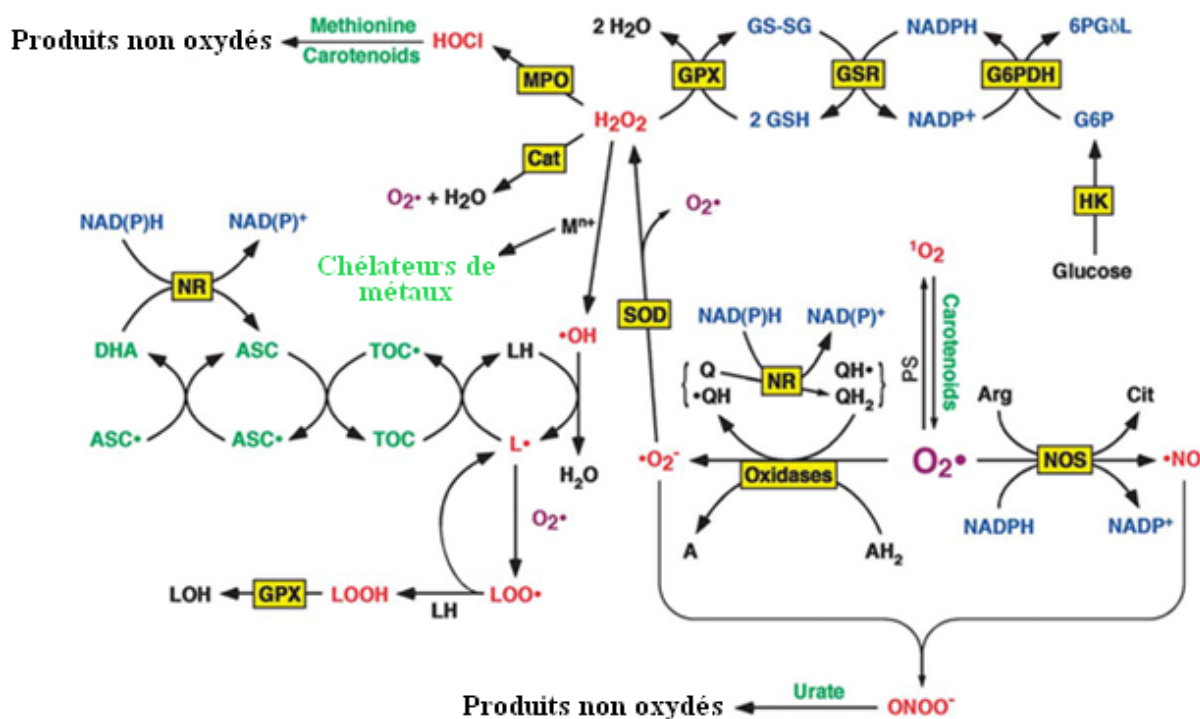


Figure 5. Mécanismes de défense antioxydants. **Abréviations:** 6PG δ L, 6-phosphoglucono- δ -lactone ; AH₂, substrat réduite ; Arg, arginine; ASC[•], semidéhydroascorbate ; Cat, catalase ; Cit, citrulline ; DHA, déhydroascorbate ; G6P, glucose 6-phosphate ; GSH, glutathion réduit; GSSG, glutathion oxydé; GPX, glutathion peroxydase ; GSR, glutathion réductase; HK, hékokinase; LH, un acide gras; L[•], radical diene conjugué, LOH, acide gras hydroxylé; LOO[•], radical peroxy; LOOH, hydroperoxyde; MPO, myéloperoxydase; NR, NADPH réductase; PS, photosynthèse; Q, ubiquinone; QH[•], semi-ubiquinone; QH₂, ubiquinol; TOC, α -tocopherole; TOC[•], radical α -tocopheryl (Sorg, 2004).

2. Les polyphénols

Les polyphénols constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Ce sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante. Ils possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou sans d'autres fonctions (OH, carboxyle, ...). Les polyphénols sont subdivisés en 03 classes principales: les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Tapiero et *al.*, 2002).

2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques se trouvent dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová et *al.*, 2003). Comme exemple d'acides phénoliques, on cite : acide caféique, acide protocatéchique, acide férulique, acide sinapique et acide gallique. Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prébiotique, antioxydant, antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et chélateurs (Hale, 2003).

2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal (Marfak, 2003). Presque toujours hydrosolubles, ce sont des pigments quasiment universels des végétaux et sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Lawson, 2006). Les flavonoïdes sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (Hadi, 2004), ils jouent aussi un rôle dans la défense des plantes contre les micro-organismes pathogènes, dans la fertilité des plantes et dans les interactions plante-microbe (Bovy, 2004). Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs (les anthocyanes, les aures et les chalcones). Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes, les

feuilles (salade, choux, épinards, etc), ainsi que dans les téguments externes des fruits (Lawson, 2006).

2.3.1. Structure chimique et classification

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés, ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (Marfak, 2003). Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle (pyrone) (Bruneton, 1999) (**Figure 6**).

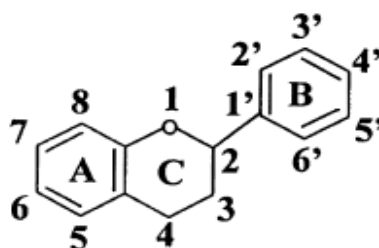


Figure 6: Squelette de base des flavonoïdes

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation, du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe se distinguent par les substitutions des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes, existent : les flavones, flavanols, flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavane-3,4-diols, chalcones, aures, anthocyanes et isoflavones (Bruneton, 1999, Harborne, 1988) (**Figure 7**).

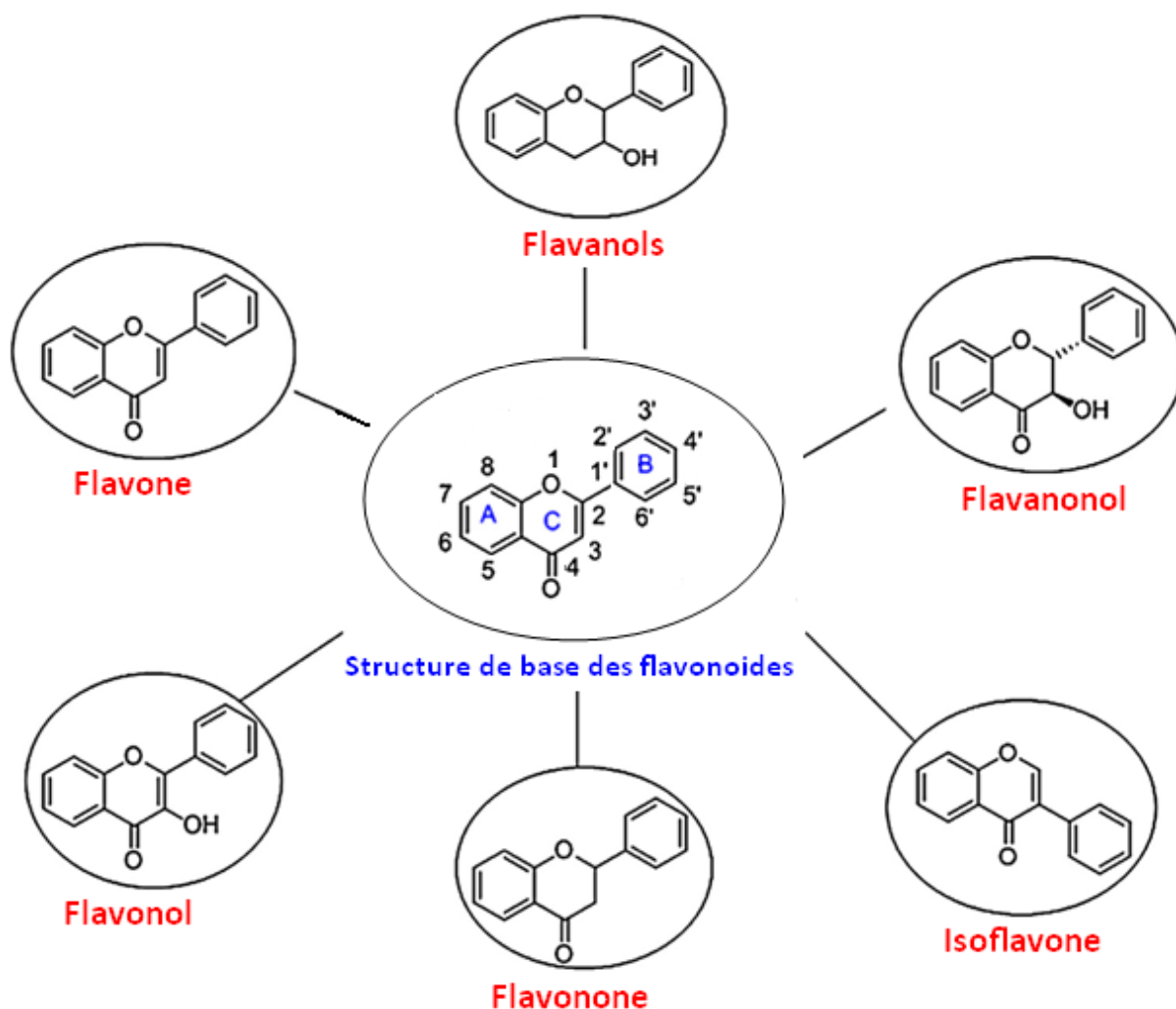


Figure 7. Les différentes classes de flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5' (suivant la numérotation présentée pour les flavones, **figure 5**). Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosides ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (Bruneton, 1999).

2.3. Les tannins

Ce sont des polyphénols polaires d'origine végétale (Berthod et *al.*, 1999), existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines, leurs poids moléculaire s'étendent de 500 à 3000 (Cowan, 1999) et ils peuvent avoir plusieurs activités biologiques dont l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antifongique, antitumorale, antivirale et antidiarrhéique (Bruneton, 1999).

2.4. Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols montrent une large gamme des effets biologiques incluent les activités antibactérienne, anti-inflammatoire, antiallergique, hépatoprotective, antithrombotique, antivirale, anticancéreuse et de la vasodilatation (Middleton et *al.*, 2000) ; plusieurs de ces fonctions biologiques ont été attribué à leur effet piègeur sur les radicaux libres et leur activité antioxydante (Soobrattee et *al.*, 2005). Les polyphénols ont un grand effet antioxydant, ces structures phytochimiques sont capables de piéger un grand nombre des espèces réactives telles que les radicaux hydroxyles, peroxydes, superoxydes et l'acide hypochloreux (Harnafi and Amrani, 2008). Les substances phénoliques, *in vitro*, peuvent également inhiber les dommages des biomolécules induits par le peroxynitrite (Santos and Mira, 2004). De nombreux polyphénols présente un potentiel élevé pour la chélation des métaux de transition, tels que le fer et le cuivre, responsables de la formation des espèces réactives (Hajji et *al.*, 2006 ; Mira et *al.*, 2002). En plus de leurs effets individuels, les antioxydants interagissent entre eux d'une manière synergétique où l'un peut protéger l'autre contre la destruction oxydative (Damintoti et *al.*, 2005).

Plusieurs flavonoïdes ont montré des activités antioxydantes (Wang and Mazza, 2002). Les mécanismes par lesquels les flavonoïdes agissent comme antioxydants sont décrits, selon Halliwell et Gutteridge (1998), comme suivants; La suppression de la formation des ROS par

inhibition des enzymes ou chélation des traces métalliques intervenant dans la production des radicaux libres, le piégeage des ROS et la régulation ou la protection des systèmes de défense antioxydant.

Les flavonoïdes inhibent les enzymes responsables de la production d'anion superoxyde telles que la xanthine oxydase (Hanasaki et *al.*, 1994) et les protéines kinases C (Ursini et *al.*, 1994). La XO est très bien connue comme une source génératrice de ROS dans de multiples pathologies humaines telles que les infections virales (Akaike et *al.*, 1990), l'inflammation (Ferrandiz and Alcaraz, 1991), les tumeurs cérébrales (Kokoglu et *al.*, 1990) et les processus d'ischémie-reperfusion (Nishino et *al.*, 1997 ; Mc Cord, 1985). L'inhibition de cette enzyme par les flavonoïdes peuvent régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celle du radical superoxyde dans les tissus humains (Hansaki, 1994). De nombreux auteurs ont étudié l'influence de la nature de substituant et sa position sur le degré d'inhibition de la XO de quelques flavonoïdes. Les différents points qui ressortent de ces études sont les suivants :

- La présence de la structure benzo- γ -pyrone (cycles A, B et C) agit comme un agent antioxydant dans différents systèmes biologique (Cotelle, 2001).
- La présence des groupes hydroxyles libres sur C7, C3 et/ou C5 favorise l'effet inhibiteur des flavonoïdes sur la XO (Cotelle et *al.*, 1996). Il a été suggéré que les flavones interagissent avec l'enzyme par le transfert de leur proton qui provient de sa dissociation du groupe 7-OH. Une glycosylation ou une méthylation des groupes 3-OH diminue l'activité inhibitrice des flavonoïdes sur la XO (Cotelle, 2001). Encore, la présence des groupes 5-OH et 7-OH ainsi que la fonction carbonyle sur le carbone C4 potentialisent l'effet inhibiteur des flavonoïdes (Lin et *al.*, 2002 ; Cos et *al.*, 1998).
- La présence de la double liaison C2-C3 est très importante dans l'inhibition de la XO. En effet, seuls les flavonols et les flavones ont la capacité à inactiver l'enzyme. Cette

double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C (Cos et *al.*, 1998). La structure plane peut donc être un autre facteur influençant l'activité de la XO ; les isoflavones (un réarrangement selon un motif 1,2-diphénylpropanique) et les flavanols (absence de la double liaison C2-C3) sont moins effectifs que les flavones (Cotelle, 2001).

Les flavonoïdes ont montré aussi une inhibition vis-à-vis une série d'enzymes intervenant dans la génération des ROS ; les cyclooxygénases, lipooxygénases, monooxygénases microsomales, glutathione S-transférases, succinoxydases mitochondriales et NADH oxydases (Brown et *al.*, 1998 ; Korkina and Afanas'ev, 1997).

La NADPH oxydase est une enzyme responsable de la production de l'anion superoxyde dans les neutrophiles activés. Le mécanisme d'activation de ces derniers inclue l'interaction d'un agoniste sur des récepteurs membranaires des neutrophiles, activation d'une phospholipase C accompagné, par la suite, d'une formation des secondes messagers qui agissent sur l'activation des protéines kinases C (PKC) (Procházková et *al.*, 2011). Cet enzyme induit une phosphorylation des sous unités p47phox de la NADPH oxydase qui résulte à l'activation de la chaîne respiratoire (Ago et *al.*, 2003). L'inhibition de la PKC est suggérée être le mécanisme par lequel la NADPH oxydase est inhibée par la quercétine (Ursini, 1994). Les flavonoïdes les plus puissants à inhiber les PKC (quercétine, fisétine et luteoline) possèdent une structure flavonique plane avec des groupes hydroxyles libres sur les carbones 3', 4' et 7 (Ferriola et *al.*, 1989).

Les flavonoïdes peuvent inhiber les NOS, enzymes générateurs des RNS, où ils agissent sur l'inhibition de l'expression de la forme iNOS et non pas sur leurs activités (Matsuda et *al.*, 2003). La présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo et les groupes 3-OH, 5-OH et 4'-OH sur les flavonoïdes est crucial pour

l'inhibition de cette activité. Il a été avéré que la méthylation des groupes 3-OH, 5-OH et 4'-OH augmente l'effet inhibiteur des flavonoïdes sur la NOS, alors qu'une glycosylation ou un réarrangement de groupement catéchol de cycle B diminue cette activité (Procházková et *al.*, 2011).

Les flavonoïdes sont des chélateurs importants des métaux qui jouent un rôle crucial dans le métabolisme de l'oxygène. Les ions métalliques sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être des constituants des hémoprotéines ou des cofacteurs de différentes enzymes (Fe pour la catalase, Cu pour la ceruloplasmine et Cu, Zn pour la superoxyde dismutase). Cependant, le fer et le cuivre libres potentialisent la formation des ROS, cela peut se faire par la réduction de H₂O₂ et la formation d'un radical [•]OH hautement réactif ou par l'oxydation des lipoprotéines de faible poids moléculaire LDL (low-density lipoprotein) induite par le cuivre (Pietta, 2000). Les sites proposés pour la fixation des métaux sur les flavonoïdes sont le noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3-OH, 4-oxo sur l'hétérocycle C et les groupes 4-oxo, 5-OH entre les cycles C et A (**Figure 8**). Une glycosylation de ces positions hydroxylées réduit le pouvoir chélateur des flavonoïdes (Laguerre et *al.*, 2007). Le noyau catéchol est le site majeur pour la chélation des métaux (Brown et *al.*, 1998 ; van Acker et *al.*, 1996) où sa présence dans la quercétine lui permis d'avoir un pouvoir chélateur au cuivre plus élevé que celui de kaempferol (absence de noyau catéchol) (van Acker et *al.*, 1996).

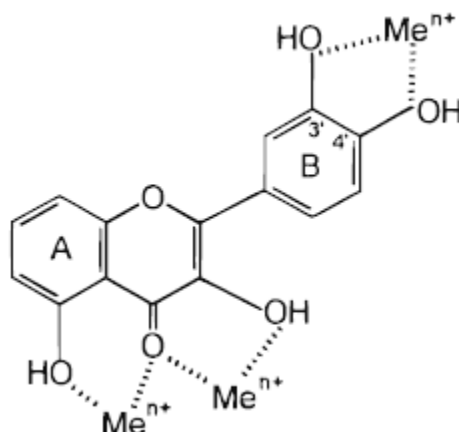


Figure 8. Les sites possibles pour la chélation des métaux (D'après Pietta, 2000).

Les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres ($R^\bullet$) les plus oxydants tels que le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et le radical hydroxyle par le transfert d'un atome d'hydrogène. Le radical aroxyde formé (Fl-O $^\bullet$) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (**figure 9**).

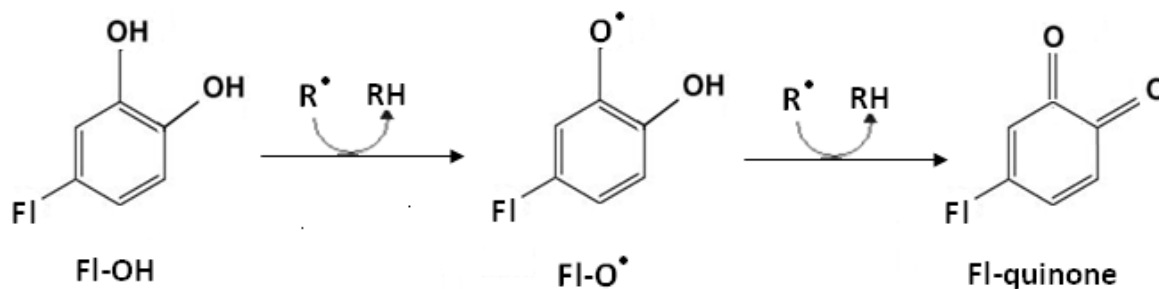


Figure 9. Effet scavenger des espèces réactive de l'oxygène ($R^\bullet$) par les flavonoïdes. Le radical libre Fl-O $^\bullet$ peut réagir avec un autre radical pour avoir une structure quinone stable (Pietta, 2000).

La présence des taux élevés de métaux de transition permet aux radicaux aroxydes d'interagir avec l'oxygène ainsi de produire les quinones et l'anion superoxyde qui est à l'origine de l'effet prooxydant indésirable des flavonoïdes (McCord, 1995).

L'activité antioxydante des flavonoïdes dépend aux réarrangements des groupes fonctionnels sur leur structure de base. La configuration et le nombre total des groupes hydroxyles ont un effet considérable sur leur mécanisme antioxydant (Heim, 2002). La position des groupes hydroxyles sur le cycle B est le déterminant major pour le piégeage des ROS (Burda and Oleszek, 2001), alors que les substitutions sur les cycles A et C ont peu d'impact sur le piégeage d'anion superoxyde (Amić et *al.*, 2007). La glycosylation des flavonoïdes réduit leur effet antioxydant par rapport à leurs aglycones correspondants (Mishra et *al.*, 2003 ; Rice-Evans et *al.*, 1996). La glycosylation du groupe 3-OH de la quercetine, qui produit la rutine, supprime fortement son activité antioxydante (Rice-Evans et *al.*, 1996). Les études réalisés sur l'effet piègeur des flavonoïdes sur les radicaux libres et sa relation avec la structure chimique de ces molécules phytochimiques (Croft, 2006 ; Cottele, 2001 ; Pietta, 2000) ont permet de ressortir les critères majeurs pour une meilleur efficacité de cette activité antioxydante :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B est la cible privilégiée des radicaux libres, elle a une propriété d'un meilleur donneur d'électrons, confère la stabilité au radical flavonoxyl et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo responsables de la délocalisation des électrons.
- La présence des groupes 3-OH et 5-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 potentialisent l'effet piègeur des flavonoïdes.

Autre mécanisme possible par lequel les flavonoïdes agissent comme antioxydants est leur interaction avec une variété d'enzymes antioxydants. Nagata et ses collaborateurs (Nagata et *al.*, 1999) ont étudié, dans un système de culture cellulaire, l'effet protecteur des flavonoïdes contre la cytotoxicité de peroxyde d'hydrogène et ont constaté qu'il y a une forte

expression de glutathione peroxydase cytosolique (GPx) qui est due à son activation par les flavonoïdes. Une activation des protéines de la signalisation des hépatocytes humains par certains flavonoïdes augmente l'activité de glutathione peroxydase (GPx) et glutathione réductase (GR) (Martín et *al.*, 2010). Il a été aussi montré que les flavonoïdes induisent l'activation de superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT) (Kaviarasan et *al.*, 2008 ; Nagata et *al.*, 1999).

3. La plante *Daphne gnidium* L. (Daphne garou, Lezzaz)

Le Daphne garou ou garou est un arbuste de la famille des *Thyméléacées*. C'est un arbrisseau des garrigues méditerranéennes et des sables atlantiques, il est de 60 cm à 2m de haut ou plus, à rameaux minces effilés, à feuilles persistantes ou caduques, à fleurs blanches petites et tubulaires, souvent odorantes en inflorescences terminales, aux baies rouge orangé. Le garou est une plante vivace et sa floraison s'étends de Mars à Septembre.

3.1. Classification

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Myrtales*

Famille : *Thymelaeaceae*

Genre : *Daphne*

Espèce : *Daphne gnidium* L.

3.2. Utilisation traditionnelle de la plante

Les racines, en poudre, de *D. gnidium* ont été utilisées dans la médecine traditionnelle comme un abortif et l'écorce a été utilisé comme un agent diurétique, pour le traitement des douleurs dentaires (Borris et *al.*, 1998) et contre l'hépatite (Bellakhdar et *al.*, 1991). Les feuilles en infusion ont été employées comme un agent hypoglycémiant (Ziyyat et *al.*, 1997) et pour le traitement des maladies cutanées (Bellakhdar, 1997 ; Bruneton, 1987). En Algérie, la partie aérienne de *D. gnidium* a été utilisée avec l'huile d'olive contre les douleurs inflammatoires. Cette plante est également employée pour des teintures traditionnelles de textile (Cardon, 2003). Cependant, cette plante est considéré dangereuse en raison de sa

toxicité mortelle. En fait, elle produit des maux de tête, des tremblements, une pâleur, une dilatation de pupille, un gonflement des lèvres et de la bouche, la difficulté de déglutition, la diarrhée et des spasmes digestifs, des convulsions, des désordres pulmonaires et la mort (Bellakhdar, 1997).



Figure 10. Quelques images de *Daphne gnidium* L.

3.3. Composition et propriétés biologiques

Des études phytochimiques ont révélé que les espèces *Daphne* contiennent une large gamme de composés chimiques y comprennent les flavonoïdes, les coumarines, les lignines, les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes et les stéroïdes (Okunishi et *al.*, 2002 ; Kreher et *al.*, 1990 ; Murray et *al.*, 1982). Le groupe chimique majoritaire de *D. gnidium* est représenté par les coumarines (Marques et *al.*, 2009) mais il renferme encore des polyphénols, des flavonoïdes, de faible quantité de tanins (Harizi et *al.*, 2011), les diterpénoides (Cottiglia et *al.*, 2001), les terpènes et des lignines (Chaabane et *al.*, 2012).

De multiples propriétés biologiques ont été attribuées aux différentes parties de cette plante. D'ailleurs, l'extrait méthanolique des feuilles de *D. gnidium* a montré des activités antibactérienne, antimycosique (Iauk et *al.*, 1996, 1997) et de bonne tolérance cutanée, tandis

que celui de l'écorce a induit des dommages photochimiques de peau (Rapisarda et *al.*, 1998). Cependant, certaines composés de ses feuilles tels que le daphnorétine (coumarine) et l'apigénine (flavone) (Deina et *al.*, 2003) ont montré une activité antitumorale. Une activité antimicrobienne a été exercé par les coumarines et les flavonoïdes des tiges de *D. gnidium* et peuvent même agir sur la stimulation ou la suppression de la réponse immunitaire (Cottiglia et *al.*, 2001). De récente étude *in vitro* a montré une activité anti-inflammatoire de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *D. gnidium* (Harizi et *al.*, 2011).

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Daphne gnidium L. a été récoltée de la région de Beni Ourtilane (Agradou) Wilaya de Sétif au mois de Mai 2009. Elle a été identifiée par Pr. LAOUAR H, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas, Sétif. Le lait bovin frais a été obtenu d'une ferme des environs de Sétif et le lait humain a été offert par une femme volontaire.

1.2. Les réactifs

La xanthine, cytochrome c, allopurinol, Dithiothritol (DTT), Etylenediaminetetraacetic acid (EDTA), acide gallique, quercétine, acide ascorbique, rutine, sodium dodecyl sulphate (SDS), persulfate d'ammonium, glycérol, le β -mercaptoéthanol, glycine, tripyridyl-triazine (TPTZ), Phenazine methosulfate (PMS), Nitroblue tetrazolium phenazine (NBT), Tween 20, Tween 40 (Sigma, Aldrich ou Fluka). Les sels et d'autres réactifs sont provenus de Sigma ou Fluka. Le méthanol, l'éthanol, l'hexane, l'acétate d'éthyle, le chloroforme, le butanole, l'acide acétique et l'acide phosphorique (85%) proviennent de Pro labo.

2. Méthodes

2.1. Extraction des flavonoïdes de *D. gnidium* L.

La partie aérienne de *D. gnidium* a été nettoyée des impuretés, découpées, séchées à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours puis sont broyées à l'aide d'un mortier. L'extraction des flavonoïdes est effectuée selon la méthode décrite par Markham (1982). Le broyat (100g) est additionné au 1 litre méthanol/eau (85% méthanol et 15% eau distillée : V/V), le mélange est soumis à une agitation pendant une nuit à 4°C, puis laissé reposer quelques heures. Le mélange est par la suite filtré sur la laine de verre puis sur le

verre fritté (entonnoir N°03), le filtrat est conservé à 4°C alors que le précipité est soumis à une deuxième extraction en suivant le même protocole avec un litre de méthanol/eau (V/V). Le deuxième filtrat est mélangé avec le premier. Le mélange a été filtré pour la dernière fois sur papier filtre et soumis à une évaporation rotative à 40 °C dans un rotavapeur (BÜCHI) pour éliminer le méthanol du filtrat. L'extrait obtenu est considéré comme étant l'extrait brut (EBr) de notre plante.

L'extrait brut est initialement mélangé avec l'hexane (1 V/V), le mélange est laissé décanter, et la phase organique supérieure est récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant (hexane) devienne transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane. La phase aqueuse résiduelle est soumise à une autre extraction par le chloroforme, et enfin par l'acétate d'éthyle en suivant les mêmes étapes que la première extraction par l'hexane. La **figure 11** résume les étapes suivies dans le fractionnement de l'extrait méthanolique.

Cinq fractions sont obtenues; l'extrait brut ou méthanolique (EBr), la fraction de l'hexane (EHx), la fraction du chloroforme (ECh), la fraction de l'acétate d'éthyle (EAc), et la fraction aqueuse (EAq) résiduelle. Les extraits sont conservés jusqu'à leur utilisation.

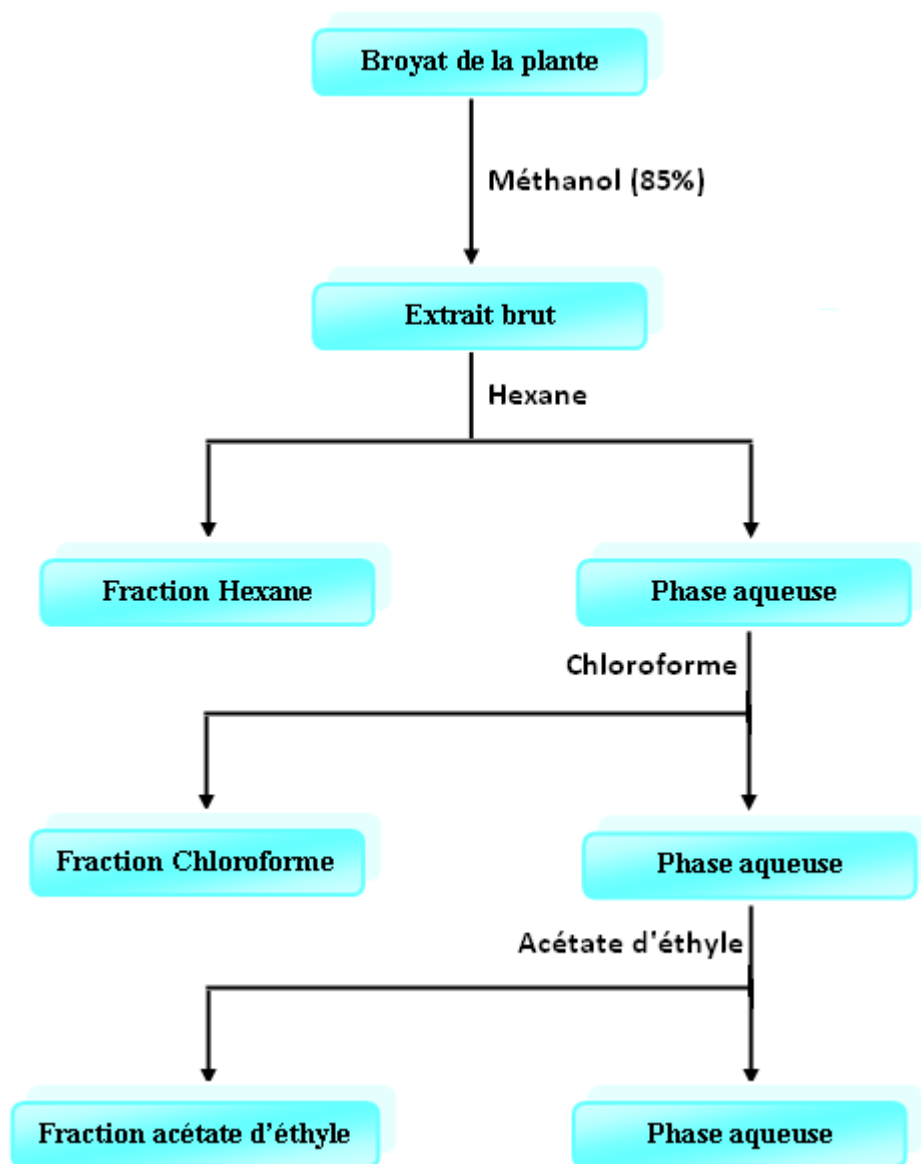


Figure 11. Les étapes du fractionnement de l'extrait brut de *D. gnidium* L.

2.2. Analyse des extraits de *D. gnidium* L.

2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits de *D. gnidium* L. est effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Li et *al.*, (2007) avec quelques modifications. Cette méthode colorimétrique est basée sur la réduction du complexe phosphotungstène-

phosphomolybdène de réactif de Folin par les groupements phénoliques des échantillons en donnant des produits de coloration bleu en milieux alcalin. Brièvement, 0.1 ml de différents extraits de *D. gnidium* L. sont ajoutés à 2.5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de réactif de Folin. Après 5 min, 1.0 ml de carbonate de sodium (20%) est additionné au mélange réactionnel et le tout est incubé pendant 1 heure à une température ambiante. La lecture des absorbances est effectuée à 765 nm.

2.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes des extraits de *D. gnidium* est effectué selon la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Bahorun *et al.*, 1996) ; 1 ml de chaque extrait (préparé dans le méthanol) avec des dilutions convenables, est ajouté à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation et de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

2.2.3. Chromatographie Liquide à haute performance (CLHP/HPLC)

Les extraits de *D. gnidium* ont été analysés par une HPLC constituée d'un détecteur UV à barrettes de diodes (LC/Uv-vis-DAD). L'utilisation des détecteurs à barrette de diodes permettant l'acquisition du spectre de l'échantillon en temps réel, une représentation en trois dimensions (temps, absorbance, longueur d'onde) et une caractérisation des composés par leur spectre.

2.3. Purification de la xanthine oxydoréductase humaine et bovine (H/B-XOR)

La purification de la XOR (H/B-XOR) est réalisée selon le protocole décrit par Baghiani *et al.*, (2003).

2.3.1. Préparation de l'extrait brut

Le lait bovin frais est centrifugé à 5000g/min pendant 20 minutes à 4 °C. La crème flottante récupérée est dissoute dans une solution de K_2HPO_4 (0,2 M) contenant 1 mM d'EDTA et 10 mM de DTT puis le tout est soumis à une agitation pendant 20 minutes. La suspension résultante est centrifugée à une vitesse de 6000 g / min pendant 20 minutes. Le surnageant récupéré et filtré sur la laine de verre est additionné progressivement de 15 % (V/V) du butanol froid (-20 °C) et de sulfate d'ammonium 15 % (P/V), sous agitation douce pendant 60 minutes, puis centrifugé à 10000g/min pendant 20 minutes. Le surnageant obtenu, après filtration sur la laine de verre et élimination de la couche flottante du butanol, est additionné progressivement de 20 % (P/V) du sulfate d'ammonium avec une douce agitation pendant 90 minutes. La suspension obtenue est centrifugée à 11000 g / min pendant 30 min et le précipité résultant (couche flottante d'une couleur brunâtre) est dissout dans un petit volume du tampon hépariné (tampon phosphate de sodium 25 mM, pH 6,2 contenant 1 mM d'EDTA), et dialysé pendant une nuit avec une douce agitation contre le même tampon. Une autre centrifugation (18000 g pendant 60 minutes) de dialysat est réalisée pour élimination des impuretés insolubles. Une filtration sur un filtre de 45µM pour élimination des bactéries est effectuée et pour l'obtention de l'extrait brut de la xanthine oxydoréductase (toutes les étapes ont été effectuées à 4 °C). Les mêmes étapes ont été suivies pour le lait humain avec de légères modifications où le pH du tampon hépariné est de 7.4.

2.3.2. Préparation de la XOR pure

L'extrait brut de la XOR est passé à travers une colonne contenant un gel d'héparine-agarose, après équilibration de cette dernière par le tampon hépariné (pH 6.2), à un débit de 18 ml/heure. La XOR bovine et humaine est éluée avec 0,2 et 0.4 M NaCl dans le tampon hépariné, respectivement. La colonne est par la suite régénérée par lavage avec du NaCl 1 M.

La XOR purifiée est dialysée contre un tampon Na^+ -Bicine (50 mM, pH 8,3) pendant une nuit, puis elle est répartie, aliquotée et conservée à -20°C jusqu'à utilisation (toutes les étapes ont été effectuées à 4°C).

2.3.3. Contrôle de la pureté de la XOR

Pour contrôler la pureté de la XOR, le rapport protéine / flavine PFR (Protein to Flavin Ratio) a été estimé, il correspond à la lecture de l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm ($A_{280\text{nm}} / A_{450\text{nm}}$). Une valeur 5 où proche de 5 est un bon signe de pureté (Bray, 1975). Une électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant (SDS-PAGE) a été réalisée aussi pour confirmer la pureté de l'enzyme.

2.3.3.1. Electrophorèse sur Gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970). Le gel de séparation est préparé (10% d'acrylamide, 2.74% de bis-acrylamide) dans un tampon Tris-HCl (0.125M, pH 6.8) contenant 0.1% (P/V) SDS, et polymérisé par ajout de 0.042 % de N,N,N'N' Tetraméthylène diamine (TEMED) (V/V) et 0.1 % du persulfate d'ammonium (P/V). Le gel de concentration est préparé dans un tampon Tris-HCl (0.125M pH 6.8) contenant 0.1% SDS et polymérisé par ajout de 0.1% (V/V) du TEMED et 0.1% (P/V) du persulfate d'ammonium. Les échantillons (XO, environ 1 mg / ml) ainsi que les standards des poids moléculaires (1 mg / ml) ont été préparés dans une solution échantillon constituée d'un tampon Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), 2 % de SDS (P/V), 20 % de glycérol (V/V) et 0.005 % de bleu de bromophénol (P/V). Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes. La migration électrophorétique est conduite avec un tampon contenant 25mM Tris-HCl, 192mM glycine et 0.1% SDS par application d'un courant électrique de 10 mA jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel de séparation, l'ampérage est ensuite augmenté à 37- 45 mA. Une fois la migration achevée, le gel est coloré

par une solution de bleu de coomassie 0.2% (P/V) contenant 45% (V/V) du méthanol ou de l'éthanol, 10% (V/V) d'acide acétique et 45% (V/V) d'eau distillée. Après une heure de coloration, le gel est décoloré par une solution contenant 5-10%(V/V) d'acide acétique en présence ou en absence du méthanol 5% et 90-95% (V/V) d'eau distillée.

2.3.4. Estimation de l'activité enzymatique de la XOR

L'activité totale de la XOR a été estimée par spectrophotométrie à 295 nm par détermination du taux de l'acide urique produit à partir de la xanthine (100 µM, concentration finale) et en présence de 500 µM de NAD⁺ comme accepteur d'électron, le solvant utilisé est le tampon Na-Biscine de pH 8,3 (Baghiani *et al.*, 2003).

L'activité de la forme oxydase est mesurée de la même manière mais en absence de NAD⁺.

$$\text{L'activité enzymatique totale} = \text{l'activité de la forme O} - \text{l'activité de la forme D}$$

L'activité enzymatique est exprimée en nombre de nano moles d'acide urique produit en une minute et par mg d'enzyme (n moles / min / mg d'enzyme).

2.4. Inhibition de l'activité XO par les extraits de *D. gnidium* L.

L'effet inhibiteur des extraits de *D. gnidium* sur l'activité XO a été évalué spectrophotométriquement en suivant la quantité d'acide urique produite par oxydation de 100 µM de la xanthine dissoute dans un tampon phosphate de sodium bien aéré (Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄, 50 mM, pH 7.4, contenant 0.1 mM d'EDTA), en présence des concentrations variables de chaque extrait de *D. gnidium* (préparées dans le tampon phosphate de sodium ou dans le méthanol) (Boumerfeg *et al.*, 2009 ; Robak and Gryglewski, 1988). L'activité de l'enzyme, en absence des extraits et de l'inhibiteur, est considérée égale à 100%. L'allopurinol est utilisé comme un standard en raison de son effet inhibiteur spécifique sur la XO. L'absorbance est lue à 295 nm. Après l'ajout de la XO, la réaction a été suivie pendant

60 secondes et l'activité inhibitrice des extraits a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I%) calculé ainsi:

$$I \% = [(A_C - A_I) / A_C] \times 100$$

A_C : absorbance en absence de l'inhibiteur (le contrôle)

A_I : absorbance en présence d'inhibiteur

L' IC_{50} de chaque extrait (concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique) a été par la suite calculée à partir de l'équation de régression qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur ($Y = a X + b$).

2.5. Effet des extraits de *D. gnidium* L. sur l' $O_2^{\bullet-}$ produit par la XO

La production de l' $O_2^{\bullet-}$ par la XO peut être mesurée en suivant la réduction du cytochrome c (cyt c) à 550 nm ($\epsilon_{Cyt c} = 21.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7.4) contenant 0.1 mM EDTA en présence de 100 μM de xanthine, 25 μM de cyt c et des concentrations variables de l'extrait à tester (Robak et Gryglewski, 1988). La SOD inhibe spécifiquement la réduction de cyt c par l' $O_2^{\bullet-}$ et dans le but de comparaison de l'effet des extraits sur la production de ce dernier, une concentration finale de 300 UI/ml du SOD est utilisée dans ce test.

2.6. Effet scavenger sur l'anion superoxyde par le système PMS-NADH/NBT

L'effet scavenger de différents extraits de *D. gnidium* sur l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est encore évalué par l'utilisation d'un système non enzymatique, PMS-NADH-NBT, selon la technique décrite par Ani et ses collaborateurs (2006), avec quelques modifications. L' $O_2^{\bullet-}$ est généré dans un milieu contenant un volume égal (100 μl) de 1 mM NBT, 3 mM NADH et 0,3 mM PMS, le volume final est ensuite ajusté à 1 ml par l'addition d'un tampon phosphate (pH 7,8). Ce mélange est initialement incubé avec ou sans extraits pendant 2 min et la génération

de l' $O_2^{\bullet-}$ est induite par l'addition de PMS. Après 3 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance des échantillons est mesurée à 560 nm. La diminution dans les valeurs d'absorbance est traduite par la capacité scavenger de l'anion superoxyde. Le pourcentage de l'activité scavenger de l' $O_2^{\bullet-}$ est calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité scavenger de l}'O_2^{\bullet-} (\%) = [(A_{560} \text{ contrôle} - A_{560} \text{ échantillon}) / A_{560} \text{ contrôle}] \times 100$$

2.7. Test au 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité antiradicalaire des extraits de *D. gnidium* L. et la quercétine a été démontrée selon le protocole décrit par Burits et Bucar (2000). En présence des piègeurs de radicaux libres, le 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl de couleur violette se réduit en 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (Maataoui *et al.*, 2006). Dans des tubes à essais, on introduit 50 µl des solutions d'extraits (ou la quercétine) et 5 ml de la solution méthanolique de DPPH (0.004 %). Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min et les absorbance sont enregistrées à 517 nm. L'effet scavenger de radical DPPH par les échantillons a été exprimé en pourcentage d'inhibition qui est calculé comme suivant :

$$I \% = [(A_{\text{control}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

2.8. Test de piégeage (scavenger) du radical hydroxyle

L'effet piègeur des extraits de *D. gnidium* L. sur le radical hydroxyle a été mesuré en suivant la méthode décrite par Li et ses collaborateurs (2008) avec quelques modifications. Dans ce système, le radical hydroxyle est généré par la réaction de Fenton. Ce radical oxyde le Fe^{2+} en Fe^{3+} et seul le Fe^{2+} pourrait à se combiner au 1,10-phenanthroline pour donner un complexe coloré en rouge (1,10-phenanthroline- Fe^{2+}) a un maximal d'absorbance à 536 nm. La décoloration des solutions réactionnelles reflète la concentration de radical hydroxyle formé. Le même volume de 1,10-phenanthroline (5.0 mM), $FeSO_4$ (5.0 mM) et de l'acide

ethylenediaminetetraacetic (EDTA) (15 mM) ont été mélangé avec 400 µl de tampon phosphate (0.2 M, pH 7.4), par la suite 600 µl des solutions des extraits et 800 µl de H₂O₂ (0.01%) ont été additionné. Après incubation (à 37 °C pendant 60 min), les absorbances sont mesurées à 536 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme un control positif. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de piégeage de radical hydroxyl calculé ainsi :

$$I \% = (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{blanc}}) * 100 / (A_{\text{control}} - A_{\text{blanc}})$$

2.9. Effet chélateur des extraits de *D. gnidium* L.

Pour montrer l'effet chélateur des extraits de *D. gnidium* L. sur les ions de fer ferreux, un test de Ferrozine a été appliqué. La formation d'une interaction extrait-Ferrozine (chélation) prévient la formation du complexe Fe²⁺-Ferrozine coloré en rouge ayant une absorbance maximale à 562 nm. Cette activité antioxydante est évaluée selon la méthode décrite par Decker et Welch (1990). Brièvement, 0.5 ml de différents extraits (concentrations convenables) sont mélanges avec 0.1 ml de FeCl₂ (0.6 mM) et 0.9 ml de méthanol. Après 5 min, 0.1 ml de la solution de Ferrozine (5 mM) sont additionnées aux milieux réactionnels, les mixtures sont agités et incubés à une température ambiante pendant 10 min. L'EDTA est utilisé comme un standard positif et les résultats sont exprimés en pourcentage de chélation ou d'inhibition de la formation du complexe Fe²⁺-Ferrozine (I%) calculé ainsi :

$$I \% = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon}}) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100$$

L'IC₅₀ de chaque extrait (concentration chélatrice de 50 % de fer ferreux) a été par la suite calculée à partir de l'équation de régression qui détermine le pourcentage de chélation en fonction de la concentration des échantillons (Y = a X + b).

2.10. Pouvoir réducteur des extraits de *D. gnidium* L.

Le pouvoir réducteur de différents extraits de *D. gnidium* L. et les standards (BHT et l'acide gallique) est évalué selon la méthode décrite par Chung et *al.*, (2005) avec quelques modifications. 0.1 ml des solutions d'extraits ou standards sont mélangés à un volume égal de tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et de ferricyanure de potassium (1%), le mélange est ensuite incubé à 50 °C pendant 20 min. 0.25 ml de l'acide trichloroacétique (10 %) sont additionnés aux milieux réactionnels pour stopper la réaction et les mixtures sont par la suite centrifugés à 3000g pendant 10 min. Le surnagent (0.25 ml) est mélangé avec 0.25 ml de l'eau distillée et 0.1 % de trichlorure de fer et les absorbances sont mesurées à 700 nm. Le pouvoir réducteur des échantillons augmente avec les valeurs d'absorbance.

2.11. Pouvoir réducteur des extraits de *D. gnidium* L. évalué par la technique FRAP

L'activité antioxydante de différents extraits de *D. gnidium* est évaluée selon la méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) décrite par Benzie et Strain (1996) avec quelques modifications (Pulido et *al.*, 2000). Cette technique permet la mesure de pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) à pH acide. 900µl du réactif FRAP, préalablement incubé à 37°C, contenant 2,5 ml de la solution du TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) avec 2,5ml du $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20mM) et 25ml du tampon acétate (300 mM d'acétate de sodium, pH conduit à 3,6 par l'acide acétique) sont mélangés avec 90µl d'eau bidistillée et 30µl de l'échantillon (avec dilutions appropriées). L'augmentation de l'absorbance à 593 nm est ensuite suivie pendant 30 minutes à 37°C. Les lectures sont effectuées contre l'eau distillée et les absorbances des blancs du réactif (les 30 µL d'échantillon sont remplacés par de l'eau bidistillée) et des échantillons (absorbances des échantillons avec dilutions appropriées) sont soustraites de l'absorbance finale. Quelques

composés antioxydants ; la quercétine, la rutine, l'acide ascorbique et l'acide gallique sont utilisés comme des témoins ou standards. Une gamme du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (étalon réducteur) entre 0 et 2000 μM est utilisée pour calculer les valeurs FRAP des extraits et des antioxydants standards.

Le paramètre EC_1 (concentration équivalente 1) est défini comme la concentration de l'antioxydant qui donne une réduction du TPTZ équivalente à 1 mM du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. L' EC_1 des extraits et standards est calculé à 4 et à 30 minutes.

2.12. Test de blanchissement de β -carotène

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits de *D. gnidium* L. et les standards a été déterminé en mesurant l'inhibition des composés organiques volatiles et les hydroperoxydes diène conjugués produits par l'oxydation de l'acide linoléique (Dapkevicius et al., 1998). L'émulsion de β -carotène/ acide linoléique est préparé par la solubilisation de 0.5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, 25 μl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme sera par la suite complètement évaporé, puis 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés et le tout est agité vigoureusement. 2.5 ml d'émulsion sont additionnés à 0.35 ml de différents échantillons (extraits, standard ou blanc) et sont incubés à l'ombre (une température ambiante) pendant 48 heures. Durant la période d'incubation, les absorbances des échantillons sont suivies à 490 nm à des intervalles de temps réguliers (0, 1, 2, 4, 6, 24 et 48 heures). L'activité antioxydante (AA) des échantillons est exprimée en pourcentage de blanchissement de β -carotène calculée ainsi :

$$\text{AA} = [(A_0 - A_t) - (\dot{A}_0 - \dot{A}_t) / (A_0 - A_t)] * 100$$

A_0 : absorbance de control à 0 h; A_t : absorbance de control après 24 h; $\dot{A}_0$: absorbance des extraits à 0 h ; $\dot{A}_t$: absorbance des extraits après 24 h.

La capacité antioxydante des extraits est comparée avec celles de BHT et les blancs.

2.13. Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de *D. gnidium* L. ; la méthode de Fe⁺²-Thiocyanate (FTC)

La technique de ferrithiocyanate mesure la capacité des antioxydants à balayer les radicaux peroxylys formés durant la phase initiale de la peroxydation lipidique dont leur capacité à céder leurs atomes d'hydrogène leur permis d'interagir avec les acides gras polyinsaturés (Huang *et al.*, 2005). Les radicaux peroxydes formés au cours de la peroxydation de l'acide linoléique oxydent le fer ferreux (Fe²⁺) en fer ferrique (Fe³⁺), ce dernier forme un complexe avec la thiocyanate (SCN⁻) qui possède une absorbance maximale à 500 nm. Le taux de peroxyde formé durant l'incubation se traduit par l'élévation dans les valeurs d'absorbance.

L'activité antioxydante de différents extraits de la plante a été démontrée par l'utilisation de système de l'acide linoléique déterminé par Duh et Yen (1997), avec quelques modifications. L'émulsion de l'acide linoléique est préparée en mélangeant 0.28 mg de l'acide linoléique, 0.28 mg de tween 20 (émulsifiant) et 50 ml d'un tampon phosphate, puis le tout est soumis à une agitation. 0.5 ml de différents extraits sont rajoutés à 2.5 ml de l'émulsion de l'acide linoléique et 2 ml de tampon phosphate. Le mélange réactionnel est incubé à 40 °C à l'obscurité pour accélérer le processus de la peroxydation lipidique. Durant l'incubation, 0.1 ml des milieux réactionnels sont prélevés à différents intervalles de temps. Le degré d'oxydation est mesuré par une adition successive d'éthanol (4.7 ml, 75%), une solution de thiocyanate d'ammonium (0.1 ml, 30%) et de chlorure de fer (0.1 ml, 0.02 M in 3.5% HCl). Après 3 minutes, les valeurs de peroxyde formé sont déterminées par la mesure des absorbance à 500 nm chaque 24 heures. On arrête la lecture après avoir une valeur d'absorbance maximal chez le control. L'acide ascorbique et le BHT sont utilisés comme des

standards de référence. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante ;

$$\% \text{ Inhibition} = (1 - A_{\text{échantillons}} / A_{\text{control}}) * 100$$

2.14. Test d'hémolyse

La préparation d'une suspension sanguine est effectuée en suivant le protocole décrit par (Manna et *al.*, 1999) avec quelques modifications. Le prélèvement du sang est réalisé sur des souris femelles, *Swiss albinos*, par une ponction cardiaque à l'aide d'une seringue contenant de l'EDTA comme un agent anticoagulant. Le sang récupéré est centrifugé à 3000 g pendant 10 min à 4 °C. Le plasma et la couche d'interface sont soigneusement prélevés et éliminés, le culot de globules rouges (GRs) est en suite lavé trois fois par un tampon phosphate (125 mM de NaCl, phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4). Après le dernier lavage, les GRs sont dilués dans le tampon phosphate afin d'obtenir 2% (v/v) hématocrite.

L'étude de l'effet antihémodytique de différents extraits de *D. gnidium* sur les GRs a été réalisé selon la technique décrite par (Girard et *al.*, 2006). 20 µl d'échantillon à testé sont mélangés avec 80 µl de la suspension érythrocytaire, ensuite 136 µl de AAPH sont additionnés à la mixture et l'absorbance a été lu dans un intervalle de temps de 15 min pendant 3heures 30 min à 620 nm.

2.15. Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD. Les résultats sont analysés par le test t de Student pour les comparaisons simples, et ANOVA univarié (one-way ANOVA) suivie du test de Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification.

1. Dosage des polyphénols totaux et les flavonoïdes de *D. gnidium*

Les propriétés biologiques (en particulier l'activité antioxydante) de la plupart des extraits des plantes médicinales ont été attribuées à leurs teneurs en composés phénoliques. Pour cette raison, on a choisi dans ce présent travail d'extraire au préalable ces composants actifs à partir de la plante *D. gnidium* et de déterminer leurs teneurs. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (**Figure 12**) et exprimée en milligramme d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

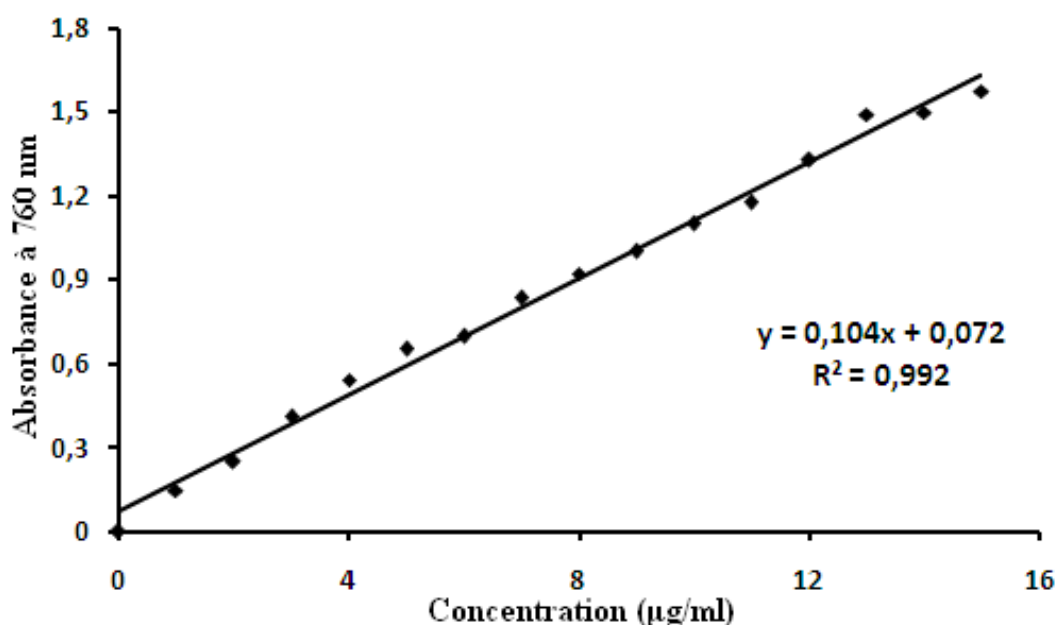


Figure 12. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne $\pm$ SD de trois mesures).

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir des gammes d'étalonnage établies avec la quercetine et la rutine (0-40 µg / ml) (**Figure 13**) et exprimée en milligramme d'équivalent de la quercetine ou la rutine par gramme d'extrait (mg EQ / g). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 1**.

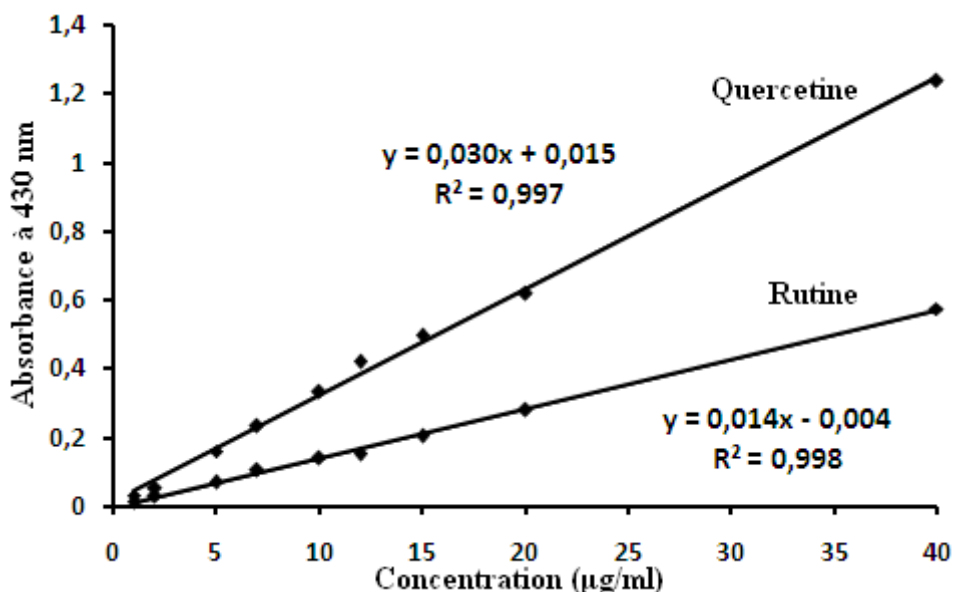


Figure 13. La courbe d'étalonnage de la quercetine et de la rutine (moyenne $\pm$ SD de trois mesures).

Tableau 1. Dosage des polyphénols totaux et les flavonoïdes des extraits de *D. gnidium* L.

Extrait	Rendement (%)	Teneur en polyphénols	Teneur en flavonoïdes	
		mg EAG / g d'extrait	mg EQ / g d'extrait	mg ER / g d'extrait
EBr	13,65 $\pm$ 0,61	5,16 $\pm$ 0,15	22,22 $\pm$ 1,48	51,42 $\pm$ 2,42
ECh	02,03 $\pm$ 0,32	10,52 $\pm$ 0,87	36,55 $\pm$ 1,72	40,52 $\pm$ 0,95
EAc	02,71 $\pm$ 0,40	9,74 $\pm$ 0,18	133,07 $\pm$ 2,84	298,21 $\pm$ 10,46
EAq	07.06 $\pm$ 1.04	nd	nd	nd

Les valeurs présentent la moyenne $\pm$ SEM (n = 3)

Le calcul de rendement de différents extraits de la partie aérienne de *D. gnidium* a révélé que l'EBr présente le rendement le plus élevé (13,65 $\pm$ 0,61%) suivi par l'EAq (07.06 $\pm$ 1.04%). L'ECh (02,03 $\pm$ 0,32%) et l'EAc (02,71 $\pm$ 0,40%) présentent presque des rendements similaires. La différence de la polarité des substances antioxydantes peut expliquer le rendement variable des extraits de *D. gnidium*. La solubilité des composés

phénoliques est généralement gouvernée par le type de solvant utilisé, le degré de polymérisation des polyphénols aussi bien par l'interaction de ces composés avec d'autres constituants en formant des complexes insolubles (Galvez et *al.*, 2005). En conséquence, le méthanol est très recommandé et fréquemment utilisé pour l'extraction des composés phénoliques (Mahmoudi et *al.*, 2013).

Süntar et *al.*, (2012) ont trouvé, par l'application d'une technique d'extraction différente, que l'EBr de la partie aérienne de *Daphne oleoides*, (une autre espèce de *Daphne* L.) ne présente pas le rendement le plus élevé (20,6%) en comparaison aux autres extraits. De même, on appliquant la même méthode d'extraction, nos résultats précédents sur la partie aérienne de *Capparis spinosa* L. révèlent que l'EAq (8.41%) a le rendement le plus élevé des extraits suivi par l'EBr (6.65%) (Baghiani et *al.*, 2011).

Les résultats obtenus montrent que les extraits de *D. gnidium* présentent une teneur variable en polyphénols. L'ECh contient la plus grande teneur avec ($10,52 \pm 0,87$ mg EAG/g d'extrait). L'EAc présente une quantité presque similaire à celle de l'ECh avec une valeur de ($9,74 \pm 0,18$ mg EAG/g d'extrait). L'EBr semble être le plus pauvre en polyphénols des extraits de *D. gnidium* ($5,16 \pm 0,15$ mg EAG/g d'extrait).

Dans ce test, ces valeurs déterminées en polyphénols totaux ne présentent pas des mesures absolues de la quantité des composants phénoliques mais, en fait, c'est leur capacité réductrice relative à l'acide gallique. Il a été observé que le déterminant de l'activité antioxydante des composés phénoliques est lié à la mesure de la qualité et la quantité des antioxydants présents dans les plantes (Vinson et *al.*, 1998). Dans ce travail, tous les extraits de la plante ont réagit avec le réactif de Folin, cela est peut être issu de la variété et/ou de la quantité des composés phénoliques qui se trouvent dans les trois extraits de *D. gnidium*.

La teneur en polyphénols des extraits brute et d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de *Daphne oleoides* est de $(117,45 \pm 1,25 \text{ mg EAG/g d'extrait})$ et $(221,00 \pm 1,01 \text{ mg EAG/g d'extrait})$, respectivement (Süntar et al., 2012). Ces valeurs ne sont pas en similitude avec nos résultats qui montrent que ces mêmes extraits dans l'espèce *gnidium* sont très pauvres en polyphénols. De même, l'EAc de l'espèce *oleoides* est le plus riche en polyphénols, par contre dans l'espèce *gnidium*, l'ECh est le plus représenté des extraits. Ces différences résultent vraisemblablement aux différences génotypiques (*D. gnidium* et *D. oleoides*), environnementales (à savoir le climat, origine géographique, la température, la fertilité, les maladies et l'exposition aux parasites) et la période de récolte des échantillons. Ces paramètres sont strictement liés à la biosynthèse des métabolites secondaires et en particulier les composés phénoliques. Cependant, l'utilisation de différentes méthodes d'extraction et différents solvants peuvent influencer la teneur des extraits en polyphénols.

La quantification des flavonoïdes dans les trois extraits de *D. gnidium* est déterminée selon la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Bahorun et al., 1996). Les résultats ont montré que l'EAc est le plus riche en ces composés avec une teneur de $(133,07 \pm 2,84 \text{ mg EQ/g d'extrait})$. Les deux autres extraits (EBr et ECh) présentent des teneurs assez faibles avec des valeurs de $22,22 \pm 1,48 \text{ mg EQ/g d'extrait}$ et $36,55 \pm 1,72 \text{ mg EQ/g d'extrait}$, respectivement. La méthode d'extraction suivie pour préparer les différents extraits de plantes influence leurs contenus en polyphénols et en flavonoïdes et par conséquent les propriétés antioxydantes de ces extraits seront affectées (Waterhouse et al., 1996).

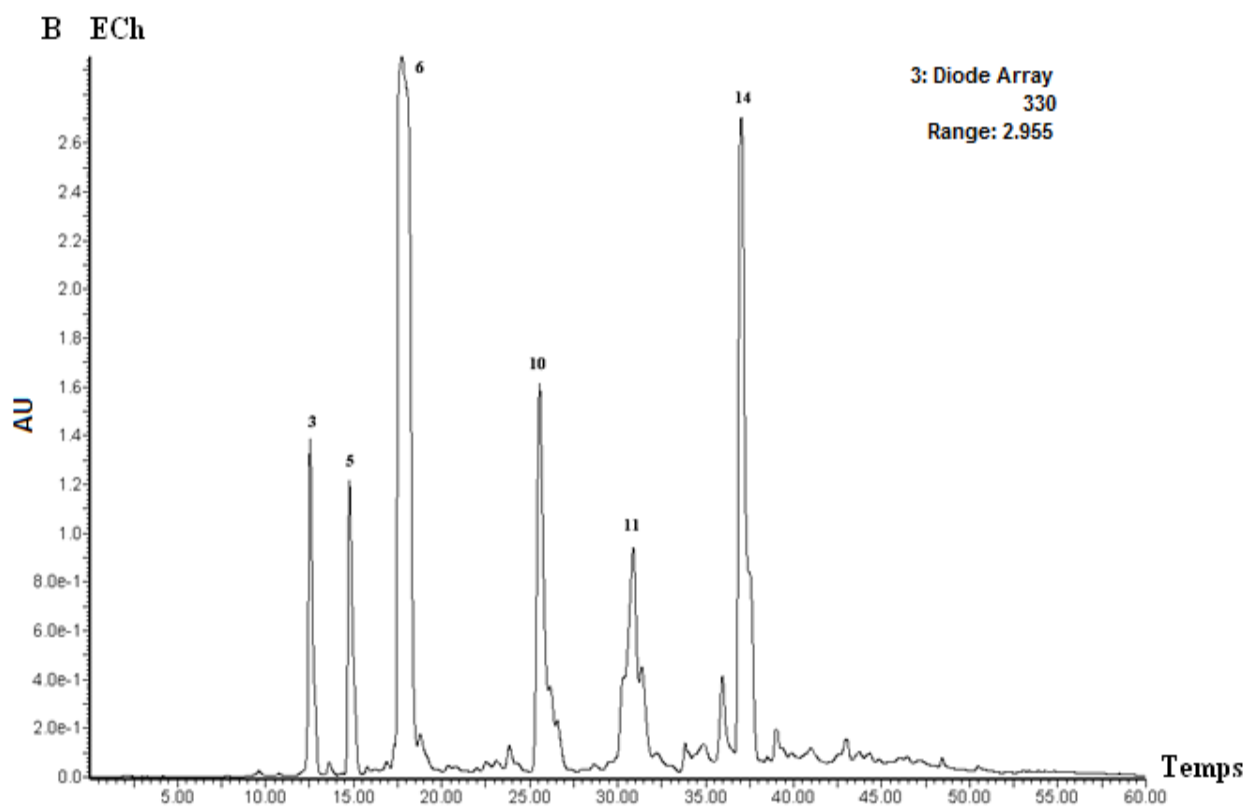
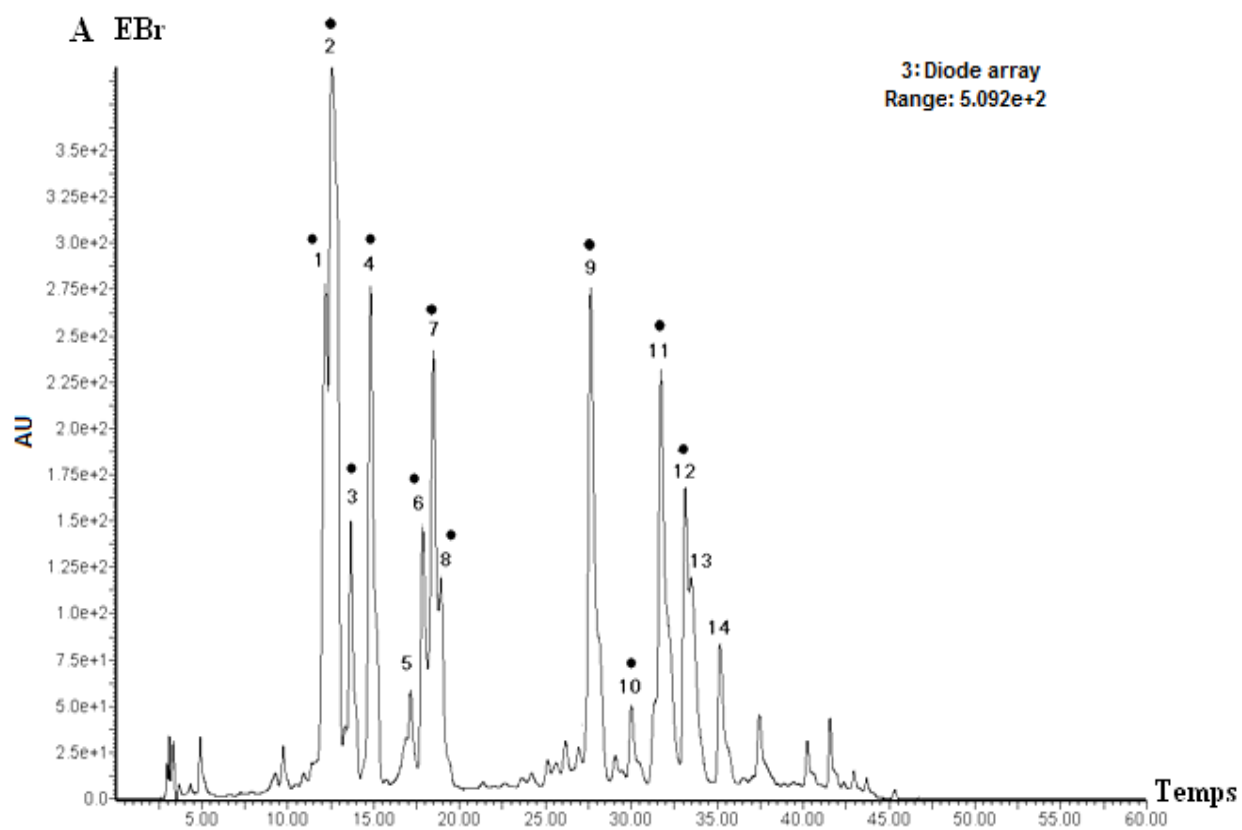
Le coefficient de corrélation ($R^2 = 0,237$) exprime l'absence de corrélation entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de *D. gnidium*. Ce même résultat a été obtenu par Athamena et ses collaborateurs (2010).

2. La Chromatographie Liquide de Haute Performance (HPLC)

Les composés phénoliques des extraits de la partie aérienne de *D. gnidium* ont été séparés par la technique d'HPLC. Ce système consiste à séparer des substances de l'échantillon sur une colonne chromatographique qui sont très souvent détectées par un détecteur classique, du type UV-DAD (ultra-violet et détecteur à barrette de diode) et il permet, de ce fait, d'offrir une première information sur la nature des composés possédant un chromophore. L'analyse préliminaire des pics des spectres obtenus par LC/UV-VIS/DAD donne une indication primaire sur la famille des composés phénoliques (Simirgiotis et *al.*, 2009).

Les spectres UV obtenus pour chaque extrait sont présentés sur la **figure 14**. L'analyse phytochimique des spectres UV obtenus de différents extraits de *D. gnidium* nous a montré l'existence d'une variété assez importante de composés phénoliques. Il ressort de cette analyse que les composés chimiques majoritaires dans l'EBr sont représentés par les dérivés d'acide férulique (pics 1-2 ; 30,68%) et les dérivés d'acide cinnamique (pics 4-6-7-8 ; 22,36%). Les composés à quantité modérée (légères) sont représentés par la lutéoline glucoside (pic 11 ; 14,07%), les dérivés d'apigénine (pics 12-13-14 ; 12,99%) et la quercétine 3-O-glucoside (pic 9 ; 11,98%). Par contre, les autres composés ne sont présents qu'en faible quantité ; un dérivé de génistéine (isoflavone) (pic 3 ; 4,6%), le vicénine-2 (pic 5 ; 2,96%) et un dérivé de la quercétine (pic 10 ; 1,49%) (**Figure 14**). Dans l'ECh le composé chimique le plus fréquent est figuré par le dérivé d'acide cinnamique (pic 6 ; 38,61%) suivi par un dérivé d'apigénine (pic 14 ; 20,01%) dont l'intensité de leurs pics est importante (**figure 14**). L'ECh contient encore de la lutéoline glucoside (pic 11 ; 14,64%), un dérivé de la quercétine (pic 10 ; 12,83%), un dérivé de génistéine (pic 3 ; 7,09%) et le vicénine-2 (pic 5 ; 6,79%). L'EAc est qualitativement le plus riche en substances phénoliques des extraits de *D. gnidium* (**Figure 14**). D'après le spectre UV-VIS de l'EAc, les pics 13, 10 et 12 ont montré une forte intensité

qui sont respectivement correspondants aux méthyl apigénine glucoside (18%), quercétine 3-O-glucoside (17,55%) et lutéoline glucoside (15,06%). Un isomère de la lutéoline glucoside est encore identifié et représenté par le pic 14 (5,54%). Le pic 3 est identifié comme un dérivé de génistéine alors que les pics 4 et 5 sont des isomères de dérivé d'acide férulique (pic 2 ; 8,14%) dont leur surface (pics 3, 4 et 5) est de (19,19%). Le pic 6 est encore identifié comme un isomère de dérivé d'acide férulique dont son pourcentage est de (3,23%). L'EAc renferme également des acides phénoliques tels que l'acide gallique (pic 1 ; 3,06%), les dérivés de l'acide *p*-coumarique (pics 7-8-9 ; 8,39%) et un dérivé d'acide férulique (pic 2 ; 8,14%). Un dérivé de la quercétine est encore identifié et représenté par le pic 11 (1,24%).



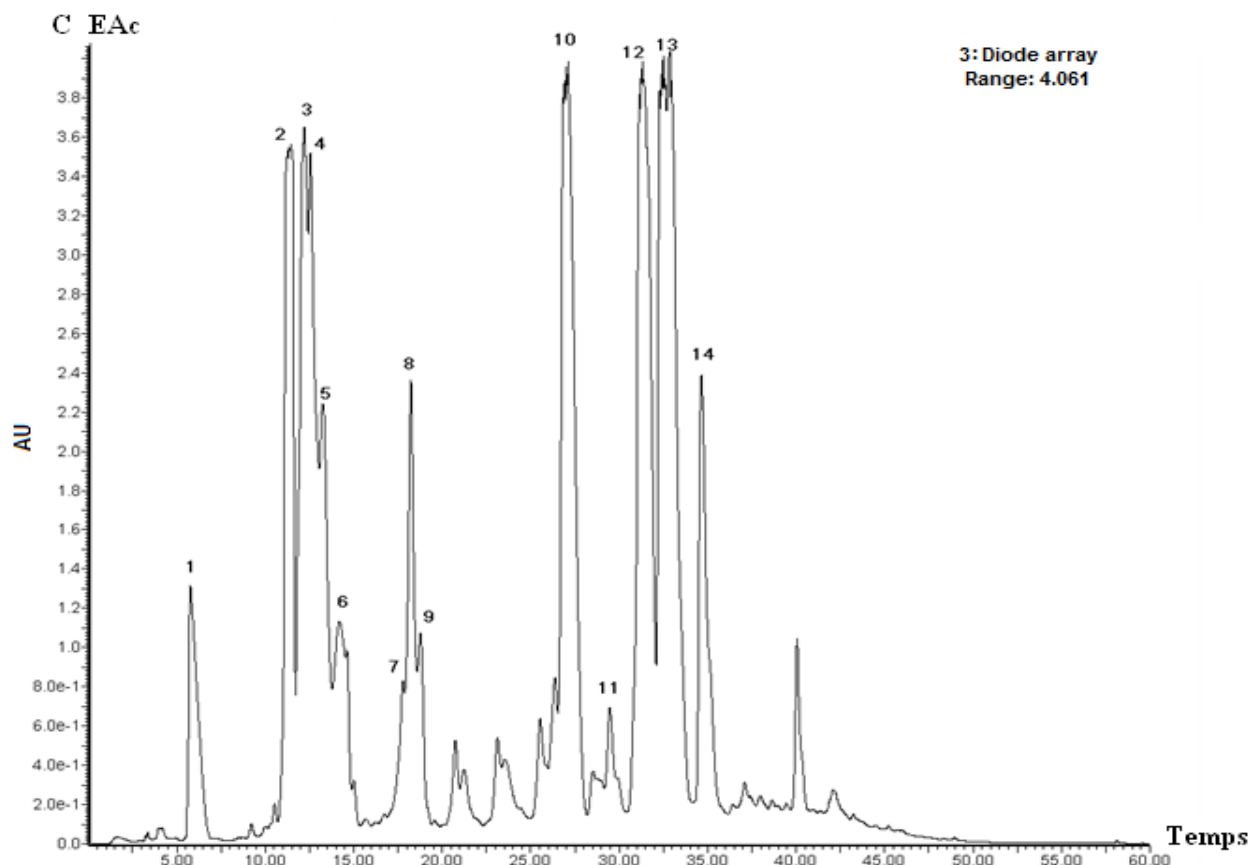


Figure 14. Les spectres UV des extraits de *D. gnidium* L. visualisés à 330 nm. A, EBr; B, ECh; C, EAc. **(A):** Pics : 1, 2: dérivés d'acide férulique; 3 : dérivé de génistéine (isoflavone); 4, 6, 7, 8 : dérivés d'acide cinnamique ; 5 : vicénine-2 ; 9 : quercétine 3-O-glucoside ; 10 : dérivé de la quercétine ; 11 : lutéoline glucoside ; 12, 13, 14 : dérivés d'apigénine. **(B) :** Pics : 3 : dérivé de génistéine (isoflavone) ; 5 : vicénine-2 ; 6 : dérivé d'acide cinnamique ; 10 : dérivé de la quercétine ; 11 : lutéoline glucoside ; 14 : dérivé d'apigénine. **(C) :** Pics : 1 : acide gallique ; 2 : dérivés d'acide férulique (comme le rhamnoside) ; 3 : dérivé de génistéine (isoflavone) ; 4, 5, 6 : isomères de pic 2 ; 7, 8, 9 : dérivés d'acide *p*-coumarique ; 10 : quercétine 3-O-glucoside ; 11 : dérivé de la quercétine ; 12, 14 : lutéoline glucoside ; 13 : méthyl apigénine glucoside.

D'après cette analyse, on constate que les mixtures des tiges et des feuilles de *D. gnidium* montrent une richesse en dérivés d'acides phénoliques (dérivés d'acide férulique et

d'acide cinnamique) et en flavonoïdes (flavones et flavonoles). Ces résultats sont identiques à ceux déjà trouvés la littérature et ces composés sont très bien connus par leurs multiples effets biologiques et sont presque responsables de toutes les propriétés médicinales accordées à cette espèce (Chaabane et *al.*, 2012 ; Harizi et *al.*, 2011 ; Marques et *al.*, 2009).

L'étude phytochimique menée par Marques et ses collaborateurs, (2009) sur les feuilles de *D. gnidium* a révélé que leur groupe chimique majoritaire est représenté par les coumarines ; daphnine, daphnéline, daphnéline-8-*O*-glucoside et daphnéline-*O*-di-glycoside. Les feuilles sont également constituées d'une autre classe de composés chimiques de grande importance biologique, elle est représenté par les flavonoïdes (flavones) ; apigénine, lutéoline, apigénine-6,8-di-*C*-glucoside, apigénine-7-*O*-glucoside, genkwanine glycoside, lutéoline-di-*O*-glucoside, lutéoline-3,7-di-*O*-glucoside, lutéoline-7-*O*-glucoside. Une autre étude phytochimique a montré que les tiges de *D. gnidium* sont principalement constituées de quatre coumarines (daphnéline, daphnine, acétylumbelliferone et daphnoreline) et sept flavonoïdes (lutéoline, orientine, isoorientine, apigénine-7-*O*-glucoside, genkwanine, 5-*O*- β -D-primeverosyl genkwanine, and 2, 5, 7, 4'-tétréhydroxyisoflavanol) (Cottiglia et *al.*, 2001).

La comparaison de nos résultats à ceux rapportés par (Marques et *al.*, 2009 ; Cottiglia et *al.*, 2001) a montré l'existence de quelques analogies confirmant nos résultats. La présente étude et les deux travaux précédents révèlent effectivement la présence en commun des composés suivants : lutéoline glucoside (flavone), dérivés d'apigénine (flavone), dérivé de génistéine (isoflavone) et le genkwanine glucoside qui s'est pu représenter dans notre étude par le méthyl apigénine glucoside qui est la fraction majoritaire de l'EAC. Notre analyse phytochimique a révélé encore la présence de la quercétine-3-*O*-glucoside et un autre dérivé de la quercétine (non déterminé) ce qui est en accord au résultat rapporté par Deina et *al.*, (2003). D'autre part, (Marques et ses collaborateurs, 2009) et (Cottiglia et ses collègues,

2001) ont pu isoler d'autres composés chimiques (coumarines, orientine...etc) qui ne sont pas identifiés dans notre analyse. De même, on a identifié des acides phénoliques et leurs dérivés (acide gallique, dérivés des acides férulique, cinnamique et *p*-coumarique) et un autre flavone (vecinine-2) mais leurs identification dans les deux études précédentes est absente. Ceci est en partie du à la partie de la plante utilisée (tiges, feuilles ou une mixture tiges/feuilles) ou encore à la procédure d'extraction suivi pour extraire les différents composés actifs de la plante. Donc, on peut déduire que l'absence des pics caractéristiques des coumarines dans les différents spectres UV obtenus est du à l'épuisement de ce groupe chimique dans la fraction hexane.

3. Purification de la xanthine oxydoréductase bovine et humaine (B-H-XOR)

La purification de la XOR est réalisée selon le protocole décrit par Baghiani et *al.*, (2003). Ce protocole permet d'obtenir l'extrait brut de la XOR. L'obtention de l'enzyme pure est réalisée par la chromatographie d'affinité sur colonne contenant un gel d'héparine-agarose. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 2**.

Tableau 2. Résultats de la purification de la XOR à partir du lait humain et bovin.

	Activité spécifique (n mole/min/mg d'enzyme)		Pourcentage de la forme oxydase (XO)	Rapport protéine/flavine (PFR)	Rendement (mg d'enzyme/litre du lait)
	Totale	XO			
XORB	2055.05	1988.55	91.89	5.15	23.21
XORH	114.16	110.47	90	7.1	8.5

* L'activité totale et l'activité de la forme oxydase ont été calculées en suivant la production de l'acide urique en présence et en absence de 500 μ M de NAD⁺ respectivement, et 100 μ M de xanthine dans un tampon Na-bicine à pH 8.3.

Le rendement de la purification est de 23.21 mg d'enzyme par litre du lait bovin, ce rendement est comparable à celui trouvé par Abadeh et *al.*, (1992) et par Baghiani et *al.*, (2002; 2003). L'activité spécifique de l'enzyme pure sous forme oxydase est de 1988.55 nmole/min/mg d'enzyme. Cette activité est comparable à celle trouvée par Baghiani et *al.*, (2003) (2240 nmole/min/mg d'enzyme).

Le rendement de la purification pour la XOR humaine est de 8.5 mg d'enzyme par litre du lait humain. L'activité spécifique de l'enzyme pure sous forme oxydase est de 114.47 nmole/min/mg d'enzyme.

Le spectre d'absorption de la XOR bovine en UV-Visible a révélé trois pics majeurs à 280, 330 et 450 nm qui correspondent à l'absorbance des protéines, le Fe-S et le centre FAD, respectivement (**Figure 15**). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Abadeh et *al.*, (1992), Sanders et *al.*, (1997) et par Baghiani et *al.*, (2003). Le PFR (Protein/Flavin Ratio) ou le rapport A_{280nm}/A_{450nm} est généralement utilisé comme indice de la pureté de la XOR dont la valeur 5 est considérée comme critère de pureté (Bray, 1975). L'obtention d'un PFR égale à 5.15 dans notre travail indique la pureté de notre enzyme et ce résultat est comparable à celui trouvé par Abadeh et *al.*, (1992) (5.13) et par Benboubetra et *al.*, (2004) (5.34).

Pour confirmer nos résultats sur la pureté de la XOR bovine, une électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant (SDS-PAGE) a été faite sur la solution enzymatique. Une bande majeure d'un poids moléculaire approximativement 150 KDa a été observée sur l'électrophorégramme (**Figure 15**). Ces mêmes résultats ont été observés par Abadeh et *al.*, (1992), Baghiani et *al.*, (2002).

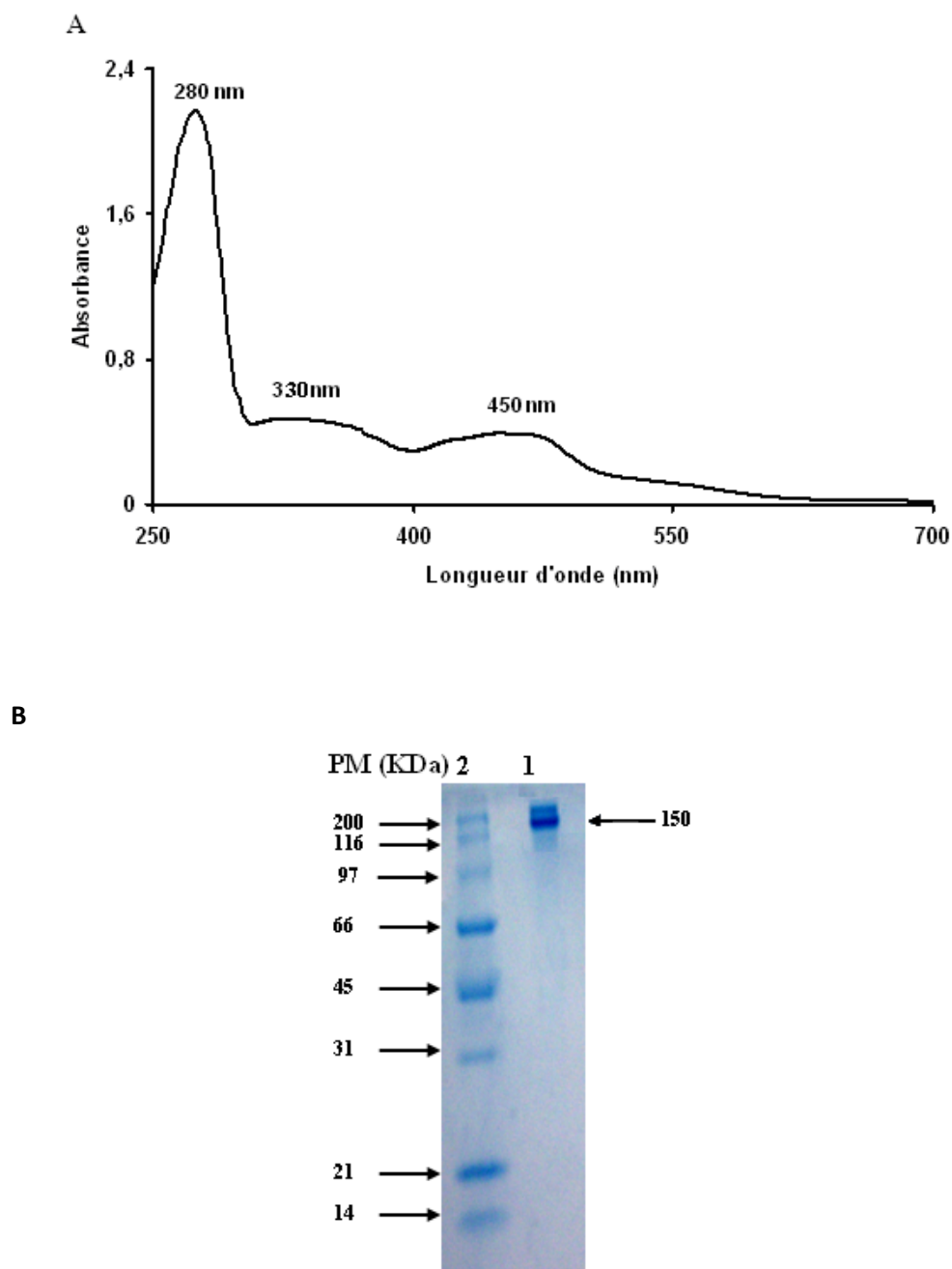


Figure 15: Spectre d'absorption UV-Vis (**A**) et électrophorèse (SDS-PAGE) (**B**) de la XO purifiée. **B1:** XO pure (150 000 Da), **B2:** Standards des poids moléculaires (Myosin 200 000; β -galactosidase 116 250; Phosphorylase b 97 400; Serum albumin 66 200; Ovalbumin 45 000; Carbonic anhydrase 31 000, Trypsin inhibitor 21 500 et Lysozyme 14 400 Da).

4. Inhibition de l'activité XO par les extraits de *D. gnidium*

L'allopurinol, inhibiteur spécifique de la XO, est généralement l'inhibiteur le plus connu pour le traitement de la goutte. Cependant, l'utilisation de l'allopurinol a des effets secondaires indésirables (Richette and Bardin, 2010). En effet, la recherche de nouvelles molécules inhibitrice de la XO avec plus d'effets thérapeutiques et moins d'effets indésirables est nécessaire pour le traitement de différentes maladies liées au XO. Des études récentes ont été intéressées à la recherche des inhibiteurs dans les produits naturels allant des polyphénols à une foule de produits végétaux (Lina et al., 2015 ; Argulla and Chichioco-Hernandez, 2014).

Dans la présente étude, l'effet inhibiteur de différents extraits de *D. gnidium* sur l'activité XO est déterminé par la mesure de la production de l'acide urique à 295 nm. Cela est réalisé par l'utilisation des concentrations variables de l'extrait à tester (EBr, ECh ou EAc) avec une concentration fixe de la xanthine (100 μ M). L'allopurinol est utilisé comme un standard.

Les résultats montrent que tous les extraits de *D. gnidium* ont un effet inhibiteur dose dépendante sur l'activité xanthine oxydase (**Figure 16**). Pour l'inhibition de la XOB, l'EAc a démontré une activité inhibitrice intéressante avec un pourcentage d'inhibition de 60,81% à une concentration de 0,046 mg/ml. L'EBr présente un pourcentage d'inhibition de 59,91 %, proche à celui d'EAc mais à une concentration de 0,075 mg/ml. L'ECh semble être le plus faible inhibiteur des extraits de *D. gnidium* avec un maximal d'inhibition de 60,58% à une concentration de 0,093 mg/ml.

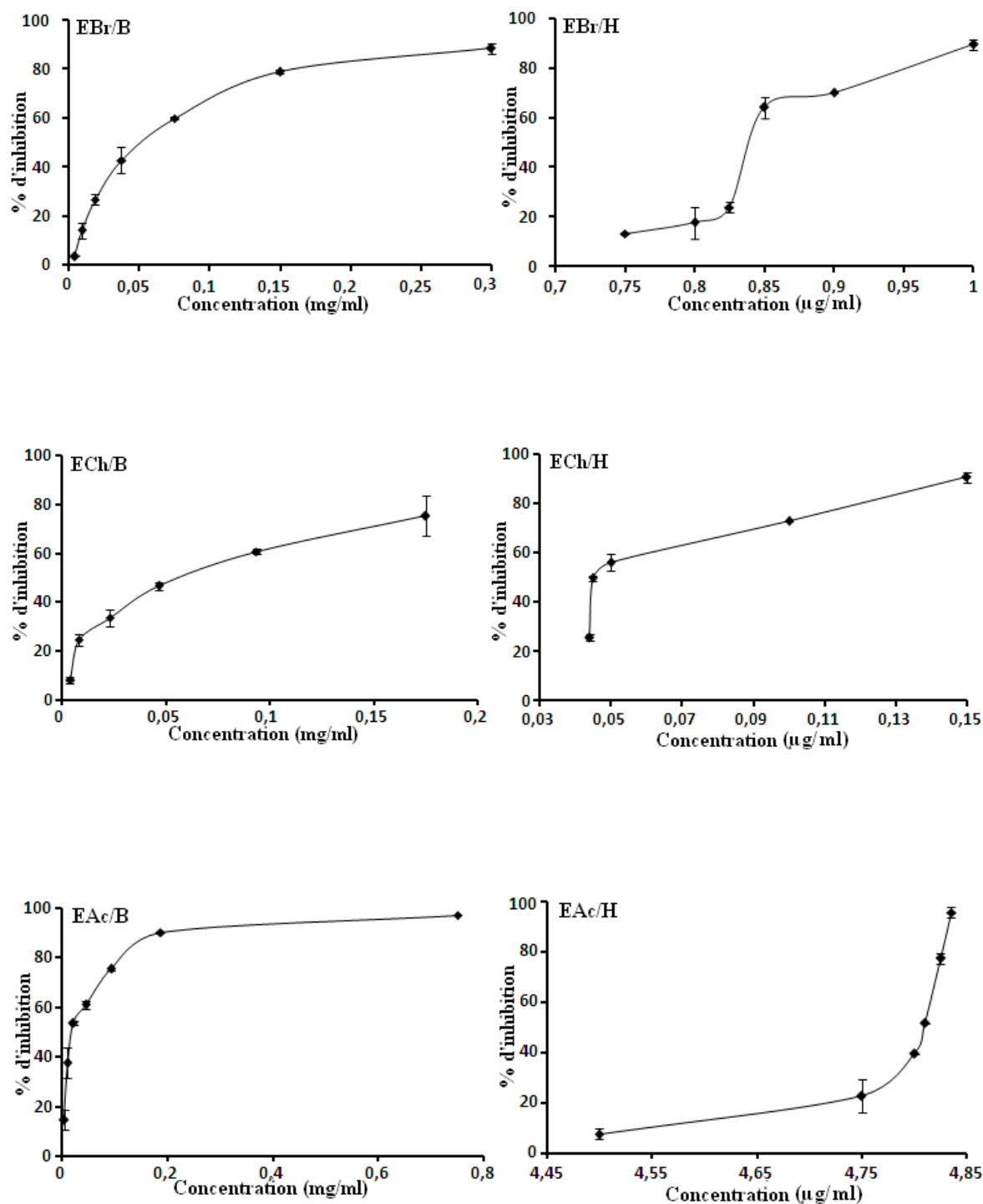


Figure 16. L'inhibition de la XO par les extraits de *D. gnidium*. B : Bovin, H : Humain, EBr : Extrait brut, ECh : Extrait chloroformique, EAc : Extrait acétate d'éthyle. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.

La comparaison des IC_{50} des extraits de *D. gnidium* avec celui de l'allopurinol a révélé que ce dernier a un puissant effet inhibiteur sur l'activité XOB ($p \leq 0.01$) (**Figure 17A**). Les valeurs des IC_{50} sont dans l'ordre suivant ; $0,0073 \pm 0,0001$ mg/ml $< 0,021 \pm 0,001$ mg/ml $< 0,039 \pm 0,002$ mg/ml $< 0,061 \pm 0,001$ mg/ml pour l'allopurinol, EAc, EBr et ECh, respectivement.

Par contre, l'ECh qui a montré le plus faible effet inhibiteur sur l'activité XOB, il a montré une importante capacité inhibitrice sur l'activité XOH avec une valeur d' IC_{50} de 0.0039 ± 0.001 µg/ml ($p \leq 0.01$) suivi par l'ECh et l'EAc avec des valeurs des IC_{50} de 0.866 ± 0.013 µg/ml et 4.8094 ± 0.0004 µg/ml, respectivement.

La comparaison des IC_{50} révèle que l'allopurinol a présenté le plus faible effet inhibiteur sur l'activité XOH avec une valeur d' IC_{50} de $(14,07 \pm 0,09$ µg/ml) ($p \leq 0.001$) qui est 3, 16 et 354 fois moins faibles que celles de l'ECh, l'EBr et l'EAc, respectivement (**figure 17B**). L'ordre décroissant de l'activité inhibitrice sur l'activité XOH est comme suivant ECh > EBr > EAc > Allopurinol qui est le contraire de celui obtenu avec la XOB ; Allopurinol > EAc > EBr > ECh.

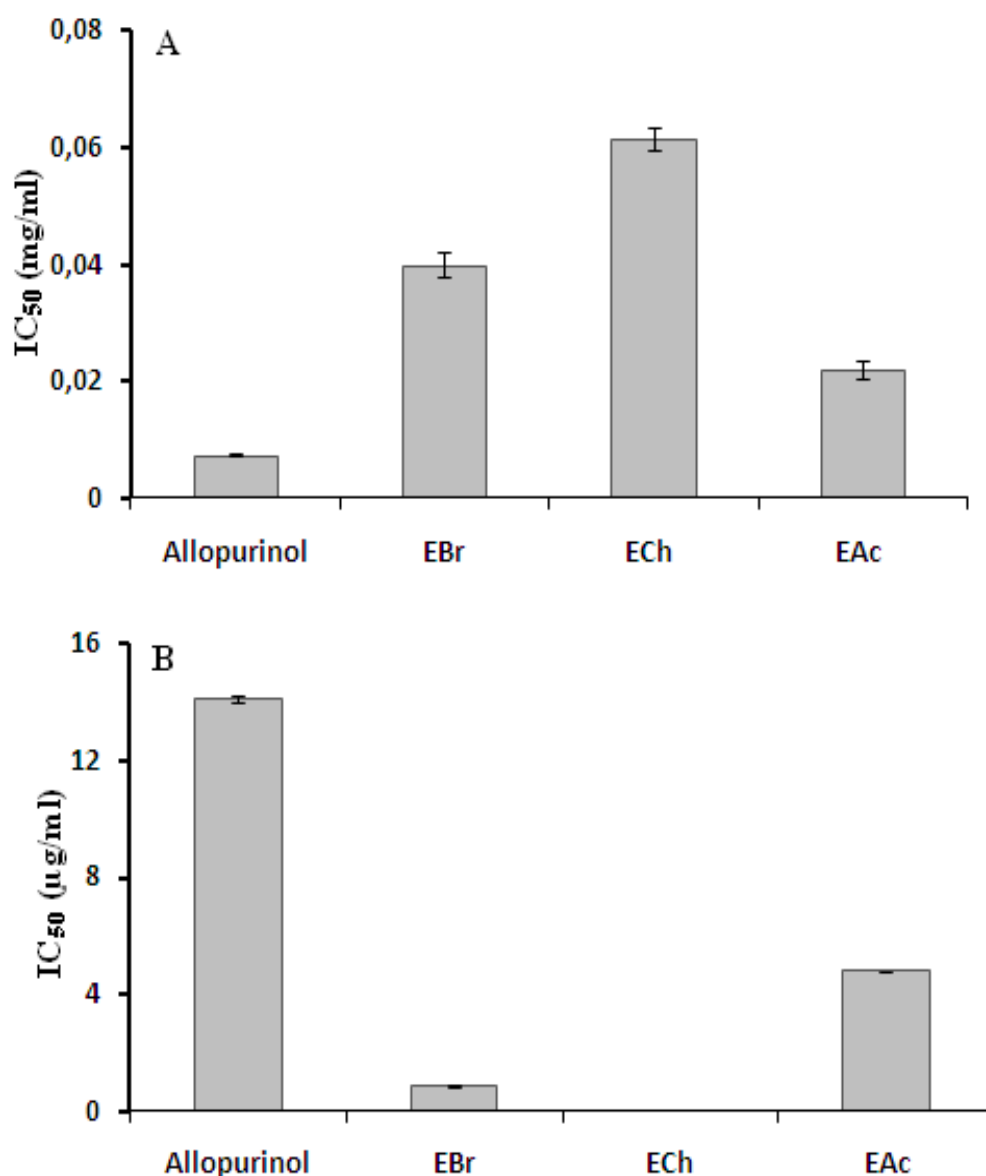


Figure 17. Comparaison de l'effet inhibiteur de différents extraits de *D. gnidium* L. avec celui de l'allopurinol sur l'activité (A) ; XO, (B) ; XOH. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD (XO ; $p \leq 0.01$), (XOH ; $p \leq 0.001$).

La comparaison des IC₅₀ obtenues pour les deux types d'enzyme montre que les valeurs d'IC₅₀ obtenues pour la XOH (en µg) sont statistiquement inférieures à celles obtenues pour la XO (en mg) ($p \leq 0.001$) (**figure 18**). Cela est totalement logique, vu l'activité enzymatique de la XOH qui est 18 fois moins faible que celle de la XO.

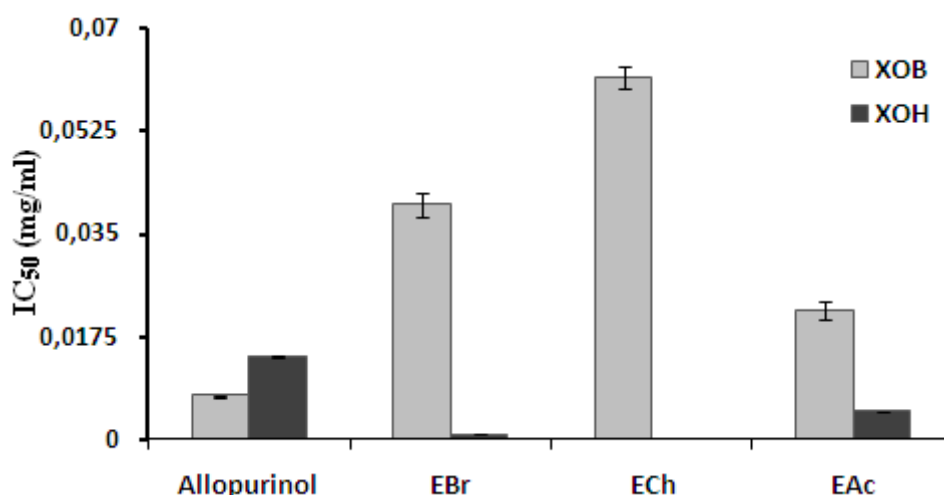


Figure 18. Comparaison de l'effet inhibiteur sur l'activité XOB et XOH de l'allopurinol et de différents extraits de *D. gnidium* L. ($p \leq 0.001$).

Les polyphénols et en particulier les flavonoïdes ont été identifiés comme une large classe de produits chimiques avec des propriétés inhibitrices de l'activité XO, et leur rôle a été complètement évalué (Lespade and Bercion, 2010 ; Van Hoorn *et al.*, 2002). Plusieurs études *in vitro* ont démontrés les effets inhibiteurs sur l'activité XO des aliments (Dew *et al.*, 2005) et les plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle autour du monde (Sweeney *et al.*, 2001 ; Nguyen *et al.*, 2004 ; Umamaheswari *et al.*, 2007). Dans ce travail, les différents extraits de *D. gnidium* montrent des effets inhibiteurs variables sur l'activité XO. L'activité antioxydante de différents extraits de *D. gnidium* est éventuellement attribuée à leur contenu en composés phénoliques et flavonoïdiques. L'EAc, est le plus riche en flavonoïdes présente un puissant effet inhibiteur sur l'activité XOB. Cette extrait est riche en quercétine 3-O-glucoside, méthyl apigénine glucoside et lutéoline glucoside et leur dérivés. Presque, des mêmes composés ont été identifiés dans quelques plantes Italiennes et sont tous présentées une activité inhibitrice sur la XO (Montoro *et al.*, 2005). Par contre, l'EBr est moins riche en polyphénols et en flavonoïdes par rapport à l'ECh, mais il a présenté un effet inhibiteur plus

puissant que ce dernier sur l'activité XOB. De même, l'EAc qui est le plus riche en composés phénolique a révélé le plus faible effet inhibiteur sur l'activité XOH. Cela est probablement dû à la qualité ou à la structure (nature, nombre et la position des substituant) des flavonoïdes et les composés phénoliques présents dans chaque extrait.

La relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice sur la XO a été déterminée (Cos et *al.*, 1998 ; Lin et *al.*, 2002). Selon ces auteurs, la présence des groupes 5-OH et 7-OH ainsi que la fonction carbonyle sur le carbone C4 de flavonoïde interviennent dans les interactions hydrogènes et électrostatiques entre l'inhibiteur et le site actif de l'enzyme. De même, la présence de la double liaison C2-C3 est très importante pour l'inhibition de l'activité XO. Les mêmes auteurs ont constaté que les flavonoïdes glycosylés présentent des effets inhibiteurs sur l'activité XO mais inférieur à leurs analogues non glycosylés. D'après les résultats obtenus par la technique d' HPLC, les différents extraits de *D. gnidium* présentent des quantités variables en acides phénoliques et leurs dérivés, en flavones glucosides et dérivés de flavones, en flavonols glucosides et dérivés de flavonols ainsi qu'en isoflavones. Il est possible que certaines structures (dérivés de flavones et flavonols) satisfaites aux critères démontrés par Cos et ses collaborateurs (1998) et par conséquent, elles agissent sur l'inhibition de l'enzyme XO.

Dans leur étude de l'effet inhibiteur de certain nombre de flavonoïdes sur l'inhibition de la XO, Khlebnikov et ses collaborateurs (2007) ont montré l'importance de la nature de substituant (CH₃, OH, glycosylation...) et sa position sur les cycles A et B (C3, C4', C7, C2', C3', C5') des flavones sur l'activité de cette enzyme. Encore, l'hydroxylation et la méthylation des cycles A et B peuvent rendre les flavonoïdes insolubles dans le milieu réactionnel ce qui conduit à la suppression de leur activité inhibitrice sur la XO.

Certains flavonoïdes présentent des types d'inhibition différents sur l'enzyme XO (Lin et *al.*, 2002). En conséquence, la présence d'une variété de structures phénoliques dans un extrait, avec des types d'inhibition différents, peut renforcer ou diminuer en quelque sorte l'effet inhibiteur de cet extrait.

5. Effet scavenger des extraits de *D. gnidium* sur l'O₂⁻ produit par la XO

L'anion superoxyde est considéré comme étant le chef de file des espèces réactives de l'oxygène. De part leur nature instable, les ROS sont toxiques et interagissent avec toute une série de substrats biologiques importantes.

L'effet scavenger de différents extraits de *D. gnidium* sur le radical superoxyde a été évalué par l'utilisation d'un système enzymatique ; xanthine/xanthine oxydase (X/XO). Ce système est utilisé comme une source génératrice de l'O₂⁻ qui par la suite interagit avec le cytochrome c oxydé (cyt-c⁺³) conduisant à sa réduction en cytochrome c réduit (cyt-c⁺²) qui absorbe à 550 nm. La présence des antioxydants (piégeurs de l'O₂⁻) dans le milieu réactionnel empêche cette réduction ce qui mène à une diminution dans les valeurs d'absorbance. Ceci peut indiquer la quantité de l'O₂⁻ présente dans le milieu et le pouvoir piégeur de nos extraits.

Tous les extraits de *D. gnidium* ont présenté un effet scavenger sur l'O₂⁻ produit par la XO dont la relation est dose dépendante (**Figure 19**). L'ordre des extraits selon leur pouvoir antioxydant est comme suivant ; EAc > EBr > ECh avec des valeurs d'IC₅₀ de 0,0512 ± 0,0009 mg/ml, 0,064 ± 0,001 mg/ml et 0,69 ± 0,01 mg/ml, respectivement.

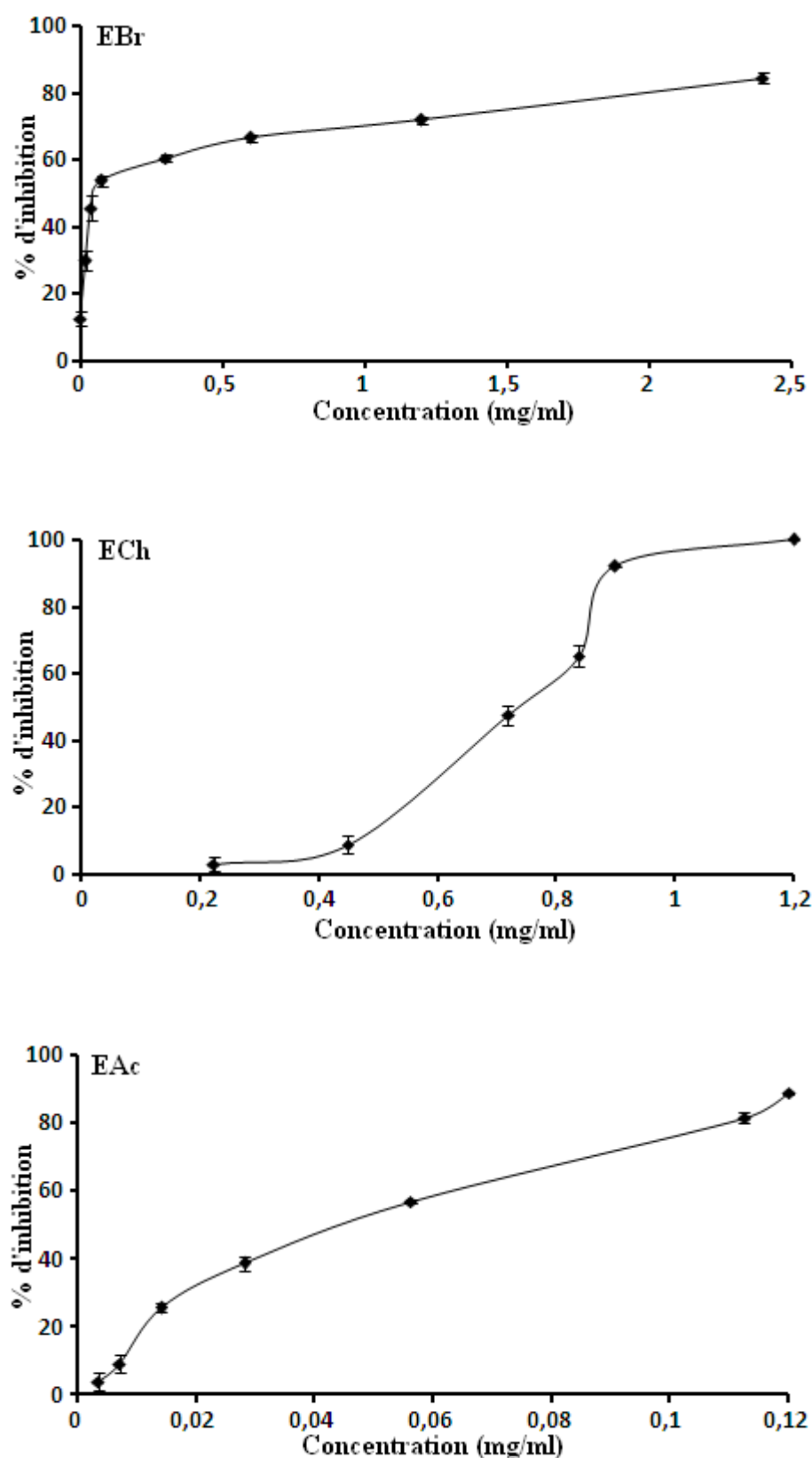


Figure 19. L'effet scavenger des extraits de *D. gnidium* sur l' $O_2^{\cdot -}$ généré par le système X/XO. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.

Dans le système de cytochrome c, l'effet scavenger de différents extraits de *D. gnidium* sur l' $O_2^{\cdot-}$ est peut être expliqué par trois réactions (A, B et C) illustrées par la **figure 20**. Avec l'inhibition de l'activité XO (réaction A), les extraits inhibent la formation de l'acide urique qui résulte à une suppression de la génération de l' $O_2^{\cdot-}$ et le H_2O_2 . Pour la réaction de réduction de la XO (réaction B), les extraits fonctionnent comme des agents réducteurs de la XO et l'enzyme réduite catalyse seulement la formation de H_2O_2 . Les extraits peuvent se fonctionner encore comme des piègeurs de l' $O_2^{\cdot-}$ (réaction C).

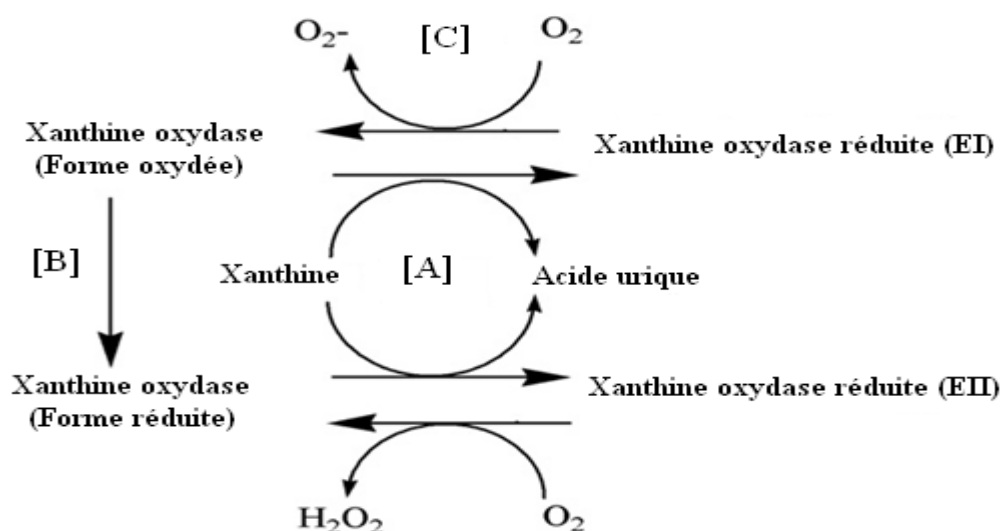


Figure 20. L'action inhibitrice des antioxydants sur la génération de l' $O_2^{\cdot-}$ par la XO est composée de trois réactions (A, B et C). [A] Inhibition de la XO par les antioxydants. [B] La réduction de la XO par les antioxydants. [C] Le piégeage de l' $O_2^{\cdot-}$ par les antioxydants (Masuoka et al., 2012).

D'après nos résultats précédents, tous les extraits de *D. gnidium* ont présenté un effet inhibiteur sur l'activité XO et on a constaté que les valeurs d' IC_{50} pour l'inhibition de la production de l'acide urique sont inférieures à celles de l'effet scavenger sur l' $O_2^{\cdot-}$ produit par le système X/XO (**Figure 21**). L'EBr et l'EAc semblent avoir le puissant effet piègeur sur l' $O_2^{\cdot-}$ où leurs valeurs d' IC_{50} sont 1,6 et 2,3 fois plus supérieures à celles de ces mêmes

extraits dans l'inhibition enzymatique, respectivement. L'ECh est le plus faible agent antioxydant des extraits de *D. gnidium* où sa valeur d'IC₅₀ pour le scavenger de l'O₂⁻ est 11,5 fois plus supérieure que celle dans l'inhibition enzymatique. Donc, à partir de cette comparaison de valeurs des IC₅₀, l'ordre des extraits en fonction de leur activité antioxydante dans le test de cytochrome c est alors comme suivant ; EBr > EAc > ECh au lieu de ; EAc > EBr > ECh. On déduit donc, que l'effet scavenger des extraits sur l'O₂⁻ est du à l'action inhibitrice mixte des extraits sur la génération de l'O₂⁻ (C) et la production de l'acide urique (réaction A). Cela explique l'existence d'une corrélation importante entre le test de l'inhibition enzymatique et celui de cytochrome c ($r^2 = 0,812$) ($p \leq 0.01$). Ce même résultat a été observé par (Cos et al., 1998) et (Masuoka et al., 2012) lors de leurs études de l'effet inhibiteur de la XO et piègeur de l'O₂⁻ d'une dizaine de flavonoïdes.

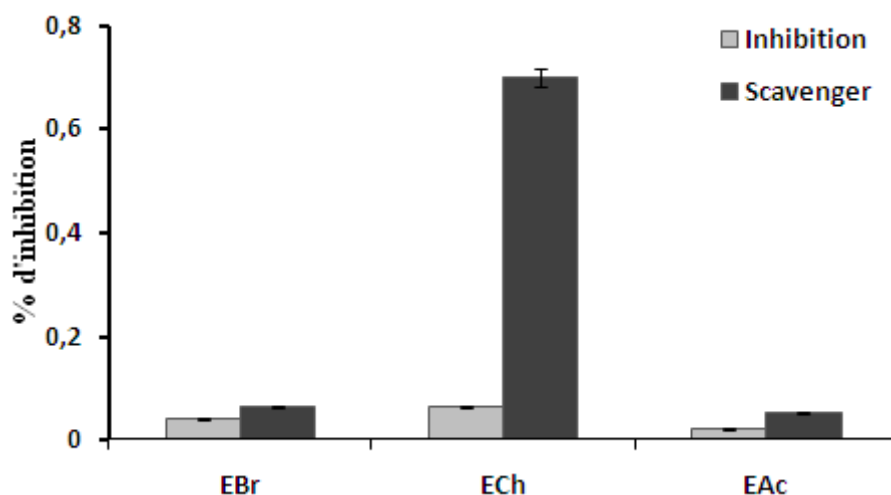


Figure 21. Comparaison entre l'effet inhibiteur sur l'activité XO et l'effet scavenger sur l'O₂⁻ généré par la XO de différents extraits de *D. gnidium* ($p \leq 0.001$).

6. Effet scavenger de l'anion superoxyde par le système PMS-NADH/NBT

Pour une meilleure caractérisation du pouvoir piègeur de différents extraits de *D. gnidium* sur le radical superoxyde, une méthode non enzymatique (PMS-NADH/NBT) a été utilisée. Dans ce système, l' $O_2^{\cdot-}$ est généré par la réaction de PMS, NADH et l'oxygène moléculaire. Le superoxyde formé réduit alors le NBT (Nitroblue tetrazolium) en formatant de couleur bleu qui absorbe à 560 nm. La présence des substances aptes à oxyder l' $O_2^{\cdot-}$ ralentira la réduction de NBT et aboutissant à la diminution des absorbances.

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits piègent le radical superoxyde d'une manière dose dépendante (**Figure 22**).

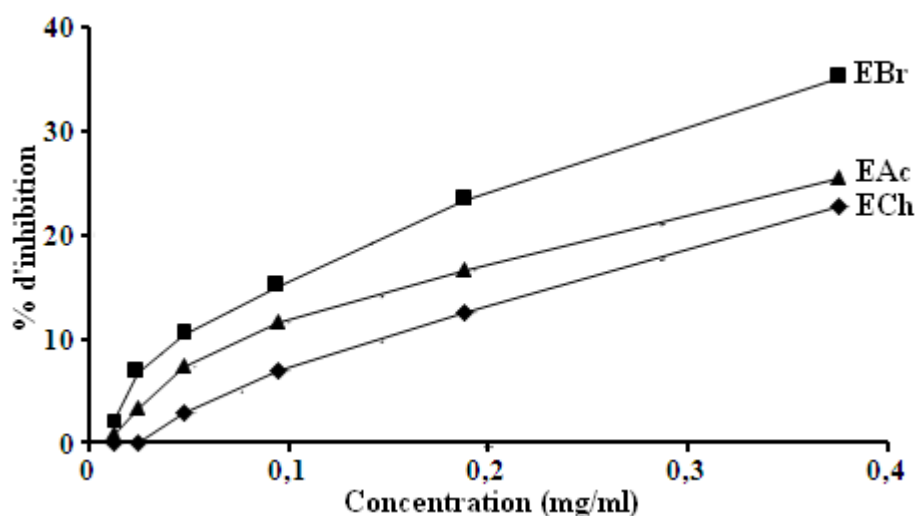


Figure 22. L'effet scavenger des extraits de *D. gnidium* sur l' $O_2^{\cdot-}$ généré par le système PMS-NADH/NBT. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.

L'EBr est le plus puissant piègeur de l' $O_2^{\cdot-}$ avec une valeur d' IC_{50} de $0,54 \pm 0,01$ mg/ml ($p \leq 0,01$). L'effet scavenger de l'EBr est une fois moins actif que celui de la quercétine ($0,465 \pm 0,005$ mg/ml) ($p \leq 0,001$) qui est le plus actif des antioxydants testés et 14 fois plus actif que l'acide gallique ($7,76 \pm 0,39$ mg/ml) ($p \leq 0,001$) (**Figure 23**). L'EAce et

l'ECh sont 2 et 3 fois moins actifs que la quercétine avec des valeurs d'IC₅₀ de $0,872 \pm 0,009$ mg/ml et $1,45 \pm 0,16$ mg/ml ($p \leq 0.001$), respectivement.

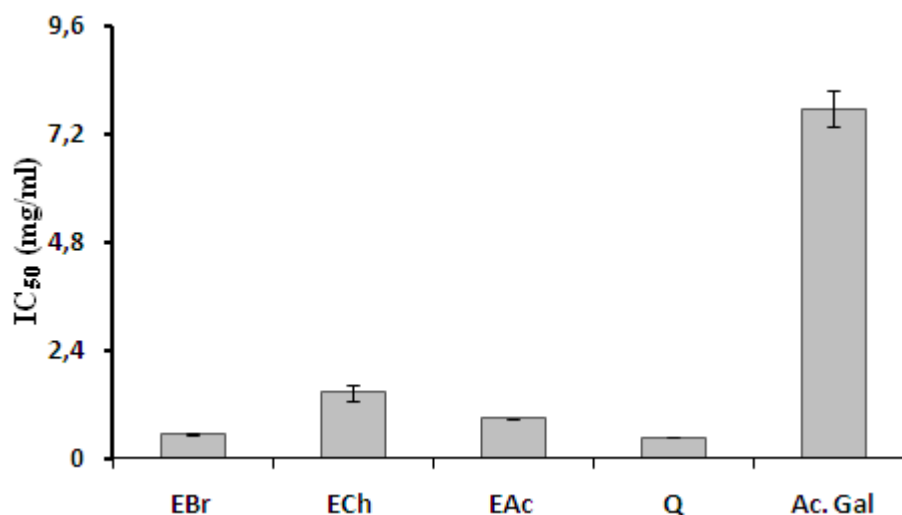


Figure 23. Comparaison de l'effet scavenger sur l'O₂⁻ entre la quercétine (Q), l'acide gallique (Ac. Gal) et les différents extraits de *D. gnidium*. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.001$).

L'ordre des extraits selon leur pouvoir piègeur sur l'O₂⁻ généré dans le système PMS-NADH/NBT est similaire à celui obtenu dans le système enzymatique (X/XO) (EBr > EAc > ECh), mais l'effet scavenger de différents extraits dans le système chimique est inférieur à celui obtenu par le système enzymatique (**Figure 24**). Ceci indique que l'effet scavenger de nos extraits sur le superoxyde est plus faible que leur effet inhibiteur sur la génération de l'O₂⁻ catalysée par la XO. Ce qui confirme nos résultats et nos raisonnements obtenus dans le test de cytochrome c. L'effet scavenger de différents extraits de *D. gnidium* sur l'O₂⁻ est probablement attribué à leur richesse en composés stimulant l'oxydation non enzymatique de l'O₂⁻ en molécules d'oxygène et par conséquent son élimination.

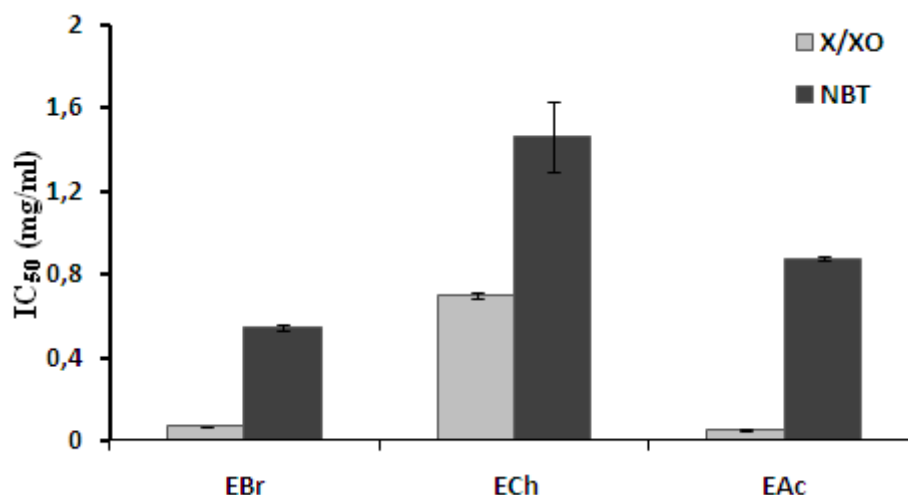


Figure 24. Comparaison de l'effet scavenger sur l' $O_2^{\cdot -}$ généré par le système X/XO et celui généré par le système PMS-NADH/NBT. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.001$).

En général, les résultats obtenus pour les systèmes X/XO et PMS-NADH/NBT sont en accords avec ceux rapportés par Masuoka et collaborateurs (2012) qui ont utilisé ces mêmes techniques pour étudier l'effet scavenger de 13 flavonoïdes sur l' $O_2^{\cdot -}$.

Les résultats de la présente étude montrent que tous les extraits ont présenté une corrélation linéaire importante entre leurs effets scavenger sur le radical superoxyde et leurs teneurs en composés phénoliques ($r^2 = 0,727$). Ceci nous mène à conclure que les polyphénols pourraient avoir un puissant effet scavenger sur l' $O_2^{\cdot -}$. Ce qui est en accord aux résultats de multiples travaux réalisés auparavant et qui ont rapporté l'existence d'une excellente corrélation entre l'activité antiradicalaire des plantes médicinales et leur composition en polyphénols (Youwei et al., 2008; Jayaprakasha and Patil, 2007; Hung and Yen, 2002; Zheng and Wang 2001).

Nos résultats révèlent encore l'absence d'une corrélation entre la teneur en flavonoïdes des extraits et leur effet scavenger sur le superoxyde ($r^2 = 0,001$). Cette corrélation négative entre l'activité antioxydante des extraits et leur teneur en flavonoïdes est peut-être expliquée

de fait qu'un extrait ou une fraction phénolique ne renferme pas obligatoirement tous les substances antioxydantes, et les interactions synergétiques entre les antioxydants dans une mixture rend l'activité antioxydante dépend non seulement de concentration des antioxydants mais aussi à leur structure et à leur nature (Djeridane et *al.*, 2006).

Les flavonoïdes sont très bien connus comme des potentiels piégeurs de radical superoxyde (Robak and Gryglewski, 1988). Les études de la relation structure-activité des flavonoïdes ont constamment prouvé que la structure catéchol ou pyrogallol de cycle B est indispensable pour un puissant effet scavenger des radicaux libres (Cos et *al.*, 1998 ; Bors et *al.*, 1990) alors que le cycle A est moins effectif (Senba et *al.*, 1999). Encore, la nature de substituant et sa position sur les cycles A et B des structures phénoliques peuvent influencer leur activité antiradicalaire (Lu and Yeap Foo 2001).

7. Test au 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le radical DPPH est largement utilisé comme un système modèle pour déterminer l'effet scavenger de multiples produits naturels tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les différents extraits de plantes (Chang et *al.*, 2007).

L'activité antiradicalaire de différents extraits de *D. gnidium* est mesurée en suivant l'apparition de la couleur jaune de DPPH réduit à 517 nm. Les résultats montrent que tous les extraits ont présenté une activité antiradicalaire dose-dépendante (**figure 25**) contre le radical DPPH. L'EBr est le plus actif des extraits de *D. gnidium* avec une valeur d'IC₅₀ de 0,066 ± 0,002 mg/ml ($p \leq 0.01$) suivi par l'ECh et l'EAc qui sont presque 4 fois moins actifs que l'EBr avec des valeurs des IC₅₀ de l'ordre de 0,247 ± 0,0003 mg/ml et 0,260 ± 0,006 mg/ml, respectivement.

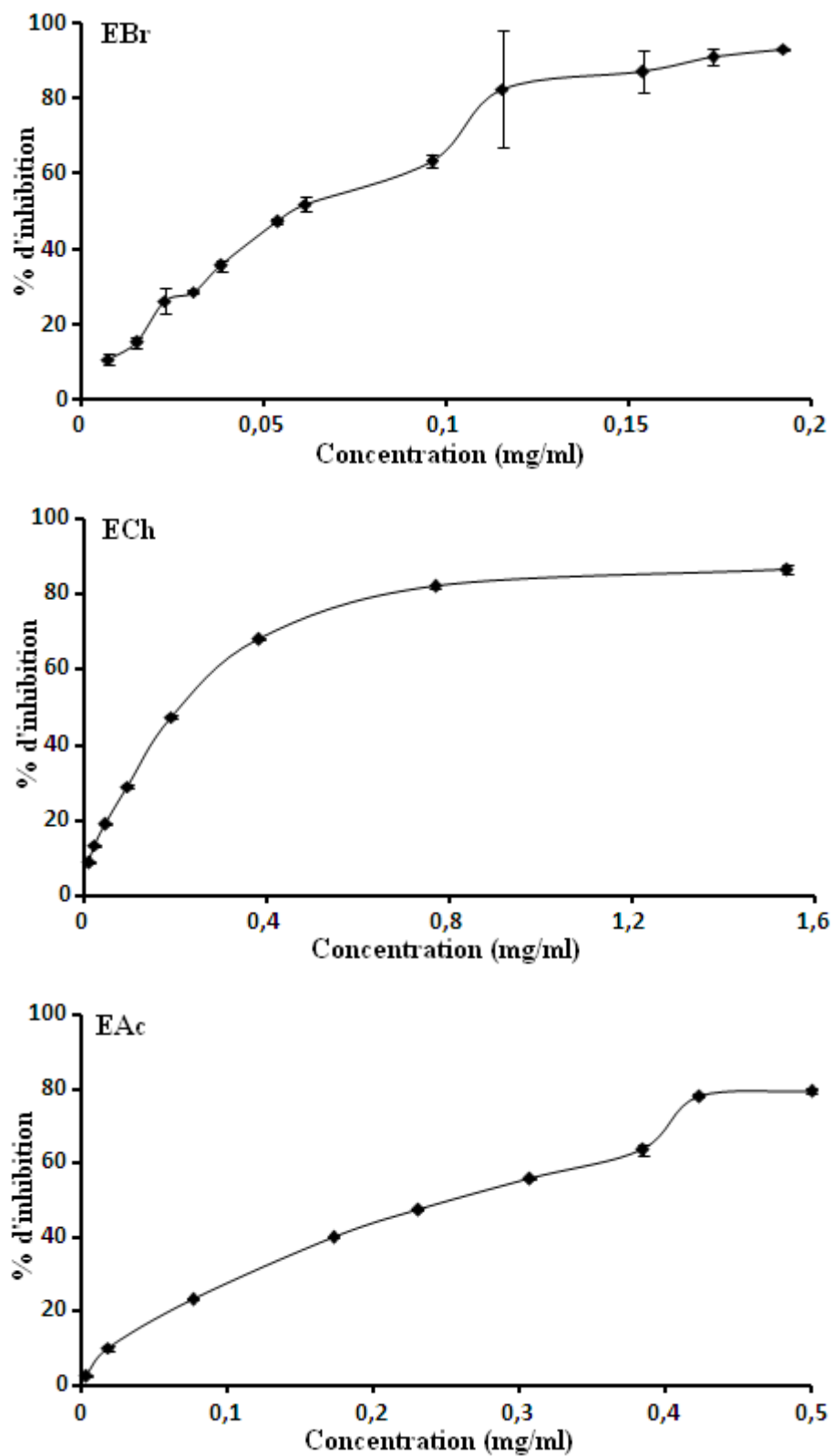


Figure 25. Effet piègeur de différents extraits de *D. gnidium* sur le radical DPPH. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.

L'activité antiradicalaire de trois standards a été démontré dans ce test ; l'acide gallique, la quercétine et la rutine. L'acide gallique est le plus puissant des standards testés avec une valeur d'IC₅₀ de $0,00056 \pm 0,00003$ mg/ml ($p \leq 0.01$) suivi par la quercétine et la rutine avec des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de $0,0034 \pm 0,00001$ mg/ml et $0,0041 \pm 0,00008$ mg/ml, respectivement. Le pouvoir antiradicalaire de nos extraits est extrêmement faible en comparaison aux standards testés ($p \leq 0.001$). L'EBr qui est le plus puissant des extraits est 16, 19 et 119 fois moins actif que la rutine, la quercétine et l'acide gallique, respectivement (figure 26).

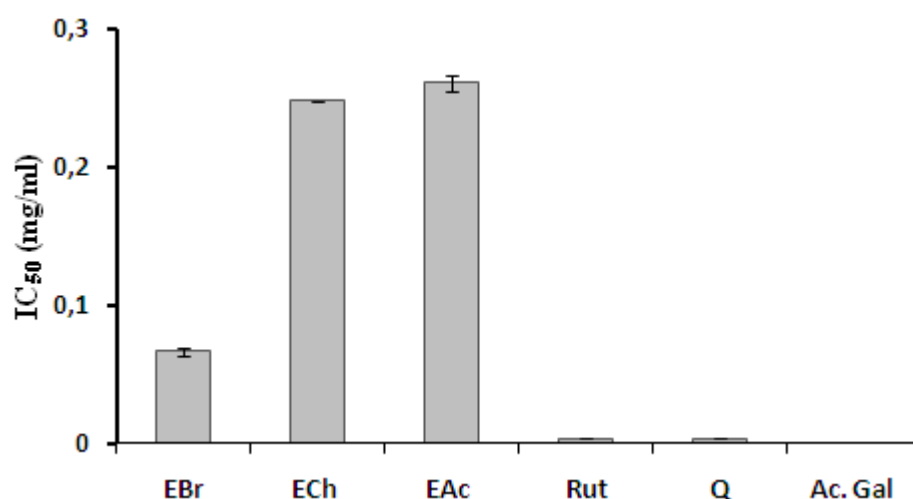


Figure 26. Comparaison de l'activité antiradicalaire de différents extraits de *D. gnidium* et des standards (Ac. Gal, acide gallique ; Q, quercétine ; Rut, rutine). Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD (Comparaison entre les extraits et la comparaison entre les standards ; $p \leq 0.01$. La comparaison entre les extraits et les standards ; $p \leq 0.001$).

L'activité antiradicalaire de différents extraits de *D. gnidium* est probablement dû à la présence de multiples composés phénoliques qui sont généralement des principaux constituants des plantes agissant en tant qu'antioxydants primaires ou des piègeurs de

radicaux libres (Gulcin et *al.*, 2010). Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, sont très bien connus comme de potentiels piègeurs de radicaux libres. L'EBr présente de faibles quantités en ces composants mais il montre une forte activité antiradicalaire. Son puissant effet scavenger est éventuellement attribué à sa richesse en dérivés d'acide phénolique, en particulier les dérivés d'acide férulique (30,68%) et d'acide cinnamique (22,36%). En général, l'acide férulique et ses dérivés présentent plus d'un groupement hydroxyle ou méthoxyle dans leur structure, ceci leur permis d'avoir une activité antiradicalaire plus puissante que les acides phénoliques qui l'en dépourvue (Rice-Evans et *al.*, 2000). De même, Cieśła et *al.*, (2012) ont constaté que les dérivés d'acide cinnamique ont un puissant effet scavenger sur le radical DPPH en comparaison aux acides phénoliques possédant deux groupements hydroxyles en position *méta* et un groupement carboxyle sur le noyau phénolique. Des études multiples réalisées sur la relation structure-activité des acides phénoliques ont constamment montré que les dérivés d'acide cinnamique ont un effet antioxydant supérieur à celui des analogues de l'acide benzoïque (Lu and Yeap Foo, 2001). Herrmann (1993), Natella et ses collaborateur (1999) ont constaté que l'acide caféique est plus actif que l'acide férulique et ce dernier est plus actif encore que l'acide p-coumarique. Ces observations suggèrent que la structure ortho-dihydroxy (le noyau catéchol) est indispensable pour renforcer l'activité antioxydante. En outre, la forte activité de l'EBr contre le radical DPPH est peut être due à la présence des autres molécules douées d'une activité antiradicalaire et qui sont absentes dans les autres extraits ou encore aux interactions de coopération entre les différents composés phénoliques et/ou d'autres composés présent dans cet extrait.

D'après nos résultats, on constate l'absence d'une corrélation entre le pouvoir antioxydant des extraits de *D. gnidium* et leurs teneurs en polyphénols et en flavonoïdes. La différence de l'activité antioxydante des composés phénoliques est étroitement liée à leurs structures chimiques et en particulier au nombre et à la position des groupements hydroxyles

phénoliques qui sont en corrélation positive avec le pouvoir piégeur du radical DPPH (Zhang et al., 2013 ; Sharma and Bhat, 2009).

Encore, le faible effet scavenger de l'EAC est peut être attribué à sa grande richesse en flavonoïdes glycosylés ; quercetine 3-O-glucoside (17,55%), lutéoline glucoside (15,06%), méthyl apigénine glucoside (18,05%) et isomères de lutéoline glucoside (26,96%). Lu et Yeap Foo, (2001) ont constaté que les flavonoïdes glycosylés présentent un pouvoir antioxydant moins actif que celui des acides phénoliques.

8. Test de piégeage (scavenger) du radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est le plus réactif des radicaux libres et la prévention contre ses réactions nuisibles est de grande importance pour garder la santé humaine, pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires, des produits cosmétiques et pharmaceutiques (Zhou and Li, 2009).

L'effet inhibiteur de trois extraits de *D. gnidium* sur le radical hydroxyle a été évalué par le teste de phenanthroline-Fe⁺². Les résultats obtenus montrent que les extraits de *D. gnidium* et l'acide ascorbique ont un remarquable effet scavenger sur le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton dont la relation est dose dépendante ($p \leq 0.001$) (**Figure 27**). A partir de profile de l'activité antiradicalaire, il est bien remarquable que l'acide ascorbique exerce son effet scavenger dans un intervalle de concentrations de 0,013-0,83 mg/ml, mais au-delà de 0,83 mg/ml, son activité antiradicalaire est presque toujours constante. Ce même comportement a été révélé par l'EBr.

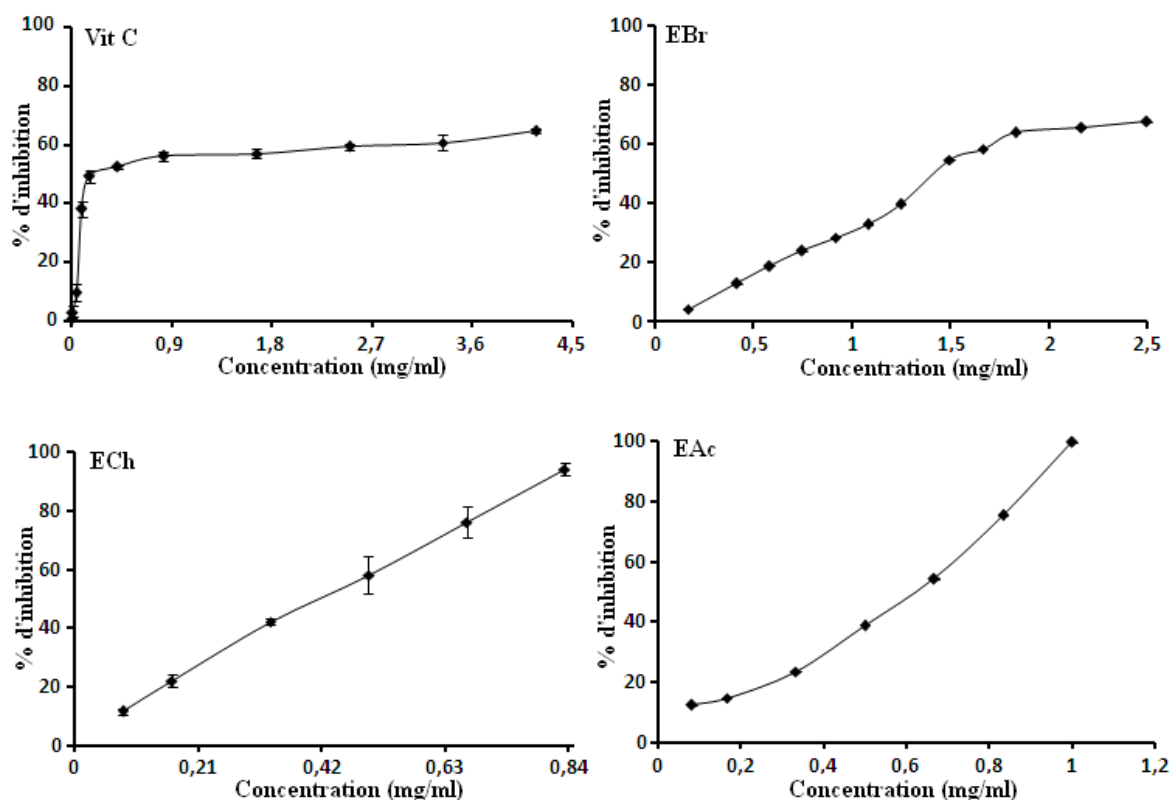


Figure 27. Effet scavenger sur le radical hydroxyle de l'ascorbate et différents extraits de *D. gnidium*. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.

Parmi les trois extraits de *D. gnidium*, l'ECh est le plus effectif contre le radical hydroxyle avec une valeur d' IC_{50} de 0.425 ± 0.011 mg/ml ($p \leq 0.001$), suivi par l'EAc ($IC_{50} = 0.574 \pm 0.037$ mg/ml). Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été représenté par l'EBr avec une IC_{50} de 1.479 ± 0.025 mg/ml ($p \leq 0.001$). L'acide ascorbique, un antioxydant standard, s'est avéré avoir un puissant pouvoir scavenger sur le radical hydroxyle ($IC_{50} = 0.159 \pm 0.005$ mg/ml) en comparaison aux différents extraits de *D. gnidium* ; ECh, EAc et EBr, qui sont respectivement 2.67, 3.6 et 9.29 fois moins actifs ($p \leq 0.001$) (**Figure 28**). La valeur d' IC_{50} obtenue dans la présente étude pour l'acide ascorbique est similaire à celle obtenue par Su et *al.*, (2009) (0.103 ± 0.031 mg/ml).

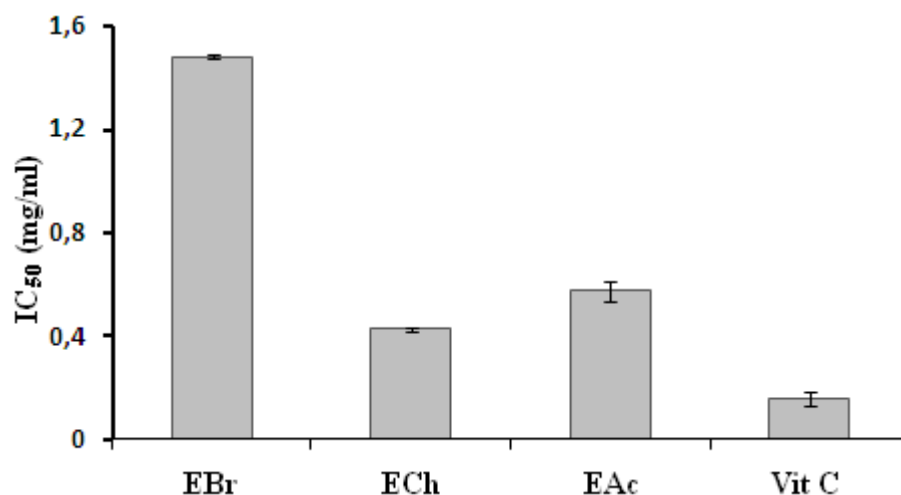


Figure 28. Comparaison de l'effet scavenger du radical hydroxyle de l'ascorbate et différents extraits de *D. gnidium*. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.001$).

Le puissant effet scavenger de l'ECh contre le radical hydroxyle est probablement attribué à sa richesse en polyphénols. Une corrélation hautement significative a été constatée entre l'activité antiradicalaire des extraits de *D. gnidium* et leur teneur en polyphénols ($r^2=0,94$) ($p \leq 0.01$). Par contre, l'EAc qui est 3,64 fois plus riche en flavonoïdes que l'ECh, il a présenté un effet scavenger moins actif que ce même extrait. D'ailleurs une corrélation significativement faible a été observée entre l'activité antioxydante de nos extraits et leurs teneurs en flavonoïdes ($r^2=0,073$) ($p \leq 0.05$). Ceci est peut être expliqué qu'un extrait donné peut contenir des structures phénoliques variables, comme l'on a montré les résultats d'HPLC, ou d'autres composés antioxydants agissant en synergie sur le scavenger de radical hydroxyle.

De multiples travaux ont été réalisés sur l'étude de rapport existant entre l'activité antioxydante des produits de plantes et leurs teneurs en ces composés (Craciunescu et al., 2007). Une excellente corrélation a été constatée entre l'activité antioxydante des plantes médicinales et leurs teneurs en polyphénols (Zeng et al., 2008; Zheng and Wang, 2001). Par

contre, Trouillas et *al.*, (2003) et Hou et *al.*, (2003) ont rapporté l'absence d'une corrélation entre la teneur en polyphénols et l'effet scavenger sur le radical hydroxyle.

En général, l'activité antiradicalaire de différents extraits de *D. gnidium* a été démontrée par trois méthodes différentes utilisant trois radicaux libres différents ; l'anion superoxyde, le radical DPPH et le radical hydroxyle. Les résultats obtenus pour les trois tests précédents montrent l'existence d'une corrélation statistiquement importante entre l'ARS des extraits sur l'anion superoxyde et celle de DPPH ($r^2 = 0,555$) ($p \leq 0.01$). Ce résultat est en accord à celui rapporté par Youwei et ses collaborateurs (2008). Nos résultats révèlent encore l'absence significative d'une corrélation entre l'effet piègeur contre le radical hydroxyle et celui de DPPH ($r^2 = -0,964$) ($p \leq 0.01$) ainsi qu'avec celui de l'anion superoxyde ($r^2 = -0,736$) ($p \leq 0.01$). Ce même résultat a été obtenu par Tian et *al.*, (2009).

La différence de l'effet scavenger des extraits contre le radical hydroxyle en comparaison avec d'autres activités antiradicalaires mesurées par d'autres tests (test au DPPH et de l'anion superoxyde) pourrait être dû à la différence de la taille moléculaire de ces radicaux ou à l'accessibilité des antioxydants au centre radicalaire (Jouber et *al.*, 2004). De même, l'effet scavenger de différents extraits de *D. gnidium* contre le radical hydroxyle dans le système Phenanthroline-Fe⁺² est peut être expliqué par le pouvoir piègeur de ces extraits contre ce radical ou par leur pouvoir chélateur sur les ions ferreux et dans ce cas-là, la réaction de Fenton sera bloquée et résulte à une faible production de radical hydroxyle ou par la synergie de leurs pouvoirs antioxydants (antiradicalaire et chélateur) (Ardestani and Yazdanparast, 2007).

9. Effet chélateur des extraits de *D. gnidium*

Le fer est un ion minéral indispensable pour la physiologie du corps humain, mais son excès dans l'organisme peut provoquer des endommagements cellulaires. L'activité chélatrice

de différents extraits de *D. gnidium* sur les ions de fer ferreux a été démontrée par le test de Ferrozine. D'après les résultats obtenus, on constate qu'il existe une relation proportionnelle entre l'activité chélatrice des extraits et leurs concentrations (**Figure 29**). Cela indique que les extraits ont interféré avec la formation du complexe Ferrozine-Fe⁺², suggérant qu'ils aient une activité chélatrice et peuvent capter les ions ferreux avant qu'ils puissent complexer à la Ferrozine. Une valeur de 98,21% des ions ferreux ont été chélatés par 1,09 mg/ml de l'EBr. Par contre, les extraits ECh et EAc ont montré une activité chélatrice de 30,66% et 26,86% à une concentration de 1,56 mg/ml.

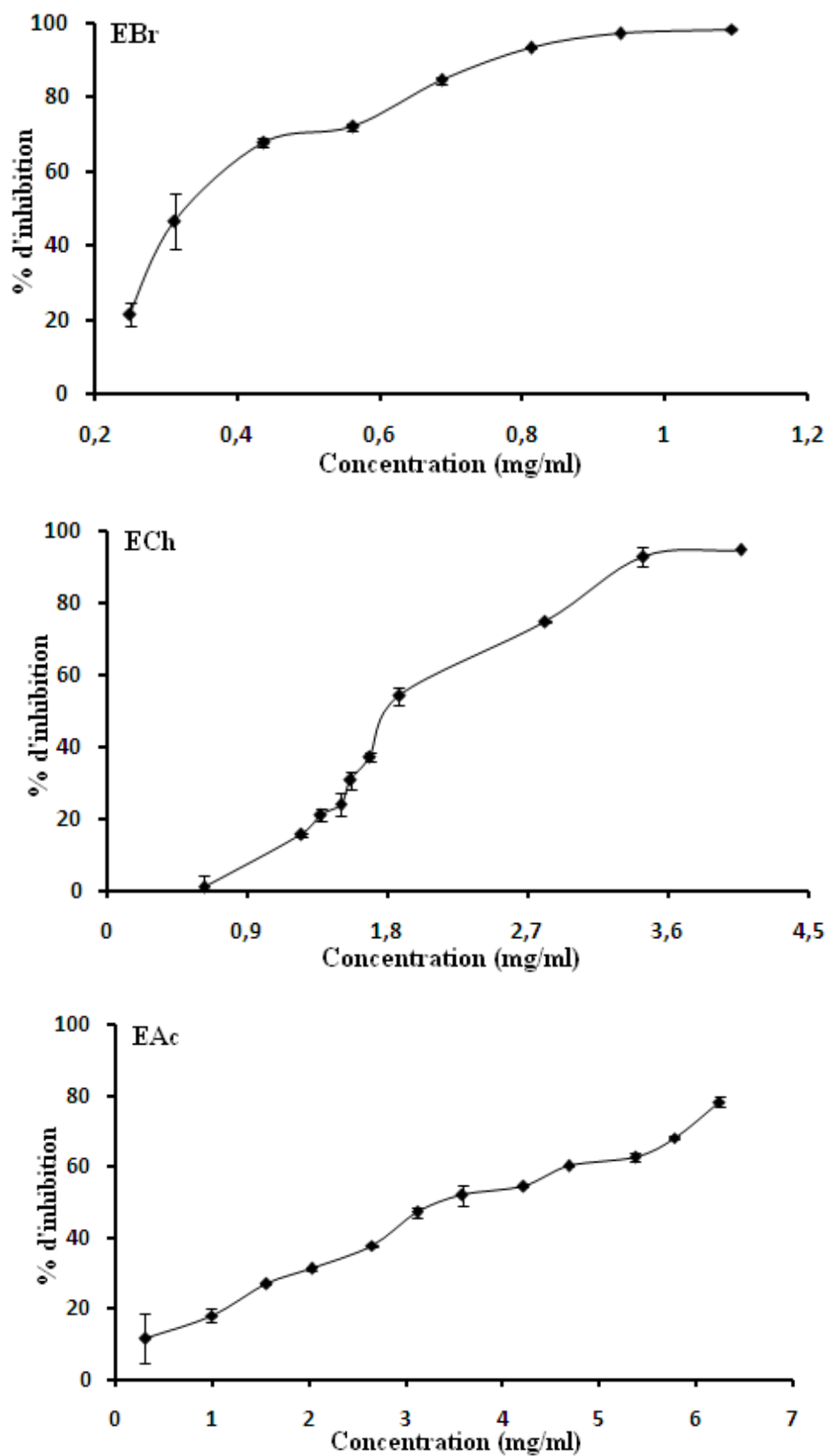


Figure 29. Effet chélateur sur les ions de fer ferriques (Fe^{+2}) de différents extraits de *D. gnidium*. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.

La valeur d'IC₅₀ obtenue pour l'EBr ($0,40 \pm 0,04$ mg/ml) est statistiquement inférieure à celles des extraits ECh et EAc qui sont respectivement de l'ordre de $2,12 \pm 0,02$ mg/ml et $3,80 \pm 0,14$ mg/ml ($p \leq 0.01$). Les valeurs d'IC₅₀ montrent que l'EBr a présenté une puissante activité chélatrice mais reste inférieure à celle de l'EDTA ($p \leq 0.001$) (**Figure 30**). Ceci est en accord avec les multiples études réalisées sur l'activité chélatrice des extraits de plantes dont les résultats montrent que l'EDTA est toujours le chélateur le plus puissant (Loizzo et *al.*, 2012 ; Sánchez-Vioquea et *al.*, 2012).

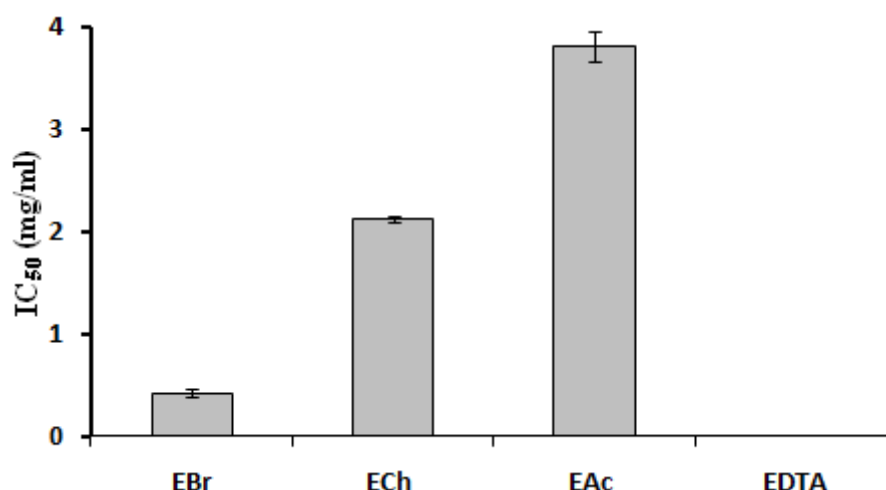


Figure 30. Comparaison de l'effet chélateur sur les ions de fer ferriques (Fe^{+2}) de différents extraits de *D. gnidium* avec celui d'EDTA. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD. (La comparaison entre les extraits ; $p \leq 0.01$, la comparaison entre les extraits et l'EDTA ; $p \leq 0.001$).

Le fer est un prooxydant majeur présent dans notre régime alimentaire, donc sa chélation est de grand intérêt et son élimination de la circulation sanguine pourrait être une approche appropriée pour prévenir les maladies liées au stress oxydatif (Singh et *al.*, 2010).

La capacité chélatrice de nos extraits est probablement due à la présence des molécules antioxydantes aptes à se complexer aux ions ferreux. Les résultats de la présente étude montrent que la corrélation entre l'activité chélatrice de différents extraits de *D. gnidium* et leurs teneurs en composés phénoliques est significativement faible (polyphénols : $r^2 = -0,95$; flavonoïdes : $r^2 = -0,447$) ($p \leq 0.01$). Comme l'on a montré de multiples études réalisées sur l'activité chélatrice des extraits de plantes (Jug et *al.*, 2014 ; Lim et *al.*, 2009 ; Huang et *al.*, 2005). Ce résultat est peut être expliqué par la présence des différences structurales au niveau des composés phénoliques ou par la présence des ligands chélateurs non phénoliques qui peuvent agir seuls ou en coopération avec les composés phénoliques.

Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, sont bien connus comme des agents chélateurs de métaux de transition. De multiples travaux ont été réalisés sur l'étude de la relation structure-activité des flavonoïdes et leurs pouvoir chélateur sur les ions ferreux. L'étude réalisée par Mladěnka et ses collaborateurs (2011) sur l'activité chélatrice de 26 flavonoïdes montre que presque la totalité des flavonoïdes testés ont présenté un effet chélateur, sur les ions ferreux, proche à celui de déféroxamine (Desféral®), un puissant agent chélateur des ions ferreux. D'après cette étude, les auteurs ont constaté que l'hydroxylation de cycle A augmente l'effet chélateur des flavonoïdes. La présence d'un, deux (catéchol) ou trois hydroxyles (pyrogallol) est toujours associé à une grande activité chélatrice. En général, les flavonoïdes les plus efficaces à chélater le fer ferreux sont ceux qui renferment les critères suivants : la présence du groupement 6,7-dihydroxy sur le cycle A, la présence des groupements 3-OH, 4-oxo et la double liaison C2-C3 en conjugaison avec le noyau catéchol sur cycle B et la présence du groupement 5-OH en combinaison avec la fonction 4-oxo sur cycle C (Mladěnka et *al.*, 2011).

10. Pouvoir réducteur des extraits de *D. gnidium*

L'activité antioxydante des produits naturels peut avoir une corrélation positive avec leur capacité réductrice (Yen and Duh, 1995). Le pouvoir réducteur des extraits dépend généralement de la présence des substances réductrices qui exercent leur activité antioxydante par la rupture de la synthèse en chaîne des radicaux libres en cédant leurs atomes d'hydrogène ou leurs électrons. Le pouvoir réducteur de nos extraits a été démontré par deux techniques différentes ; le test de ferricyanure décrit par Chung et *al.*, (2005) et la technique FRAP décrite par Benzie et Strain (1996) et modifiée par (Pulido et *al.*, 2000).

Les résultats obtenus montrent que les extraits de *D. gnidium*, l'acide gallique et le BHT ont la capacité à réduire les ions ferriques d'une manière dose dépendante (**figure 31**). Parmi les trois extraits de *D. gnidium*, l'ECh a montré une puissante activité réductrice avec une valeur d'absorbance de $(0.369 \pm 0.004 \text{ nm})$ à une concentration de $9\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0.001$). A la même concentration, l'EAc a présenté un effet réducteur modéré $(0.156 \pm 0.010 \text{ nm})$ suivi par l'EBr $(0.068 \pm 0.003 \text{ nm})$. En comparaison avec les standards et à une concentration identique, le BHT semble avoir un pouvoir réducteur significativement supérieur à celui des extraits $(0.654 \pm 0.081 \text{ nm})$ ($p \leq 0.001$). Par contre, l'acide gallique a révélé une valeur d'absorbance de $(1.635 \pm 0.106 \text{ nm})$ à une concentration de $5\mu\text{g/ml}$. Cela indique que l'acide gallique possède une grande capacité réductrice en comparaison à celles des extraits et de BHT ($p \leq 0.001$). Un résultat pareil a été rapporté par Mathew et Abraham, (2006) dans leur étude de l'activité antioxydante des feuilles de *Cinnamomum verum* où ils ont constaté que l'acide gallique est le plus puissant agent réducteur parmi les standards testés (BHA, l'acide ascorbique) et l'extrait de la plante.

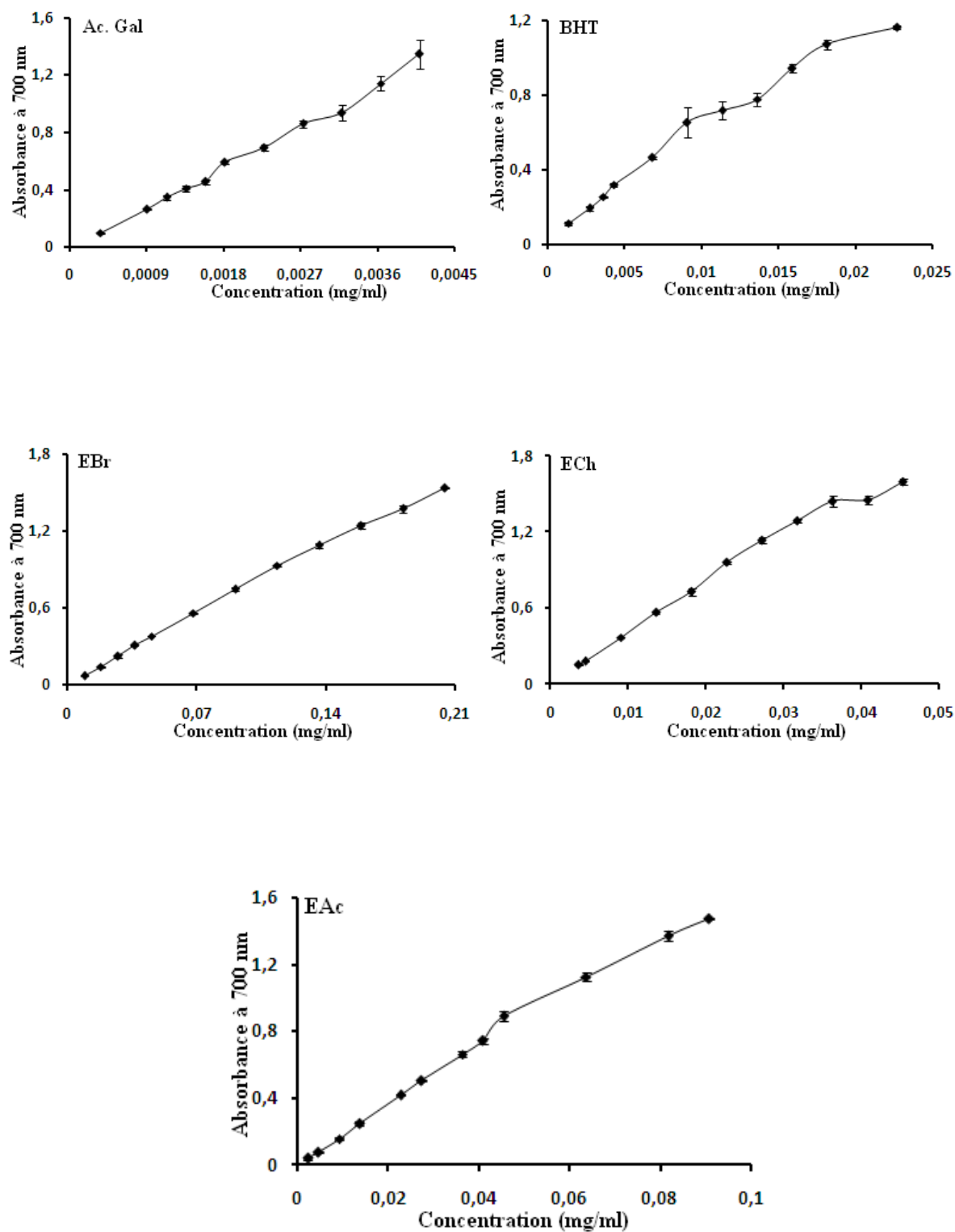


Figure 31. La cinétique du réduction des ions de fer ferriques (Fe^{+3}) aux ion de fer ferreux (Fe^{+2}) par l'acide gallique, le BHT et les différents extraits de *D. gnidium*. Les valeurs sont la moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD.

Le potentiel antioxydant de différents extraits de *D. gnidium* est encore évalué par la technique FRAP. Celle-là est généralement la méthode la plus utilisée pour une mesure directe du pouvoir réducteur de différents échantillons. Au début, les mesures ont été prises lorsque les absorbances atteignent des valeurs maximales à une période de 8 min mais les calculs et les comparaisons de résultats ont été faits à 4 min (Benzie and Strain, 1996). Par contre, dans d'autres études les temps de réaction et les valeurs d'absorbances augmentent significativement (à 30 min jusqu'à 1 heure) (Henríquez et *al.*, 2010 ; Firuzi et *al.*, 2005). Pour cette raison, on a choisi dans la présente étude de prolonger le temps de la réaction jusqu'à 30 min et de réaliser les comparaisons de résultats entre la quatrième et la trentième minutes.

La cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par les différents extraits de *D. gnidium* et les antioxydants standards est représenté dans la **figure 32**. Il est évident que les échantillons étudiés se comportent différemment dans le mélange réactionnel. L'ECh agit extrêmement rapide dans les premières minutes de réaction, son activité augmente exponentiellement pour atteindre une valeur maximale après 30 min. Ce même comportement est démontré par la quercétine, l'acide gallique et la rutine. Donc, on parle ici des antioxydants à effet rapide. Par contre, les extraits EBr et EAc ont montré une faible progression linéaire dans le temps mais ils arrivent toujours à augmenter ou même à doubler leur activité après 30 min de réaction ; on parle ici des antioxydants à effet lent. L'acide ascorbique a montré une valeur d'absorbance presque stable tout au long de la réaction (antioxydant à effet prolongé).

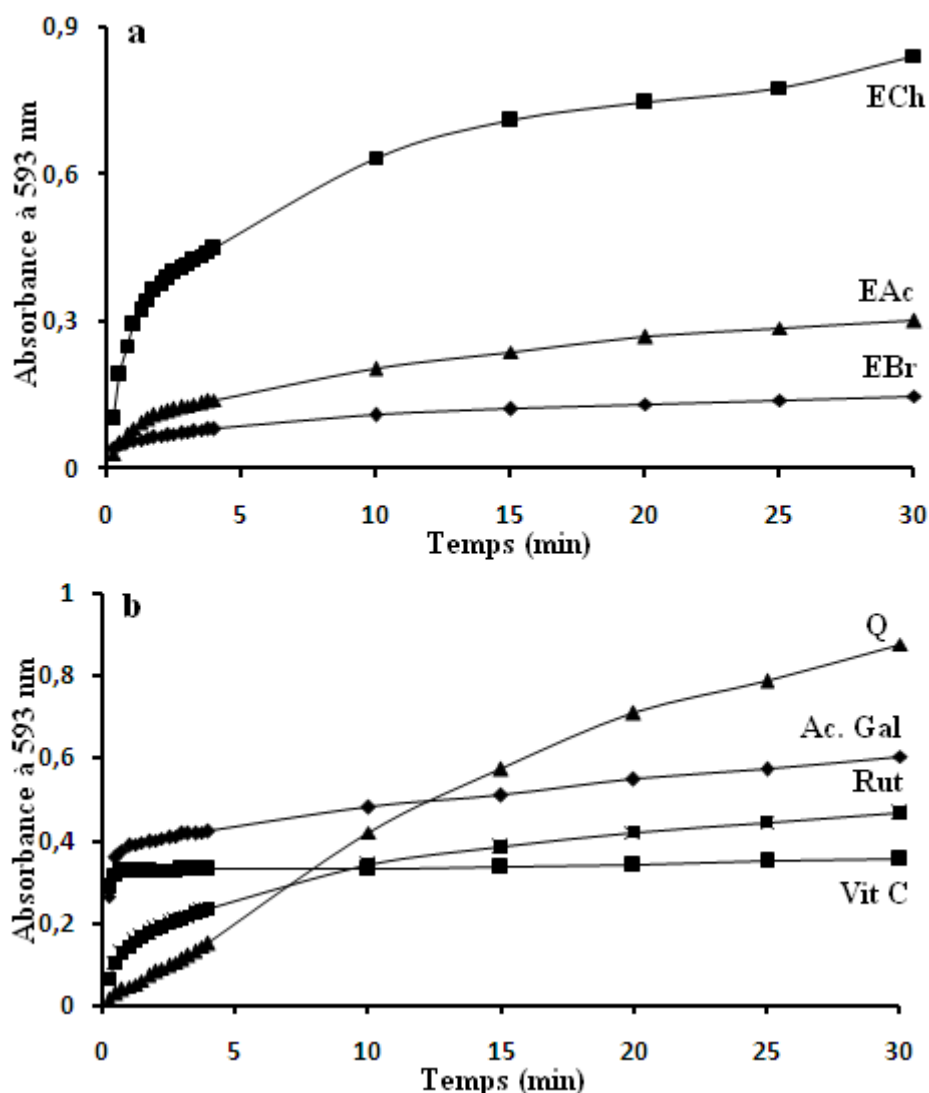


Figure 32. Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par (a) les extraits de *D. gnidium* (0.0147 mg/ml) et (b) les antioxydants standards (250 µM), (Vit C; vitamine C ou acide ascorbique, Ac. Gal ; acide gallique, Q ; quercétine, Rut ; rutine). Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures ± SD.

A une concentration identique (250 µM), l'ordre des antioxydants standards en termes de leur pouvoir réducteur, en fonction du temps, est comme suivant : quercétine > acide gallique > rutine > acide ascorbique. Ce même ordre a été obtenu par Soobrattee et ses collaborateurs, (2005). L'ordre décroissant des extraits de *D. gnidium*, à une concentration de

0,0147 mg/ml, en fonction de temps est : ECh> EAc> EBr. Ceci est en accord au résultat obtenu par le test de Ferricyanure.

A des fins comparatives, le paramètre EC1 (concentration équivalente 1) a été calculé. Le paramètre EC1 est défini comme la concentration de l'antioxydant qui donne une réduction du TPTZ équivalente à 1 mM du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et il est calculé à 4 et à 30 minutes (**Tableau 3**) dont la plus petite valeur d'EC1 indique un grand pouvoir réducteur.

Tableau 3. Le paramètre EC1 de différents extraits de la partie aérienne de *D. gnidium* et des antioxydants standards à 4 et à 30 minutes.

	EC1 à 4 min (mg/ml)	EC1 à 30 min (mg/ml)
Quercétine	0.27 ± 0.035	$0.056 \pm 0.0002^{**}$
Rutine	0.39 ± 0.014	$0.20 \pm 0.0003^{**}$
Acide gallique	0.05 ± 0.0005	$0.037 \pm 0.0012^{**}$
Acide ascorbique	0.078 ± 0.0014	0.08 ± 0.0012^{ns}
EBr	0.072 ± 0.001	$0.0462 \pm 0.0001^{**}$
ECh	0.022 ± 0.001	$0.0102 \pm 0.0007^{**}$
EAc	0.095 ± 0.004	$0.048 \pm 0.004^{**}$

Les valeurs sont une moyenne de deux mesures $\pm$ SD. Les comparaisons sont effectuées entre les EC1 à 4 et à 30 minutes. ** $p < 0.01$, ns : non significatif.

Après 4 min de réaction, l'acide gallique et l'acide ascorbique montrent un potentiel effet réducteur avec des valeurs FRAP de $0,05 \pm 0,0005$ mg/ml et $0,078 \pm 0,0014$ mg/ml ($p \leq 0.01$), respectivement. Après 30 min, la quercétine a révélé un effet réducteur ($0,056 \pm 0,0002$ mg/ml) plus puissant que celui de l'acide ascorbique ($0,08 \pm 0,0012$ mg/ml) ($p \leq 0.01$) mais inférieur à celui d'acide gallique ($0,037 \pm 0,0012$ mg/ml) ($p \leq 0.01$). Quant aux extraits, l'ECh présente la plus grande activité réductrice à 4 et à 30 min avec des valeurs FRAP ; $0,022 \pm$

0,001 mg/ml et $0,0102 \pm 0,0007$ mg/ml, respectivement. L'EBr qui a montré un effet antioxydant moins faible que celui de l'EAc, à une concentration de 0,0147 mg/ml, il a pu surmonter son effet antioxydant durant le temps où il a révélé une activité réductrice plus puissante que celle de l'EAc après 4 et 30 min de réaction ; $0,072 \pm 0,001$ mg/ml et $0,0462 \pm 0,0001$ mg/ml, respectivement. Ceci est bien en accord aux multiples études réalisées sur différent extraits de plantes et de composés phénoliques où les résultats montrent l'effet prolongé et surmonté de ces échantillons à travers le temps (Henríquez et *al.*, 2010; Firuzi et *al.*, 2005).

Le puissant effet réducteur de différents extraits de *D. gnidium* est probablement attribué à la présence des composés phénoliques. En fait, les polyphénols sont des antioxydants les plus efficaces parmi tous les constituants de plantes (Velioglu et *al.*, 1998). D'ailleurs, une corrélation importante a été constatée entre le pouvoir réducteur des extraits de *D. gnidium* et leur teneur en polyphénols ($r^2 = 0,659$). De multiples travaux réalisés sur la capacité réductrice des plantes médicinales ont rapporté un résultat pareil (Soares et *al.*, 2013 ; Li et *al.*, 2008). Par contre, une corrélation significativement faible a été remarquée entre la teneur en flavonoïdes de nos extraits et leurs capacités réductrices (Ferricyanure : $r^2 = 0,013$; FRAP : $r^2 = 0,161-0,223$). Ceci est en accord aux résultats obtenus par la littérature (Chavan et *al.*, 2013 ; Chetoui et *al.*, 2013).

Généralement, le pouvoir réducteur des flavonoïdes est étroitement lié à leurs dispositifs structuraux dont la structure ortho dihydroxy sur le cycle B, la double liaison C2-C3 en combinaison à la fonction 4-oxo sur le cycle C ainsi la présence des groupements 3-OH et 5-OH sont des facteurs gouvernant le potentiel antioxydant (Hidalgo et *al.*, 2010). Firuzi et ses collaborateurs, (2005) ont montré l'effet réducteur de cinq sous classes de flavonoïdes structuralement différents ; flavones, flavonoles, flavanones, flavanols et isoflavones.

Le pouvoir réducteur de nos extraits est peut être donc attribué à la présence de quercetine 3-O-glucoside, dérivés de la quercetine, lutéoline glucoside et vicenine-2 qui sont, plus au moins, présentés les critères antérieurs. De même, la présence des acides phénoliques et leurs dérivés peuvent renforcer l'activité antioxydante de différents extraits de *D. gnidium*. Une corrélation significative a été rapportée par Stinco et ses collaborateurs (2014) entre la valeur FRAP des acides phénoliques et leurs pouvoir réducteur. Malgré le faible effet réducteur montré par les isoflavones (genistéine) et l'apigénine et leur dérivé (Pandino et al., 2011 ; Ben Sghaiera et al., 2011 ; Firuzi et al., 2005), leurs contribution à la capacité réductrice de différents extraits de *D. gnidium* ne peut pas être exclue.

Les composés phénoliques en mixture peuvent agir l'un sur l'autre et leurs interactions peuvent affecter le pouvoir antioxydant d'un extrait donné (Hidalgo et al., 2010). Ceci explique les résultats obtenus en mesurant le potentiel réducteur de nos extraits qui sont riche en composés phénoliques et flavonoïdiques structuralement différent. Encore, on ne doit jamais négliger la contribution des autres composés non phénoliques dans la capacité antioxydant de nos extraits.

11. Test de blanchissement de β -carotène

Le principe de cette technique est basé sur le blanchiment concurrentiel du β -carotène par les radicaux peroxydes entraînant de ce fait la disparition de sa couleur orange qui est suivie spectrophométriquement à 490 nm. La diminution de l'absorbance de l'émulsion β -carotène-acide linoléique en présence de BHT, en présence et en absence des extraits est présentée dans la **figure 33**.

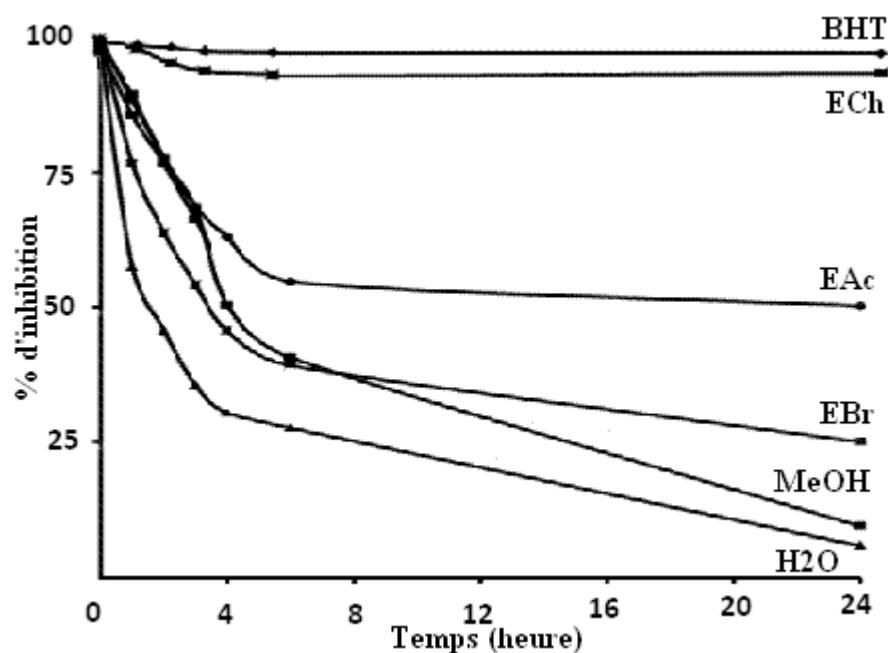


Figure 33. Effet inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique dans le système β -carotène-acide linoléique en absence et en présence de BHT et de différents extraits de *D. gnidium*. Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD.

Les résultats obtenus montrent que l'addition de différents extraits de *D. gnidium* et de BHT prévient ou réduisent le blanchiment de β -carotène. Par contre une décoloration rapide de β -carotène a été constaté en absence des extraits et de BHT. Ceci est probablement dû à l'oxydation couplée de β -carotène et de l'acide linoléique qui génèrent des radicaux libres.

En comparaison aux contrôles négatifs, après 24 heures et à la même concentration (2 mg/ml), on a constaté que les différents extraits de *D. gnidium* et le BHT ont présenté un remarquable effet inhibiteur sur le blanchiment de β -carotène ($p \leq 0.01$). Parmi les extraits de *D. gnidium*, l'ECh semble avoir la plus grande capacité inhibitrice (92.1 %) qui est comparable à celle de BHT (96.77 %) ($p \leq 0.01$) **Figure 34**. Les extraits EAc et EBr sont 2 et 3.5 fois moins actifs que le BHT avec des pourcentages d'inhibition de 52.49 % et 29.3 %, respectivement ($p \leq 0.01$).

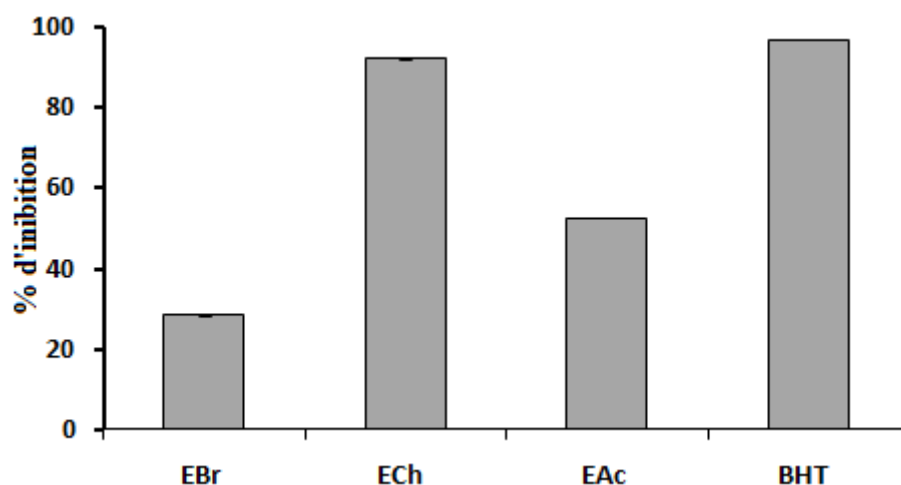


Figure 34. Comparaison de l'effet inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique dans le système β -carotène-acide linoléique, après 24 heures d'incubation, de différents extraits de *D. gnidium* avec celui de BHT. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.01$).

D'après ces résultats, on peut conclure que l'inhibition de la décoloration de β -carotène par les différents extraits de *D. gnidium* est probablement attribuée à la présence des composés phénoliques aptes à céder leurs atomes d'hydrogènes aux radicaux peroxydes et ayant comme résultat la formation des dérivés radicalaires phénoliques et des dérivés lipidiques (ROOH). Donc, les composés phénoliques bloquent la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique par leur effet scavenger sur les radicaux peroxydes (Haslam, 1996). Les antioxydants et la β -carotène se concurrencent pour des radicaux hydroperoxydes.

L'ordre décroissant de nos extraits en fonction de leur activité antioxydante est : ECh > EAc > EBr. Cet ordre est identique à celui de contenu en composés phénolique ce qui montre que la capacité antioxydante de différent extraits de *D. gnidium* est étroitement liée à leur teneur en composés phénolique. La composition chimique et la structure de composés actifs des extraits de plantes sont des facteurs importants gouvernant l'efficacité des antioxydants

naturels (Abdille et *al.*, 2005). Donc, la capacité antioxydante d'un extrait ne peut pas être seulement expliquée par sa richesse en composés phénolique mais aussi par la nature et la structure de ces biomolécules. En outre, dans le système β -carotène/acide linoléique, la capacité antioxydante d'un extrait est en relation avec son degré d'hydrophobicité et par conséquent avec sa solubilité. Frankel et Meyer (2002), ont constaté que les antioxydants apolaires (hydrophobes) sont plus actifs dans les systèmes émulsionnés lipide-eau. Ceci est en accord avec nos résultats qui montrent que l'extrait le moins polaire (ECh) a présenté la plus grande capacité antioxydante. Les composés phénoliques apolaires montrent un important effet antioxydant dans ce système car ils se concentrent à l'interface lipide-eau en prévenir l'oxydation de l'acide linoléique (Frankel et *al.*, 1994) et par conséquent l'inhibition de la formation des radicaux peroxydes et l'oxydation de β -carotène. Donc, dans le système β -carotène/acide linoléique, l'activité antioxydante des composés phénoliques est liée à leur propriété de se partitionner entre la phase lipidique et la phase aqueuse.

12. Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de *D. gnidium* L. (méthode de Fe^{+2} -Thiocyanate ; FTC)

Comme il a été montré précédemment, tous les extraits de *D. gnidium* ont montré un effet scavenger sur le radical hydroxyle et l'anion superoxyde, comme ils ont montré encore un effet chélateur sur les ions de fer. Pour montrer l'effet scavenger de nos extraits sur les radicaux peroxydes, la méthode de Fe^{+2} -Thiocyanate (FTC) a été adoptée.

La cinétique de la peroxydation lipidique en présence et en absence des extraits de *D. gnidium* et des antioxydants standards a été illustrée dans la **figure 35**. Les résultats obtenus montrent que les valeurs d'absorbance des échantillons témoins, l'eau distillée et le méthanol, continuent toujours à augmenter jusqu'à avoir des valeurs maximales respectives de 0.575 et 0.640 nm à un temps d'incubation de 48 h, au-delà de 48 h on remarque une chute dans les

valeurs d'absorbance. Ceci est éventuellement dû à l'oxydation de l'acide linoléique et la génération de radicaux peroxydes conduisant ainsi à la production de multiples substances oxydantes secondaires ou intermédiaires qui sont par la suite converties en produits finaux stables et le substrat présent dans le milieu réactionnel sera épuisé (Vučković *et al.*, 2011). La présence des extraits de *D. gnidium*, l'acide ascorbique et le BHT fait ralentir l'oxydation de l'acide linoléique ($p \leq 0.01$). Ce même résultat a été rapporté par plusieurs auteurs où ils ont montré la capacité inhibitrice de différents extraits de plantes sur la peroxydation lipidique (Fu *et al.*, 2013 ; Sharififar *et al.*, 2009 ; Ardestani and Yazdanparast, 2007).

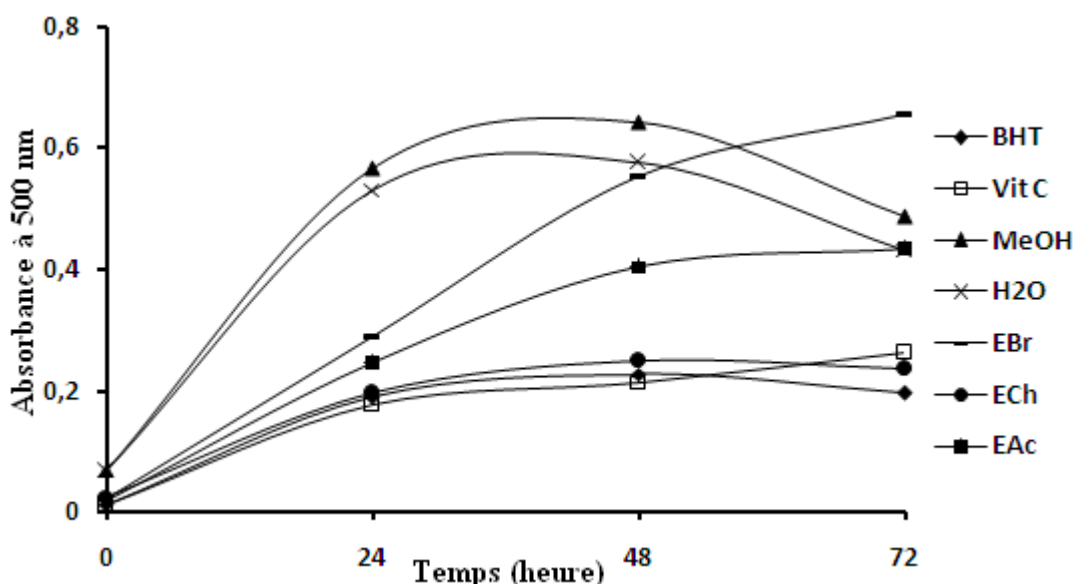


Figure 35. Cinétique de la peroxydation lipidique en présence et en absence des extraits de *D. gnidium* et des antioxydants standards. Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD.

Le plus puissant effet inhibiteur, après 48 h d'incubation, a été démontré par l'ECh avec un pourcentage d'inhibition de $(61.11 \pm 0.01\%)$ ($p \leq 0.01$), suivi par l'EAc qui a présenté un effet inhibiteur modéré avec un pourcentage d'inhibition de $(37.11 \pm 0.02 \%)$ ($p \leq$

0.01). Par contre, l'EBr a exprimé la plus faible capacité inhibitrice ($3.87 \pm 0.03 \%$) dont il est respectivement 16 et 10 fois moins actif que l'ECh et l'EAc ($p \leq 0.01$) (**Figure 36**).

En comparaison avec les antioxydants standards (contrôles positifs), l'ECh révèle une activité antioxydante 2 et 3.5 fois moins inférieur à celles de l'acide ascorbique et de BHT, respectivement. Par contre, l'EBr a présenté un effet inhibiteur significativement faible qui est 16 fois moins actif que les antioxydants standards, alors que l'EAc est seulement 2 fois mois actif que ces mêmes standards (**Figure 36**).

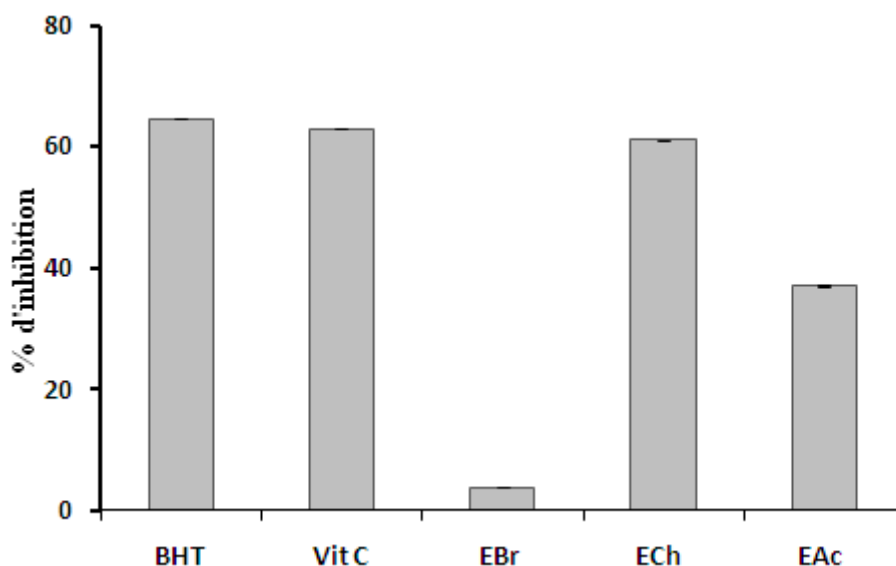


Figure 36. Comparaison de la capacité inhibitrice de l'oxydation de l'acide linoléique démontré par la méthode de Fe^{+2} -Thiocyanate (FTC) des extraits de *D. gnidium* et des antioxydants standards. Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD ($p \leq 0.01$).

L'ordre des extraits en termes de leur activité inhibitrice de la peroxydation lipidique est similaire à celui obtenu dans le test de blanchissement de β -carotène ; $\text{ECh} > \text{EAc} > \text{EBr}$. En outre, une corrélation linéaire significative a été remarquée entre les extraits de *D. gnidium* et leurs teneurs en composés phénoliques ($r^2=0,856$; p) et en flavonoïdes ($r^2=0,845$; p). Une

corrélation statistiquement importante a été encore rapportée entre la teneur en composés phénoliques de huit plantes Algérienne et leur capacité à scavenger les radicaux peroxydes (Boulanouar et *al.*, 2013). Par contre, ce résultat est bien différent de celui rapporté par Rumbaoa et collaborateurs (2009) où une corrélation non significative a été remarquée entre la teneur en polyphénols de différents extraits de pomme de terre sucrée et leurs capacités inhibitrices sur la peroxydation lipidique.

Notre étude a rapporté que la partie aérienne de *D. gnidium* est très riche en composés phénoliques y compris les acides phénoliques et les flavonoïdes. D'autres études phytochimiques ont encore révélé la présence des coumarines, lignines, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, de faibles quantités de tanins et des stéroïdes. Ainsi le potentiel effet antioxydant de la plante est probablement attribué à la présence de ces biomolécules. En outre, la variation observée dans l'activité antioxydante de différents extraits est éventuellement due à leurs contenus variables en ces composés phytochimiques (Fabri et *al.*, 2009). Ceci est en accord à nos résultats qui montrent la présence quantitative et qualitative variable de ces composés antioxydants dans chaque extrait de la plante.

Dans ce test, comme dans le système β -carotène/acide linoléique, la différence dans la solubilité des flavonoïdes ; les aglycones, les glycosides et les dérivés méthoxyles dans les micelles de système lipide-eau et leur répartition entre les deux phases peuvent influencer les résultats d'oxydation (Burda and Oleszek, 2001). L'activité antioxydante des polyphénols est principalement due à leurs propriétés redox, qui joue un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres et la décomposition des hydroperoxydes (Pandey et *al.*, 2012). Le rapport entre l'activité radical scavenger et la structure chimique des flavonoïdes a été démontré par Ye-ilada et ses collaborateurs (2000). Généralement, l'activité antioxydante des flavonoïdes dépend de leur structure, la nature des substitutions et le nombre et/ou la position des groupements hydroxyles.

13. Activité antihémolytique

Les érythrocytes sont largement utilisées comme un excellent modèle pour l'étude, *in vitro*, de la toxicité bio-membranaire en raison de leur richesse en acides gras polyinsaturés et des protéines membranaires ainsi à leur rôle essentiel dans le transport de l'oxygène moléculaire (Ajila and Rao, 2008).

Dans la présente étude, l'activité hémolytique provoquée par les radicaux peroxydes générés par la décomposition thermique d'AAPH a été régulièrement suivie à 620 nm et la cinétique de la disparition progressive des GRs est représentée sur la **figure 37**. D'après les résultats obtenus, on constate que les extraits de *D. gnidium*, l'acide ascorbique et la quercétine induisent un retardement d'hémolyse d'une manière temps dépendant. Dans le premier temps, les GRs ont subi une augmentation initiale dans leurs valeurs d'absorbance, suivi par une diminution irréversible suite à l'ajout d'AAPH. Cette biphasée est légèrement observée dans les érythrocytes control (GRs pré-incubés avec le Tampon). Le temps de latence est significativement augmenté dans les GRs incubés avec l'EAc (60 min), en comparaison à ceux incubés avec l'AAPH et l'ECh (30 min). Par contre, l'acide ascorbique et l'EBr ont montré une différence de 15 min dans leur phase de latence en comparaison avec l'AAPH. Bien que les GRs incubés avec la quercétine ont révélé une légère diminution dans leurs valeurs d'absorbance mais ils ont montré un temps de latence similaire à ceux incubés avec l'AAPH.

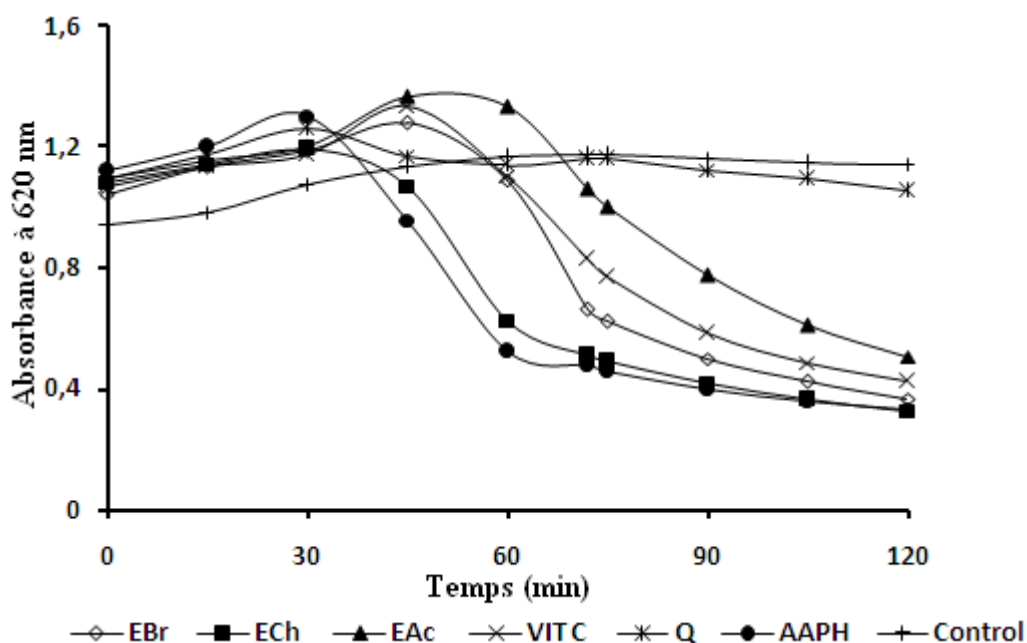


Figure 37. Cinétique de la disparition progressive des cellules érythrocytaires provoquée par les radicaux peroxydes générés par la décomposition thermique d'AAPH en présence et en absence des extraits de *D. gnidium* et des antioxydants standards. Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD.

Les résultats obtenus dans la présente étude sont en accord à ceux trouvés par Hapner *et al.*, (2010) dans leur étude de l'activité antihémolytique de la quercétine et autres antioxydants. Comme il a été décrit précédemment, le retardement d'hémolyse chez les érythrocytes control indique que les antioxydants endogènes érythrocytaires, à savoir le glutathione, les tocophérols, l'ascorbate et les enzymes telles que les catalases et la superoxyde dismutase, peuvent se défendre à l'attaque radicalaire pour protéger et garder l'intégrité de la membrane érythrocytaire (Zou *et al.*, 2001).

Les érythrocytes control étaient stables pendant 3 h et 30 min d'incubation avec une légère hémolyse (résultat non montré). L'EAc et EBr ont montré un effet protecteur contre la lyse érythrocytaire plus puissant que celui de l'ECh ($p \leq 0.001$). Le pourcentage d'hémolyse (%H) déterminé pour l'EAc, EBr et ECh après 1 h d'incubation est respectivement 0%, 1.9%

et 46.34% (**figure 38**). La quercétine semble avoir le plus grand effet protecteur des extraits et d'acide ascorbique avec des valeurs de %H de 2.42% et 7.69% ($p \leq 0.001$) après 1 h et 2 h d'incubation, respectivement. Un résultat pareil a été obtenu de l'étude menée par Hapner et ses collaborateurs (2010) où ils ont constaté que la quercétine est le plus puissant protecteur des antioxydants testés avec des valeurs de %H après 1h et 2h d'incubation de $1.03 \pm 0.7 \%$ et $5.44 \pm 1.28\%$, respectivement. Les valeurs de %H de l'acide ascorbique, EAc, EBr et ECh sont de l'ordre respective ; 62.96%, 55.7%, 67.89% et 71.44% après 2 h d'incubation. L'ordre décroissant des échantillons en termes de leur activité antihémolytique est comme suit ; Quercétine> EAc> Acide ascorbique> EBr> ECh.

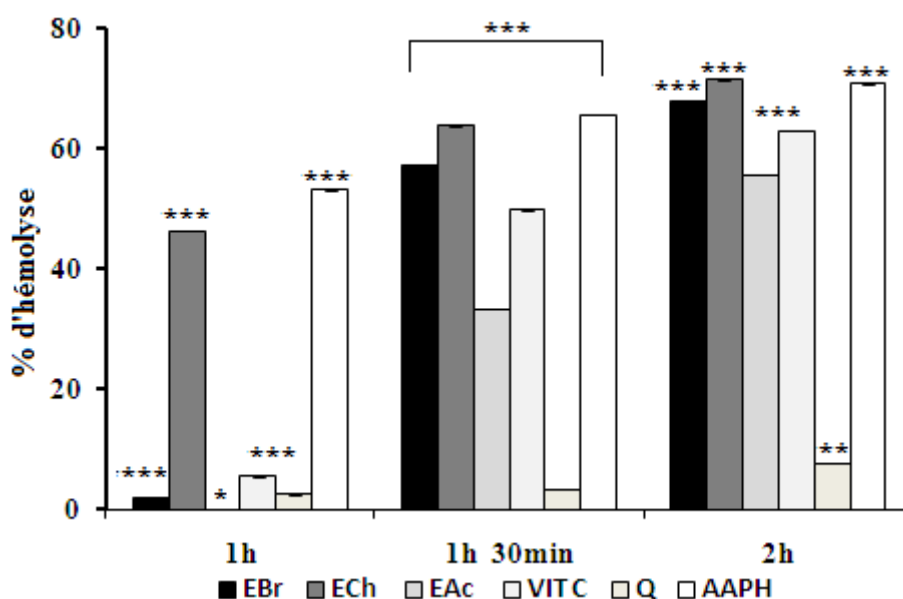


Figure 38. Comparaison de pouvoir antihémolytique de différents extraits de *D. gnidium*, la vitamine c et la quercétine. Les valeurs sont une moyenne de 3 mesures $\pm$ SD.

De multiples études ont montré l'effet protecteur des extraits de plantes et des composés phénoliques contre la lyse érythrocytaire (Alvarez-Suarez et *al.*, 2012 ; Djeridane et

al., 2010). D'ailleurs, il est bien connu que les polyphénols renforcent la résistance des globules rouges, *in vitro* et *in vivo*, face aux phénomènes de stress oxydatif (Youdim et *al.*, 2000). Cependant, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre les valeurs d'hémolyse et la teneur en polyphénols ($r^2 = 0,339$) ni avec la teneur en flavonoïdes ($r^2 = 0,182$). Ce même résultat a été obtenu par Djeridane et *al.*, (2010) lors de leur étude de l'activité antihémolytique de dix huit plantes médicinales Algérienne où ils ont constaté l'absence d'une corrélation entre la composition en polyphénols totaux et en flavonoïdes et l'activité antioxydante de ces plantes ($r^2 < 0.1$). Ceci est peut s'expliquer de fait que les composés phénoliques présents dans un extrait ne seront pas tous des antioxydants et le synergisme entre les antioxydants dans une mixture fait que l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration de l'antioxydant mais encore aux structures et aux interactions entre les antioxydants. En outre, l'étude menée par Cyboran et *al.*, (2014) révèle que l'activité antioxydante des composés phénolique présents en mixture dans un extrait est bien inférieure à celle des composés phénoliques purs. Ceci est en accord à nos résultats qui montrent que la quercétine est plus puissant que les polyphénols présents en mixture dans différent extraits de *D. gnidium*. Bien que l'acide ascorbique est un antioxydant pur mais son effet protecteur contre la lyse érythrocytaire est inférieur à celui de l'EAC. Ce dernier est le plus polaire des extraits de *D. gnidium* et ses antioxydants se concentrent autour de la partie hydrophile de la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire pour capter les radicaux peroxydes avant qu'ils puissent attaquer ou induire la peroxydation lipidique ou l'oxydation des protéines. Nos résultats sont en accord aux multiples études montrant que les polyphénole+s peuvent protéger les érythrocytes et augmenter leur résistance face aux dommages oxydatifs (Carvalho et *al.*, 2010 ; Magalhães et *al.*, 2009 ; Youdim et *al.*, 2000;). En outre, les effets synergiques des composés phénoliques avec d'autres antioxydants ont été

décrits (Liao and Yin, 2000 ; Croft, 1998), par conséquent l'effet antioxydant montré par différents extraits de *D. gnidium* peut refléter leur action combinée ou synergique.

Les composés phénoliques ont toujours montré de puissants effets antiradicalaire et inhibiteur de la lyse érythrocytaire. Cependant, les mécanismes moléculaires de l'action antioxydante de ces composés n'ont pas encore entièrement élucidés et sont toujours en progrès. Des multiples études ont suggérés que la capacité de certains polyphénols à s'ancrer dans la bicouche lipidique, qui induit une réduction de sa fluidité, pourrait strictement empêcher la diffusion radicalaire et diminuer de ce fait la cinétique des réactions en chaîne des radicaux libres (Singh and Rajini, 2008 ; Chaudhuri et *al.*, 2007 ; Suwalsky et *al.*, 2007).

Conclusion

L'oxygène, une molécule indispensable pour la vie, peut entraîner de grands dommages cellulaires et tissulaires par formation de différentes espèces réactives de l'oxygène ou de nitrogène. De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont suggéré le rôle de ces espèces réactives dans le développement de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose et la cancérogénèse.

Daphne gnidium ou garou, un arbrisseau des garrigues méditerranéennes, est largement utilisé dans la médecine traditionnelle. En Algérie, la partie aérienne de *D. gnidium* a été utilisée avec l'huile d'olive contre les douleurs inflammatoires. L'extraction des composés phénolique de la partie aérienne de *D. gnidium* est effectuée par un mélange Méthanol-eau (85%). Le fractionnement de l'extrait hydro-méthanolique (EBr) par des solvants à polarité croissante nous a permis d'obtenir quatre sous fractions ; fraction d'hexane (EHx), fraction chloroformique (ECh), fraction d'acétate éthyle (EAc) et la fraction aqueuse (EAq). Le rendement le plus élevé est représenté par les extraits EBr et EAq avec des valeurs respectives de $(13,65 \pm 0,61\%)$ et $(07,06 \pm 1,04\%)$. Le dosage des composés phénoliques des extraits de *D. gnidium* a montré que l'ECh est le plus riche en polyphénols ($10,52 \pm 0,87$ mg EAG/g d'extrait) alors que les flavonoïdes sont très bien concentrés dans l'EAc ($133,07 \pm 2,84$ mg EQ/g d'extrait). Le coefficient de corrélation ($r^2 = 0,237$) exprime l'absence de corrélation entre la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de *D. gnidium*.

La caractérisation phytochimique de différents extraits de *D. gnidium*, par la technique d'HPLC, nous a montré l'existence d'une variété assez importante de composés phénoliques. Il ressort de cette analyse que les composés chimiques majoritaires dans les extraits EBr, ECh et EAc sont représentés, respectivement, par les dérivés d'acide férulique (pics 1-2 ; 30,68%), le dérivé d'acide cinnamique (pic 6 ; 38,61%) et le méthyl apigénine glucoside (18%). Les

extraits EBr et EAc ont montré une grande variété dans leurs compositions en composés phénoliques. D'après cette analyse, on a constaté que la mixture des tiges et des feuilles de *D. gnidium* montre une richesse en dérivés d'acides phénoliques (dérivés d'acide férulique et d'acide cinnamique) et en flavonoïdes (flavones en flavonoles).

En raison de la complexité des processus d'oxydation et d'antioxydation, il est bien évident que l'utilisation d'une seule technique ne soit pas suffisante pour montrer la capacité antioxydante d'un extrait donné. Dans ce présent travail, les propriétés antioxydantes de différents extraits de *D. gnidium* ont été démontrées en utilisant une gamme de test antioxydant *in vitro*.

L'étude de l'activité inhibitrice de différents extraits de *D. gnidium* sur l'activité XOB, enzyme génératrice de ROS, a révélé que l'EAc a présenté le plus puissant effet inhibiteur avec un pourcentage d'inhibition de 60,81% à une concentration de 0,046 mg/ml. Par contre, l'ECh qui a montré le plus faible effet inhibiteur sur l'activité XOB, il a montré une importante capacité inhibitrice sur l'activité XOH. De même, l'allopurinol a présenté le plus puissant effet inhibiteur sur l'activité XOB mais son effet inhibiteur sur l'activité XOH apparaît plus faible que ceux des extraits.

L'anion superoxyde est considéré comme étant le chef de file des espèces réactives de l'oxygène. L'effet piègeur des extraits de *D. gnidium* sur ce radical a été démontré par deux systèmes; xanthine/xanthine oxydase (X/XO) (système enzymatique) et PMS-NADH/NBT (système non enzymatique). Les résultats montrent que tous les extraits ont présenté un effet scavenger sur l' $O_2^{\cdot -}$ dont leur ordre croissant est comme suivant EBr > EAc > ECh. L'activité antiradicalaire de nos extraits a été encore démontré par leurs effets scavenger sur le radical DPPH, radical synthétique, et le radical $\cdot OH$, radical biologique. L'EBr est le plus actif des extraits de *D. gnidium* avec une valeur d' IC_{50} de $0,066 \pm 0,002$ mg/ml au test de DPPH. Par

contre, l'ECh semble être le plus effectif contre le radical hydroxyle avec une valeur d'IC₅₀ de 0.425 ± 0.011 mg/ml. Les résultats obtenus pour les trois tests précédents montrent l'existence d'une corrélation statistiquement importante entre l'activité radical scavenger (ARS) des extraits sur l'anion superoxyde et celle de DPPH ($r^2 = 0,555$). Nos résultats révèlent encore l'absence significative d'une corrélation entre l'effet piègeur contre le radical hydroxyle et celui de DPPH ($r^2 = -0,964$) ainsi qu'avec celui de l'anion superoxyde ($r^2 = -0,736$).

L'activité antioxydante des extraits de *D. gnidium* a été révélée encore par leur capacité à chélater les ions de fer ferreux (Fe^{+2}) qui est à l'origine de la formation de radical hydroxyle, le plus actif des radicaux libres. Les résultats montrent que l'EBr est le plus puissant des extraits avec une valeur d'IC₅₀ de $0,40 \pm 0,04$ mg/ml mais elle est statistiquement faible en comparaison à celle de l'EDTA ($5,80 \pm 0,08$ µg/ml) qui est toujours le chélateur le plus puissant.

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été également démontré par la mesure de leur capacité réductrice sur les ions de fer ferrique (Fe^{+3}). Cette propriété a été évaluée en utilisant deux techniques ; le test de ferricyanure (pH neutre) et la technique FRAP (pH acide). Les résultats obtenus montrent que tous les extraits de la plante ont la capacité à réduire les ions ferrique d'une manière dose dépendante, dont l'ECh a présenté le plus puissant effet réducteur. L'ordre des extraits en fonction de leur capacité réductrice, pour les deux tests et en fonction de concentration, est comme suivant ; ECh > EAc > EBr. Par contre, cet ordre est différent lorsqu'il est en fonction de temps ; ECh > EBr > EAc. Ici, il s'agit de l'effet prolongé et surmonté des échantillons ou des extraits à travers le temps.

Le test de blanchissement de β -carotène a été utilisé pour montrer l'effet inhibiteur de différents extraits de *D. gnidium* sur la formation des radicaux peroxydes par l'oxydation de

l'acide linoléique et par conséquent l'inhibition de l'oxydation de la β -carotène. A une concentration de 2 mg/ml et après 24 heures d'incubation, on a constaté que tous les extraits de la plante ont présenté un remarquable effet inhibiteur sur le blanchiment de β -carotène. L'ECh semble avoir la plus grande capacité inhibitrice (92.1 %) qui est statistiquement comparable à celle de BHT (96.77 %) ($p \leq 0.01$).

La capacité de nos extraits à balayer les radicaux peroxylys formés durant la phase initiale de la peroxydation lipidique a été encore évaluée par la technique de ferrithiocyanate. Les résultats montrent que la présence des extraits de *D. gnidium*, l'acide ascorbique et le BHT dans le milieu réactionnel fait ralentir l'oxydation de l'acide linoléique. Le plus puissant effet inhibiteur, après 48 h d'incubation, a été démontré par l'ECh avec un pourcentage d'inhibition de $(61.11 \pm 0.01\%)$.

L'effet inhibiteur de différents extraits de *D. gnidium* de l'activité hémolytique provoquée par les radicaux peroxylys générés par la décomposition thermique d'AAPH sur les globules rouges a été démontré. D'après les résultats obtenus, on constate que les extraits de *D. gnidium*, l'acide ascorbique et la quercétine induisent un retardement d'hémolyse d'une manière temps dépendant. Parmi les extraits, l'EAc a révélé le plus puissant effet antioxydant avec des valeurs respectives (%H), après 1 h et 2 h d'incubation, de 0% et 55.7%.

D'après cette étude, on constate que l'ECh a présenté le plus puissant effet antioxydant dans 50% des techniques antioxydantes utilisées. Ceci est probablement dû à sa richesse en composés phénoliques. Mais, encore, les extraits EBr et EAc ont peut être plus actif que ce même extrait dans les autres 50% de tests antioxydants utilisés. Les polyphénols sont généralement des principaux constituants des plantes agissant en tant qu'antioxydants primaires ou des piègeurs de radicaux libres. L'activité antioxydante d'un extrait ne peut pas être seulement expliqué par sa richesse en polyphénols ou en flavonoïdes car un extrait ou

une fraction phénolique ne renferme pas obligatoirement tous les substances antioxydantes, et les interactions synergétiques entre les antioxydants dans une mixture rend l'activité antioxydante dépend non seulement de concentration des antioxydants mais aussi à leur structure et à leur nature.

Cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de la plante *Daphne gnidium* L. et révèle son intérêt dans le domaine de biopharmacologie.

Il est intéressant, pour la suite, d'isoler et de caractériser les molécules bioactives de la plante et pour mieux comprendre leurs modes d'action. Il est souhaitable d'évaluer *in vitro* et *in vivo* l'activité antioxydante et autres activités biologiques de chacun de ces composés pris séparément ou en mixture. Ceci, nous permettra de savoir le principe actif de chacun des extraits et/ou le synergisme existant entre les différents composés de la plante. En pharmacologie, cela permet la synthèse de nouveaux médicaments à base des plantes médicinales avec moins d'effets secondaires indésirables. Pour cette raison, il serait intéressant d'étudier la toxicité des extraits et des composés séparés et caractérisés.

Références

- Abadeh S, Killacky J, Benboubetra M, Harrison R. (1992) Purification and partial characterisation of xanthine oxidase from human milk. *Biochem. Biophys.* **1117**: 25-32.
- Abdille M A, Singh R P, Jayaprakasha G K, Jena B S. (2005) Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. *Food Chemistry*. **90**: 891-896.
- Abuja P M and Albertini R. (2001) Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation, and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta*. **306**:1-17
- Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, et al., (2003) Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**: 4474-9.
- Ajila C M and Rao U. (2008) Protection against hydrogen peroxide oxidative damage in rat erythrocytes by *Mangifera indica* L. peel extract. *Food and Chemical Toxicology*. **46**: 303-309.
- Akaike T, Ando M, Oda T, Doi T, Ijiri S, Araki S, Maeda H. (1990) Dependence on O₂-Generation by Xanthine Oxidase of Pathogenesis of Influenza Virus Infection in Mice. *J. Clin. Invest.* **85**: 739-745.
- Alvarez-Suarez J M, Giampieri F, Gonzalez-Paramas A M, Damiani E, Astolfi P, Martinez-Sanchez G, Bompadre S, Quiles J L, Santos-Buelga C, Battino M. (2012) Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*. **50**: 1508-1516.
- Ames B N. (1986) Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* **206**: 3-32.
- Amić D, Davidović-Amić D, Bešlo D, Rastija V, Lučić B, Trinajstić N. (2007) SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr Med Chem*. **14**: 827-45.
- Ani V, Varadaraj M C, Akhilender Naidu K. (2006) Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European food research and technology*. **224**: 109-115.
- Ardestani A and Yazdanparast R. (2007) Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycooxidation. *Food and Chemical Toxicology*. **45**: 2402-2411.
- Argulla L E and Chichioco-Hernandez C M. (2014) Xanthine oxidase inhibitory activity of some Leguminosae plants. *Asian Pac J Trop Dis*. **4**(6): 438-441.
- Arner E S and Holmgren A. (2000) Physiological functions of thioredoxine and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. **267**: 6102-6109.

- Athamena S, Chalghem I, Kassah-Laouar A, Laroui S, Khebri S. (2010) Activité antioxydante et antimicrobiène d'extrait de *Cuminum Cyminum* L. *Lebanese Science Journal*. **11**: (1).
- Avissar N, Ornt D B, Yagil Y, Horowitz S, Watkins R H, Kerl E A, Takahashi K, Palmer I S, Cohen H J. (1994) Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol Cell Physiol*. **266**: 367-375.
- Babior B N, Lambeth J D, Nauseef W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*. **397**: 342-344.
- Baghiani A , Ameni D , Boumerfeg S , Adjadj M , Djarmouni M , Charef N , Khennouf S , Arrar L. (2011) Studies of Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of Root and Aerial Parts of Medicinal Plant *Capparis spinosa* L. *American Journal of Medicine and Medical Sciences*. **1**(1): 1-9.
- Baghiani A, Arrar L, Benboubetra M. (2002) Purification and comparative kinetic study of the milk molybdoflavoenzyme, xanthine oxidoreductase, from different species. In "Chapman S., Perham R. Scrutton N. and Weber R. (Eds.), Flavins and flavoproteins 2002". *Agency for Scientific Publications*, Berlin. pp: 837-844.
- Baghiani A, Harrison R, Benboubetra M. (2003) Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Arch. Physiol. Biochem*. **111**: 407-414.
- Bahorun T, Gressier B, Troitin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin J C, Pinkas M, Luycky M, Gazin M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim. Forsh / Drug. Res*. 1-6.
- Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, Datta A G. (2004) Oxidative Stress-Induced Ischemic Heart Disease: Protection by Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*. **11**: 369-387.
- Bartosz G. (2003) Generation of Reactive Oxygen Species in Biological Systems. *Comments on Toxicology*. **9**: 5-21.
- Behne D and Kyriakopoulos A. (2001) Mammalian selenium-containing proteins. *Annu Rev Nutr*. **21**: 453-473.
- Behonick G S, Novak M J, Nealley E W, Baskin S I. (2001) Toxicology update: The cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (aminochromes). *J. Appl. Toxicol*. **21**(1): 15-22.
- Bellakhdar J. (1997) La pharmacopée marocaine traditionnelle: Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. France: Ibis Press.
- Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C. (1991) Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *J. Ethnopharmacol*. **35**: 123-143.
- Ben Sghaiera M, Skandrania I, Nasra N, Marie-Genviève Dijoux Francac M G D, Leila Chekir-Ghedira L, Ghediraa K. (2011) Flavonoids and sesquiterpenes from *Tecurium*

- ramosissimum promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environmental toxicology and pharmacology*. 32: 336-348.
- Benboubetra M, Baghiani A, Atmani D, Harrison H. (2004) Physiochemical and kinetic properties of purified sheep's milk xanthine oxidoreductase. *J. Dairy. Sci.* **87**:1580-1584.
- Benzie I F F and Strain J J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. biochem.* **239**: 70-76.
- Bernhardt R. (1996) Cytochrome P450: Structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **127**:137-221.
- Berthod A, Billardello B, Geoffroy S. (1999) Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation 1. *Analisis. EDP Sciences, Wiley-VCH.* **27**: 750-757.
- Bhalla D K. (1999) Ozone-induced lung inflammation and mucosal disruption: Toxicology, mechanisms, and implications. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* **2**: 31-86.
- Bokare A D and Choi W. (2014) Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials.* **275**: 121-135.
- Borris R P, Blasko P G, Cordell G A. (1998) Ethnopharmacologic and phytochemical studies of the Thymelaeaceae. *J. Ethnopharmacol.* **24**: 41-91.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. In Parker L, and Glazer A. M. (Eds.), *Methods in enzymology*. New York: *Academic Press*. **186**: 343-355.
- Boulanouar B, Abdelaziz G, Aazza S, Gagob C, Graca Miguel M. (2013) Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products.* **46**: 85-96.
- Boumerfeg S, Baghiani A, Messaoudi D, Seddik K, Arrar L. (2009) Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effect of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytotherapy Research.* **23**: 283-288.
- Bray R C. (1975) Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylase and related enzymes. In: “*The enzymes*” 3^{ème} Ed. Vol 12. PD Boyer Ed. *Academic Press, New York*. 299-419.
- Brown J E, Khodr H, Hider R C, Rice-Evans C. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* **330**:1173-1178.
- Bruner S D, Norman D P, Verdine G L. (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature.* **960** : 859-866.
- Bruneton J. (1987) *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie*. Paris: Techniques et Documentation-Lavoisier.

- Bruneton J. (1999) Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème} Ed Tec & Doc, 1120 p.
- Burda S and Oleszek W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **49**: 2774-2779.
- Burits M and Bucar F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. **14**: 323-328.
- Buttke T M, Sandstrom P A. (1994) *Oxidative stress as a mediator of apoptosis*. *Immunol Today*. **15**: 7-10.
- Cai H. (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc. Res*. **68**: 26-36.
- Caramori G and Papi A. (2004) Oxidants and asthma. *Thorax*. **59**: 170-173.
- Carden D L and Granger D N. (2000) Pathology of ischemia-reperfusion injury. *J. Pathol*. **190**: 255-266.
- Cardon D. (2003) Le monde des teintures naturelles. Paris: Belin.
- Carr A, Frei B. (1999) Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J*. **13**: 1007-1024.
- Carvalho M, Ferreira P J, Mendes V S, Silva R, Pereira J A, Jerónimo C, Silva B M. (2010) Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food Chem. Toxicol*. **48**: 441-447.
- Cederbaum A I. (1991) Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol Alcohol*. **1** (1) : 291-296.
- Chaabane F, Boubaker J, Loussaif A, Neffati A, Kilani-Jaziri S, Ghedira K Chekir-Ghedira L. (2012) Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of daphne gnidium leaf extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **12**: 153.
- Chang H C, Huang G J, Agrawal D C, Kuo C L, Wu C R, Tsay H S. (2007) Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as “Gusuibu”. *Botanical Studies*. **48**: 397-406.
- Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta P K. (2007) Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins, antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol*. **41**: 42-48.
- Chavan J J, Gaikwad N B, Kshirsagar P R, Dixit G B. (2013) Total phenolics, flavonoids and antioxidant properties of three *Ceropegia* species from Western Ghats of India. *South African Journal of Botany*. **88**: 273-277.
- Chetoui I, Messaoud C, Boussaid M, Zaouali Y. (2013) Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content variation among Tunisian natural populations of *Rhus tripartite* (Ucria) Grande and *Rhus pentaphylla* Desf. *Industrial Crops and Products*. **51**: 171-177.

- Chinev S, Bakalova R, Kovacheva S, Ribarov S R. (1998) Lipid peroxidation in rat lung induced by neuroleptanalgesi a and its components . *Eur J Anaesthesiol.* **15**: 686-694.
- Chung Y C, Chen S J, Hsu C K, Chung C T, Chou S T. (2005) Studies on the antioxidative activity of graptopetalum paraguayense. *Walther food chemistry.* 91: 419-424.
- Cieśła L, Kryszenc J, Stochmal A, Oleszekb W, Waksmundzka-Hajnos M. (2012) Approach to develop a standardized TLC-DPPH• test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **70**: 126-135.
- Comhair S A A, Erzurum S C. (2002) Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases, *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **283**: 246-255.
- Cooke J P. (2003) NO and angiogenesis. *Atheroscler. Suppl.* **4**: 53-60.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu J P, Cimanga K, Poel V B, Pieters L, Vlietinck A J, Berghe D V. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products.* **61**: 71-76.
- Cotelle N, Bernier J L, Catteau J P, Pommery J, Wallet J C, Gaydou E M. (1996) Antioxidant Properties of Hydroxyflavones. *Free Radic. Biol. Med.* **20**: 35-43.
- Cotelle N. (2001) Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* **1**: 569-590.
- Cottiglia F, Loy G, Garau D, Floris C, Casu M, Pompei R, Bonsignore L. (2001) Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L., *Phytomedicine.* **8**: 302-305.
- Cowan M. M. (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Micribiology Reviews.* **12(4)**: 564-582.
- Craciunescu O, Stefan L M, Balan M, Moldovan L. (2007) Evaluation of the radioprotective activity of new green tea-collagen materials. *J Optoelectron Adv M.* **9**: 2602-2607.
- Croft K D. (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **854**: 435-442.
- Cuzzocrea S, Riley D P, Caputi A P, Salvemini D. (2001) Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacological review.* **53 (1)**: 135-159.
- Cyboran S, Oszmian'ski J, Kleszczyn'ska H. (2014) Modification of the properties of biological membrane and its protection against oxidation by *Actinidia arguta* leaf extract. *Chemico-Biological Interactions.* **222**: 50-59.
- Damintoti K, Mamoudou H D, Simpoire J, Traore A S. (2005) Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology.* **4 (8)**: 823-828.

- Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek T A, Linssen P H. (1998) Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the science of food and agriculture*. **77**: 140-146.
- Davies K J. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. **61**: 1- 31.
- Decker E A and Welch B. (1990) Role of ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem*. **36**: 674-677.
- Dedon P C. (2008) The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem. Res. Toxicol*. **21**: 206-219.
- Deina M, Rosa A, Cottiglia F, Bonsignore L, Dessi M A. (2003) Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Daphne gnidium* L. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **80**: 65-70.
- Demple B and DeMott M S. (2002) Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* **21**. 8926-8934.
- Desai N, Sabanegh E Jr, Kim T, Agarwal A. (2010) Free Radical Theory of Aging: Implications in Male Infertility. *Urology*. **75**: 14-19.
- Dew T P, Andrea J D, Morgan M R A. (2005) Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 6510-6515.
- Dizdaroglu M and Jaruga P. (2012) Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic. Res*. **46**: 382-419.
- Djeridane A, Yousfi M, Brunel J M, Stocker P. (2010) Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 2599-2606.
- Djeridane M, Yousfi B, Nadjemi D, Boutassouna P, Stocker N. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*. **97**: 654-660.
- Dröge W. (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*. **82 (1)**: 47-95.
- Duh P D and Yen G C. (1997) Antioxidative activity of three herbal water extracts. *Food Chemistry*. **60**: 639-645.
- Duran W N, Breslin J W, Sanchez F A. (2010) The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc Res*. **87**: 254-61.
- Elsayed N M, Omaye S T, Klain G J, Korte D W Jr. (1992) Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethylsulfide after subcutaneous injection. *Toxicology*. **72**: 153-165.

- Fabri R L, Nogueira M S, Braga F G, Coimbra E S, Scio E. (2009) *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial and antioxidant effects. *Biores. Technol.* **100**: 428-433.
- Fatehi-Hassanabad Z, Chan C B, Brian L, Furman B L. (2010) Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *European Journal of Pharmacology.* **636**: 8-17.
- Favier A. (2003) Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique.* 108-115.
- Ferrandiz M and Alcaraz M J. (1991) Anti-inflammatory, Activity and Inhibition of Arachidonic Acid Metabolism by Flavonoids. *Agents Actions.* **32**: 283-288.
- Ferriola P C, Cody V, Middleton E. (1989) Protein kinase C inhibition by plant flavonoids: kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* **38**: 1617-24.
- Fibach E and Dana M. (2015) Oxidative stress in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other conditions of complement-mediated hemolysis. *Free Radical Biology and Medicine.* doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.027.
- Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L. (2005) Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ferric reducing antioxidant power assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1721**: 174-184.
- Fleming I, Michaelis U R, Bredenkotter D, et al., (2001) Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ. Res.* **88** (1): 44-51.
- Folcik V A, Nivar-Aristy R A, Krajewski L P, Cathcart M K. (1995) Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **96** (1): 504-510.
- Forman H J, Torres M. (2001) Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med.* **22**: 189-216.
- Frankel E N and Meyer A S. (2002) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **80**: 1925-1941.
- Frankel E N, Huang S W, Kanner J, German J B. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: Bulk oils vs. emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* **42**: 1054-1059.
- Fransen M, Nordgren M, Wang B, Apanasets O. (2012) Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1822**: 1363-1373.
- Freeman B and Carpo J. (1982) *Lab. Invest.* **43**: 412.

- Freeman T A, Parvizi J, Della Valle C J, Steinbeck M J. (2009) Reactive oxygen and nitrogen species induce protein and DNA modifications driving arthrofibrosis following total knee arthroplasty. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2-5.
- Fridovich I. (1975) Superoxide dismutases, *Annu. Rev. Biochem.* **44**: 147-159.
- Fu Y, Chen J, Li Y J, Zheng Y F, Li P. (2013) Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. *Food Chemistry*. **141**: 1063-1071.
- Fuchs J. (1992) Oxidative Injury in Dermatology. *Springer-Verlag* : New York.
- Fukuzawa K, Gebicki J M. (1983) Oxidation of α -tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**: 242-251.
- Galvez C J, Martin-Cordero P, Houghton A M. (2005) Antioxidant Activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 1927-1933.
- Gaucher C, Boudier A, Dahboul F, Parent M, Leroy P. (2013) S-nitrosation/denitrosation in cardiovascular pathologies: facts and concepts for the rational design of S-nitrosothiols. *Curr Pharm Des.* **19**: 458-72.
- Geiszt M. (2006) NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc. Res.* **71** : 289-299.
- Ginsburg I. (1998) Could synergistic interactions among reactive oxygen species, proteinases, membrane-perforating enzymes, hydrolases, microbial hemolysins and cytokines be the main cause of tissue damage in infectious and in ammatory conditions? *Med Hypotheses*. **51**: 337-346.
- Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J. (2006) Fructose enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition*. **22**: 758-766.
- Granger D N, Rutili G, McCord J M. (1981) Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*. **81**: 22-29.
- Green K, Brand M D, Murphy M P. (2004) Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. **53**: 110-118.
- Gul M, Kutay F Z, Temocin S, Hanninen O. (2000) Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J Exp Biol.* **38**: 625-634.
- Gulcin I, Bursal E, Ehitoglu M H, Bilsel M, Goren A C. (2010) Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 2227-2238.
- Habibi G. (2014) Hydrogen Peroxide (H₂O₂) Generation, Scavenging and Signaling in Plants. *Oxidative Damage to Plants*. **19** : 557-584.
- Hajji H E, Nkhili E, Tomao V, Dangles O. (2006) Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation. *Free Radic Res.* **40**: 303-20.

- Hale A L. (2003) Screening Potato Genotype for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. *Office of Graduate Studies of Texas A&M University-Genetics*. 260p.
- Halliwell B and Gutteridge J. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press.
- Halliwell B and Gutteridge J M. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids, *Arch. Biochem. Biophys.* **280**: 1-8.
- Halliwell B and Gutteridge J M. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell B and Gutteridge J M C. (1998) In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press: Oxford.
- Halliwell B. (1991) *Am. J. Med.*, **91** (3): 14.
- Halliwell B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**: 1609-1623.
- Halliwell B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp.* **61**: 73-101.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **16**: 845-850.
- Hapner C D, Deuster P, Chen Y. (2010). Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. *Chemico-Biological Interactions.* **186**: 275-279.
- Harborne J B. (1988) *The flavonoids, advances in research since 1980.*, London: Chapman & Hall.
- Harizi H, Chaabane F, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. (2011) Inhibition of proinflammatory macrophage responses and lymphocyte proliferation in vitro by ethyl acetate leaf extract from *Daphne gnidium*. *Cellular Immunology.* **267**: 94-101.
- Harnafi H and Amrani S. (2008) Spectrophotometric Methods for Determination of Plant Polyphenols Content and their Antioxidant Activity Assessment: an Overview, *Pharmacognosy Reviews.* **2**: (3).
- Haslam E. (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products.* **59**: 205-215.
- Hazra T K, Hill J W, Izumi T, Mitra S. (2001) Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential in vivo functions. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68**: 193-205.
- Hegde M L, Hazra T K, Mitra S. (2008) Early steps in the DNA base excision/ single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* **18**: 27-47.

- Heim K E, Tagliaferro A R, Bobilya D J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J Nutr Biochem.* **13**: 572-84.
- Hellsten Y, Tullson P. C, Richter E. A, Bangsbo J. (1997) Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. *Free Radic Biol Med.* **22**: 169-174.
- Henriquez, S A, Italo C, Tania V, Manuel A, Lorena C, Ricardo S, Hernan S. (2010) Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research.* **70** (4): 523-536.
- Herrmann K. (1993) Antioxidant activity of phenolic acids in foods of plant origin. *Gordian.* **93**(6): 92-96.
- Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, de Pascual-Teresa S. (2010) Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry.* **121**: 691-696.
- Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lonn M E, Hudemann C, Lillig C H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxine systems. *Biochem Soc Trans.* **33**: 1375-1377.
- Hou W C, Lin R D, Cheng K T, Hung Y T, Cho C H, Chen C H, et al., (2003) Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine.* **10** : 170-175.
- Howard M D, Hood E D, Zern B, Shuvaev V V, Grosser T, Muzykantov V R. (2014) Nanocarriers for vascular delivery of anti-inflammatory agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **54**: 205-26.
- Huang D, Ou B, Prior R L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **53**: 1841-1856.
- Hung C Y and Yen G C. (2002). Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from *Mesona procumbens* Hemsl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50**: 2993-2997.
- Iauk L, Aleo G, Caccamo F, Rapisarda A, Ragusa S, Speciale A M. (1997) Comparative evaluation of antibacterial and antimycotic activities of *Daphne gnidium* leaf and bark extracts. *Farmaci Terapia.* **14**: 37-43.
- Iauk L, Aleo G, Caccamo F, Rapisarda A, Ragusa S, Speciale A M. (1996) Antibacterial and antimycotic activities of *Daphne gnidium* L. leaf extracts. *Phytotherapy Research.* **10**: 166-168.
- Jayaprakasha G K, Patil B S. (2007) In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chemistry.* **101**: 410-418.
- Jia Z, Zhu H, Vitto M J, Misra B R, Li Y, Misra H P. (2009) Alpha-lipoic acid potently inhibits peroxynitrite-mediated DNA strand breakage and hydroxyl radical formation: implications for the neuroprotective effects of alpha-lipoic acid. *Mol. Cell. Biochem.* **323**: 131-138.

- Jones D P, Carlson J L, Mody V C, Cai J, Lynn M J, Sternberg P. (2000) Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* **28**: 625-635.
- Joubert E, Winterton P, Britz J T, Ferreira D. (2004) Superoxide anion, 1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging capacity of rooibos (*Aspalathus linearis*) aqueous extracts, crude phenolic fractions, tannin and flavonoids. *Food Research International.* **37**: 133-138.
- Jug M, Koncic M Z, Kosalec I. (2014) Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT - Food Science and Technology.* **57**: 530-537.
- Kajiya M, Hirota M, Inai Y, Kiyooka T, Morimoto T, Iwasaki T, Endo K, Mohri S, Shimizu J, Yada T, Ogasawara Y, Naruse K, Ohe T, Kajiya F. (2007) Impaired NO mediated vasodilation with increased superoxide but robust EDHF function in right ventricular arterial microvessels of pulmonary hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* **292**: 2737-2744.
- Kanner J and Lapidot T. (2001) The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med.* **31**: 1388-1395.
- Kanter M M, Hamlin R L, Unverferth D B, Davis H W, Merola A J. (1985) *J. Appl. Physiol.* **59**: 1298.
- Kaviarasan K, Kalaiarasi P, Pugalendi V. (2008) Antioxidant efficacy of flavonoid-rich fraction from *Spermocoe hispida* in hyperlipidemic rats. *J Appl Biomed.* **6**: 165-76.
- Kehrer J P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* **149**: 43-50.
- Kelly F J, Mudway I S. (2003) Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids.* **25**: 375-96.
- Khlebnikov A I, Schepetkin I A, Domina N G, Kirpotinab L N, Quinnb M T. (2007) Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* **15**: 1749-1770.
- Khuntia S, Majumder S K, Ghosh P. (2015) Quantitative prediction of generation of hydroxyl radicals from ozone microbubbles. *Chemical engineering research and design* **98**: 231-239.
- Kim J R, Yoon H W, Kwon K S, Lee S R, Rhee S G. (2000) Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Ann Biochem.* **283**: 214-21.
- Kim J W, Baek B S, Kim Y K, et al. (2001) Gene expression of cyclooxygenase in the
- Kinsky N. (1989) Antioxydants function of carotenoides, *Free Rad. Biol. Med.* **7**: 617.
- Klaunig J E and Kamendulis L M. (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**: 239-267.

- Klaunig J E, Wang Z, Pu X, Zhou S. (2011) Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **254**: 86-99.
- Klaunig J E, Xu Y, Bachowski S, Jiang J. (1997) Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. In: Wallace, K.B. (Ed.), *Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis, London. 375-400.
- Klaunig J E, Xu Y, Isenberg J S, Bachowski S, Kolaja K L, Jiang J, Stevenson D E, Walborg Jr E F. (1998) The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **106** (1): 289-295.
- Knoops B, Goemaere J, Van der Eecken V, Declercq J P. (2011) Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-cys peroxiredoxin, *Antioxid. Redox Signal.* **15**: 817-829.
- Kohen R and Nyska A. (2002) Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*. **30** (6): 620-650.
- Kohen R. (1999) Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress new approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother.* **53**: 181-192.
- Kokoglu E, Belce A, Ozyurt E, Tepeler Z. (1990) Xanthine Oxidase Levels in Human Brain Tumors. *Cancer Lett.* **50**: 179-181.
- Kooij A, Bosch K S, Frederiks W M, Van Noorden C J F. (1992) High levels of xanthine oxidoreductase in endothelial, epithelial and connective tissue cells in rat tissues. A relation between localization and function. *Virchows Archiv [B] Cell Pathology* **62**: 143-150.
- Koppenol W H. (2001) The Haber-Weiss cycle 70 years later. *Redox Rep.* **6** : 229-34.
- Koren H S. (1995) Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect.* **103**: 235-242.
- Korkina L G and Afanas'ev I B. (1997) In *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy*; Sies, H., Ed.; Academic Press: San Diego. 151-163.
- Kreher B, Neszmelyi A, Wagner H. (1990) Triumbellin, a tricoumarin rhamnopyranoside from *Daphne mezereum*. *Phytochemistry*. **29** (11): 3633-3637.
- Kruidenier L and Verspaget H W. (2002) Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther.* 1-19.
- Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res.* **46**: 244-282.

- Laemmli U K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lawson A M. (2006) Etude phytochimique d'une fabacée tropicale, *Lonchocarpus Nicou*, évaluation biologique préliminaire. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'université de Limoges.
- Lemos H P, Grespan R, Vieira S M, et al., (2009) Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN γ production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (14): 5954-5959.
- Lespade L and Bercion S. (2010) Theoretical study of the mechanism of inhibition of xanthine oxydase by flavonoids and gallic acid derivatives. *Journal of Physical Chemistry*. **114**: 921-928.
- Li H B, Wonga C C, Cheng K W, Chen F. (2008) Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants . *LWT*. **41**: 385-390.
- Li W D, Wei C L, White P J, Beta T. (2007) High-amylose corn exhibits better antioxidant activity than typical and waxy genotypes. *J Agric Food Chem*. **55**: 291-298.
- Liao K and Yin M. (2000) Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidylcholine liposome systems: Importance of the partition coefficient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**: 2266-2270.
- Lijinsky W. (1999) N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res*. **443**: 129-138.
- Lim T Y, Lim Y Y, Yule C M. (2009) Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four Macaranga species. *Food Chemistry*. **114**: 594-599.
- Lin C M, Chen C S, Chen C T, Liang Y C, Lin J K. (2002) Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **294**: 167-172.
- Lina S, Zhanga G, Liao Y, Junhui Pan. (2015) Inhibition of chrysin on xanthine oxidase activity and its inhibition mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*. **81**: 274-282.
- Loizzo M R, Tundis R, Bonesi M, Menichini F, Mastellone V, Avallone L, Menichini F. (2012) Radical scavenging, antioxidant and metal chelating activities of *Annona cherimola* Mill. (cherimoya) peel and pulp in relation to their total phenolic and total flavonoid contents. *Journal of Food Composition and Analysis*. **25**: 179-184.
- Lu Y, Yeap Foo L. (2001) Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*. **75**: 197-202.
- Lykkesfeldt J and Svendsen O. (2007) Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*. **173**: 502-511.

- Maataoui B S, Hmyene A, Hilali S. (2006) Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*. **7**(1): 3-8.
- Madamanchi N R, Vendrov A, Runge M S. (2005) Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **25**: 29.
- Mahmoudi S, Khali M, et Mahmoudi N. (2013) Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technologie B- Sciences Agronomiques et Biologiques*. **9** : 35-40.
- Magalhães A S, Silva B M, Pereira J A, Andrade P B, Valentão P, Carvalho M. (2009) Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.* **47**: 1372-1377.
- Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Montedoro G, Zappia V. (1999) Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **10**: 159-165.
- Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges. 1-187.
- Markham K R. (1982) Techniques of flavonoid identification. Academic press, London, Chap. 1 and 2: 1-113.
- Marnett L J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. **21**: 361-370.
- Marques R, Sousaa M M, Oliveira M C, Melo M J. (2009) Characterization of weld (*Reseda luteola* L.) and spurge flax (*Daphne gnidium* L.) by high-performance liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry in Arraiolos historical textiles. *Journal of Chromatography A*. **1216**: 1395-1402.
- Martín M Á, Serrano A B G, Ramos S, Pulido M I, Bravo L, Goya L. (2010) Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J Nutr Biochem*. **21**:196-205.
- Martin H M, Hancock J T, Salisbury V, Harrison R. (2004) Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent, *Infection and Immunity*. **72**: 4933–4939.
- Masuoka N, Matsuda M, Kubo I. (2012) Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. *Food Chemistry*. **131**: 541-545.
- Mathew S and Abraham T E. (2006) In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food and Chemical Toxicology*. **44**: 198-206.
- Matsuda H, Morikawa T, Ando S, Toguchida I, Yoshikawa M. (2003) Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorg Med Chem*. **11**:1995-2000.

- McCay P B. (1985) Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann. Rev. Nutr.* **5**: 323-340.
- McCord J M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *The New England Journal of Medicine.* **312**: 159-163.
- Meneshian A, Bulkley G B. (2002) The physiology of endothelial **xanthine** oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirc.* **9**: 161-175.
- Middleton Jr E, Kandaswami T C C. (2000) Theoharides, The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**: 673-839.
- Mira L, Fernandez M T, Santos M, Rocha R, Florencio M H, Jennings K R. (2002) Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* **36**: 1199-208.
- Mishra B, Priyadarsini K I, Kumar M S, Unnikrishnan M K, Mohan H. (2003) Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorg Med Chem.* **11**: 2677-85.
- Mladěnka P, Macáková K, Filipský T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, Silvestri I P, Hrdina R, Saso L. (2011) In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry.* **105**: 693-701.
- Montoro P, Braca A, Pizza C, De Tommasi N. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry.* **92(2)**: 349–355.
- Murray R D, Mendez J, Brown S A. (1982) The Natural Coumarins, Occurrence, Chemistry and Biochemistry. *John Wiley and Sons Ltd.* New York.
- Nagata H, Takekoshi S, Takagi T, Honma T, Watanabe K. (1999) Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J Exp Clin Med.* **24**: 1-11.
- Naito Y, Yoshikawa T, Yoshida N, Kondo M. (1998) Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci.* **43**:30-34.
- Natella F, Nardini M, Di Felice, M, Scaccini, C. (1999) Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure–activity relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **47**: 1453-1459.
- Neuzil J, Stocker R. (1994) Free and albumin-bound bilirubin is an efficient co-antioxidant for α -tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **269**: 16712–16719.
- Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli A, Curi R. (2012) Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and b-cell function: a critical role for amino acids. *Journal of Endocrinology.* **214**: 11-20.

- Nguyen M T T, Awale S, Tezuka Y, Le Tran Q, Watanabe H, Kadota S. (2004) Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **27**: 1414-1421.
- Nishino T, Nakanishi S, Okamoto K, Nuzushima J, Hori H, Iwasaki T, Ichimori K, Nakazawa H. (1997) Conversion of Xanthine Deshydrogenase into Oxidase and its Role in Reperfusion Injury. *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 783-786.
- Nordberg J and Arnér E J. (2001) Reactives oxygen species, antioxidants and mammalian thioredoxine system. *Free Radical Biology & Medicine*. **31** (11): 1287-1312.
- Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H, Orelund L. (2001) Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res.* **906**: 170-175.
- Okunishi T, Takaku N, Wattanawikkit P, Sakakibara N, Suzuki S, Sakai F, Umezawa T, Shimada M. (2002) Lignan production in *Daphne odora* cell cultures. *Journal of Wood Science*. **48**: 237-241.
- Oliński R, Gackowski D, Rozalski R, Foksiński M, Białkowski K. (2003) Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? *Mutat Res.* **531**: 177-90.
- Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. (2006) Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev.* **58**: 87-114.
- Palmer R M, Rees D D, Ashton D S, Moncada S. (1988) L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 1251-1256.
- Pamplona R and Costantini D. (2011) Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **301**: 843-863.
- Pandey A K, Mishra A K, Mishra A. (2012) Antifungal and antioxidative potential of oil and extracts derived from leaves of Indian spice plant *Cinnamomum tamala*. *Cell. Mol. Biol.* **58** (1): 142-147.
- Pandino G, Lombardo S, Mauromicale G, Williamson G. (2011) Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*. **126**: 417-422.
- Pavithra K and Vadivukkarasi S. (2015) Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. *Food Science and Human Wellness*. **4** : 42-46.
- Pentland A P. (1994) Active oxygen mechanisms of UV in ammation. *Adv Exp Med Biol.* **366**: 87-97.
- Pietta P G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* **63**:1035-42.

- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Jean-Olivier Defraigne J O. (2002) Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*. **16** : 233-239.
- Powers S K and Jackson M J. (2008) Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev*. **88**: 1243-1276.
- Poyton R O, Ball K A, Castello P R. (2009) Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab*. **20** (7): 332-40.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. **82**: 513-523.
- Psotová J, Lasovsky J, Vicar J. (2003) Metal-Chelating Properties, Electrochemical Behavior, Scavenging And Cytoprotective Activities Of Six Natural Phenolics. *Biomed. Papers*. **147**(2): 147 -153.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power. *J. Agric. Food. Chem*. **48**: 3369-3402.
- Raedschelders K, Ansley D M, Chen D D Y. (2012) The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics*. **133**: 230-255.
- Raha S, Robinson B H. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*. **25**: 502-508.
- Rao M V, Davis K R. (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta*. **213**: 682-690.
- Rapisarda A, Germanò M. P, Iauk L, La Rosa M, Sanogo R, Ragusa S. (1998) Daphne gnidium L. bark and leaf extracts: skin damage by topical application. *Phytotherapy Research*. **12**: 49-51.
- Rav R S, Mehrotra S, Shanker U, Babu G S, Joshi P C, Hanss R K. (2001) Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem Toxicol*. **24**: 191-200.
- Remesy C, Manach C, Demigne C, Texier O, Regerat F. (1996) Intérêt nutritionnel des flavonoides. *Med et Nut*. **32** (1): 17-27.
- Rice-Evans C A, Miller N J, Paganga G. (1996) Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med*. **20**: 933-956.
- Richette F and Bardin T. (2010) Gout. *Lancet*. **375**: 318-28.
- Riley P A. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol*. **65**: 27-33.

- Robak J and Gryglewski R J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 837-841.
- Romao S Ph D. (2015) Therapeutic value of oral supplementation with melon superoxide dismutase and wheat gliadin combination. *Nutrition.* **31**: 430-436.
- Rumbaoa R G O, Cornago D F, Geronimo I M. (2009) Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chemistry.* **113**: 1133-1138.
- Salvador A, Sousa J, Pinto R E. (2001) Hydroperoxyl, superoxide and pH gradients in the mitochondrial matrix: a theoretical assessment. *Free Radic Biol Med.* **31**: 1208-1215.
- Sánchez-Vioquea R, Rodríguez-Conde M F, Reina-Ureñaa J V, Escolano-Terceroa M A, Herraiz-Peñalvera D, Santana-Méridas O. (2012) In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products.* **39**: 149-153.
- Sanders L H and Greenamyre J T. (2013) Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic. Biol. Med.*
- Sanders S, Eisenthal R, Harris R. (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase generation of superoxide anion. *Eur. J. Biochem.* **245**: 541-548.
- Santos M R and Mira L. (2004) Protection by flavonoids against the peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine. *Free Radic Res.* **38**: 1011-8.
- Schrader M and Fahimi H D. (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**: 1755-1766.
- Seib K L, Wu H J, Kidd S P, Apicella M A, Jennings M P, McEwan A G. (2006) Defenses against Oxidative Stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a System Tailored for a Challenging Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **70** (2): 344-361.
- Senba Y, Nishishita T, Saito K, Yoshioka H, Yoshioka H. (1999) Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and the model compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* **47**: 1369-1374.
- Shadyro O I, Yurkova I L, Kisel M A. (2002) Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. *Int J Radiat.* **78**: 211-217.
- Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mansour Mirtajaldini M. (2009) Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry.* **112**: 885-888.
- Sharma O P, Bhat T K. (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* **113**: 1202-1205.
- Shimokawa H and Matoba T. (2004) Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol. Res.* **49**: 543-549.

- Simirgiotis M J, Caligari P D S, Schmeda-Hirschmann G. (2009) Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry. *Food Chemistry*. **115** (2): 775-784.
- Singh A K, Dhaunsi G S, Gupta M P, et *al.*, (1994) Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Arch Biochem Biophys*. **315**: 331-8.
- Singh N and Rajini P S. (2008) Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Chem.-Biol. Interactions*. **173**: 97-104.
- Singh R, Singh B, Singh S, Kumar N, Kumar S, Arora S. (2010) Umbelliferone-An antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. *Food Chemistry*. **120**: 825-830.
- Smith J A, Park S, Krause J S, Banik N L. (2013) Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. *Neurochemistry International*. **3354**:12.
- Soares M O, Alves R C, Pires P C, M. Beatriz P P, Oliveira B P P, Ana F V. (2013) Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: Nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts. *Food and Chemical Toxicology*. **60**: 413-418.
- Soobrattee M A, Neergheen V S, Luximon-Ramma A, Aruomab O I, Bahorun T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*. **579**: 200-213.
- Sorg O. (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes rendus Biologies*. **327**: 649-662.
- Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Lopez-Real A M, Labandeira-Garcia J L. (2002) Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: Relevance for Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol*. **64**: 125-135.
- Stafforini D M, Sheller J R, Blackwell T S, Sapirstein A, Yull F E, McIntyre T M, Bonventre J V, Prescott S. M, Roberts L J I I. (2006) Release of free F2-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet activating factor acetylhydrolases. *Journal of Biological Chemistry*. **281**: 4616-4623.
- Stinco C M, Baroni M V, Di Paola Naranjo R D, Wunderlin D A, Heredia F J, Melendez-Martinez A J, Vicario I M. (2014) Hydrophilic antioxidant compounds in orange juice from different 4 fruit cultivars: Composition and antioxidant activity evaluated by 5 chemical and cellular based (*Saccharomyces cerevisiae*) assays. *Journal of Food Composition and Analysis*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2014.09.006> 0889-1575/_2014.
- Stocker R S, Keaney J F Jr. (2004) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev*. **84**: 1381-1478.

- Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh A F, Glazer A N, Ames B N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. **235**: 1043–1046.
- St-Pierre J, Buckingham J A, Roebuck S J, et al., (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*. **277**:44784-44790.
- Su X Y, Wang Z Y, Liu J R. (2009) In vitro and in vivo antioxidant activity of *Pinus koraiensis* seed extract containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. **117**: 681-686.
- Suntar I, Akkol E K, Keles H, Yesilada E, Sarker S D, Arroo R, Baykal T. (2012) Efficacy of *Daphne oleoides* subsp. *kurdica* used for wound healing: Identification of active compounds through bioassay guided isolation technique. *Journal of Ethnopharmacology* **141**: 1058-1070.
- Suwalsky M, Orellana P, Avello M, Villena F. (2007) Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.* **45**: 130-135.
- Suzuki K, Ohno H, Oh-ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Fukii J, Radak A, Taniguchi N. (2000) Superoxide dismutases in exercise and disease. In: *Handbook of Oxidants and Antioxidants and Exercise*, edited by Sen CK, Packer L, Hanninen O. Amsterdam: Elsevier. 243-295.
- Swain S D, Rohn T T, Quinn M T. (2002) Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal*. **4**: 69-83.
- Sweeney A P, Wyllie S G, Shalliker R A, Markham J L. (2001) Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **75**: 273-277.
- Taniyama Y and Griendling K K. (2003) Reactive Oxygen Species in the Vasculature Molecular and Cellular Mechanisms, *Hypertension*. **42**:1075.
- Tapiero H, Tew K D, Nguyen Ba G, Mathé G. (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.* **56**: 200-7.
- Thomas J A and Mallis R J. (2001) Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. *Exp. Gerontol.* **36**:1519-1526.
- Tian F, Li B, Ji B, Yang J, Zhang G, Chen Y, Luo Y. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*. **113**: 173-179.
- Touyz R M, Tabet F, Schiffrin E L. (2003) Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **30**: 860-866.
- Trouillas P T, Calliste C A, Allais D P, Simon A, Marfak A, Delage C, et al., (2003) Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*. **80**: 399-407.

- Tulard A, Hoffschir F, de Boisferon F H, Luccioni C, Bravard A. (2003) Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* **35**: 68–77.
- Uchida K, Stadtman E R, (1993) Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra and intermolecular cross-linking reaction. *J. Biol. Chem.* **268**: 6388-6393.
- Umamaheswari M, AsokKumar K, Somasundaram A, Sivashanmugam T, Subhadradevi V, Ravi T K. (2007) Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **109**: 547-551.
- Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P, Roveri A, Pifferi G. (1994) A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic Biol Med.* **16**: 547-53.
- Valko M, Rhodes C J, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**: 1-40.
- van Acker S A B E, van den Berg D J, Tromp M N J L, Griffioen D H, van Bennekom W P, van der Vijgh W J F, Bast A. (1996) *Free Rad. Biol. Med.* **20**: 275-283.
- van der Vliet A, Eiserich A J, Shigenaga M K, Cross C. (1999) Reactive Nitrogen Species and Tyrosine Nitration in the Respiratory Tract. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **160 (1)**: 1-9.
- Van Hoorn D E C, Nijveldt R J, Van Leeuwen P A M, Hofman Z, M'Rabet L, De Bont D B A, Van Norren K. (2002) Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*. **451**: 111-118.
- Vartanian L S and Gurevich S M. (1989) NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide radicals in liver nuclei. *Biokhimiia*. **54**:1020-1025.
- Vasilets V N, Shekhter A B, Guller A E, Pekshev A V. (2015) Air plasma-generated nitric oxide in treatment of skin scars and articular musculoskeletal disorders: Preliminary review of observations. *Clinical Plasma Medicine*. **3**: 32-39.
- Velayutham M, Hemann C, Zweier J L. (2011) Removal of H₂O₂ and generation of superoxide radical: Role of cytochrome c and NADH . *Free Radical Biology & Medicine*. **51**: 160-170.
- Velioglu Y. S, Mazza G, Gao L, Oomah B. D. (1998) Antioxidant activity and total polyphenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 4113-4117.
- Victoria K. (1994) Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutat Res.* **317**: 43-55.
- Vinson J A, Hao Y, Zubic S K. (1998) Food antioxidant quantity and quality in foods: Vegetables. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **46**: 3630-3634.

- Vučković I, Vujisić L, Klaas C A, Merfort I, Milosavljević S. (2011) NF- κ B DNA binding activity of sesquiterpene lactones from *Anthemis arvensis* and *Anthemis cotula*. *Nat. Prod. Res.* 25: 800-805.
- Wang J and Mazza G. (2002) Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 4183-4189.
- Wang Z, Zhang L M, Tian Y. (2014) Progress on Electrochemical Determination of Superoxide Anion. *Chinese Journal of Analytical Chemistry.* 42 (1): 1-9.
- Waterhouse A L, Shirley J R, Donovan J L. (1996). Antioxidants in chocolate. *The Lancet.* 348: 834.
- Waud W R, Rajagopalan K V. (1976) Purification and properties of the NAD⁺-dependent (Type D) and O₂-dependent (Type O) forms of rat liver **xanthine** dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 172: 354-364.
- Wilson 3rd D. M, Sofinowski T M, McNeill D R. (2003) Repair mechanisms for 1339 oxidative DNA damage. *Front. Biosci.* 8: 963-981.
- Woolfolk C A and Dawnard J S. (1977) Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity among bacteria. *Journal of Bacteriology* 130: 1175-1191.
- Wormser U, Sintov A, Brodsky B, Nyska A. (2000) Topical iodine preparation as therapy against sulfur mustard-induced skin lesions. *Toxicol Appl Pharmacol.* 169: 33-39.
- Wu J Q, Kosten T R, Zhang X Y. (2013) Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 46 : 200-206.
- Xu Y, Jones B E, Neufeld D S, et al., (1998) Glutathione modulates rat and mouse hepatocyte sensitivity to tumor necrosis factor α toxicity. *Gastroenterology.* 115: 1229-37.
- Yan M H, Wang X, Zhu X. (2013) Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine.* 62 : 90-101.
- Ye-ilada E, Tsuchiya K, Takaishi Y, Kawazoe K. (2000) Isolation and characterization of free radical scavenging flavonoid glycosides from the flowers of *Spartium junceum* by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology.* 23(3): 471-478.
- Yen G C and Duh P D. (1995) Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active oxygen species. *J. Agric. Food Chem.* 42: 629-632.
- Yla-Herttuala S, Luoma J, Viita H, Hiltunen T, Sisto T, Nikkari T. (1995) Transfer of 15-lipoxygenase gene into rabbit iliac arteries results in the appearance of oxidation-specific lipid-protein adducts characteristic of oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 95 (6): 2692-2698.
- Youdim K A, Shukitt-Hale B, MacKinnon S, Kalt W, Joseph J A. (2000) Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* 1523: 117-122.

- Youwei Z, Jinlian Z, Yonghong P. (2008) A comparative study on the free radical scavenging activities of some fresh flowers in southern China. *LWT - Food Science and Technology*. **41**: 1586-1591.
- Yu B P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. **74**: 139-162.
- Zhang Y, Wang Y, Angelidaki I. (2015) Alternate switching between microbial fuel cell and microbial electrolysis cell operation as a new method to control H₂O₂ level in Bioelectro-Fenton system. *Journal of Power Sources*. **291**: 108-116.
- Zhang Y, Li Q, Xing H, Lu X, Zhao L, Qu K, Bi K. (2013) Evaluation of antioxidant activity of ten compounds in different tea samples by means of an on-line HPLC–DPPH assay. *Food Research International*. **53**: 847-856.
- Zheng W and Wang S Y. (2001) Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**: 5165-5170.
- Zhou R and Li S. (2009) In vitro antioxidant analysis and characterisation of antler velvet extract. *Food Chemistry*. **114**: 1321-1327.
- Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J Ethnopharmacol*. **58**: 45-54.
- Zou C G, Agar N S, Jones G L. (2001) Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture. *Life Sci*. **69**: 75-86.
- Zucker B, Hanusch J, Bauer G. (1997) Glutathione depletion in fibroblasts is the basis for apoptosis-induction by endogenous oxygen species. *Cell Death Diff*. **4**: 388-95.