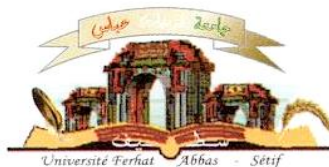


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

ZERARGUI Fatima

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et
caractérisation des substances bioactives**

Soutenue publiquement le/...../2015

DEVANT LE JURY

Président	Belhattab Rachid	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Baghiani Abderrahmane	Pr. UFA Sétif 1
Examineur	Zellagui amar	Pr.UABM Oum El Bouaghi
	Gherraf Noureddine	Pr.UABM Oum El Bouaghi
	Khettal Bachra	MCA UBM Bejaia

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Dédicaces

A Dieu le Tout Puissant, Maître du temps et des circonstances, plein d'amour, de tendresse et de bonté,

A mon cher mari qui a su m'épauler, me pousser dans mes choix, et qui m'encourage toujours à aller plus loin, quoique cela nous coûte. Ta patience m'a toujours égayé même dans les moments les plus durs. Sans toi je ne serai pas arrivée jusque là,

Que vous dire, mes chers enfants, Zizou, chakib, lamis et maissoune, vous étiez toujours là pour m'écouter, me soutenir, me réconforter et m'encourager dans les moments de doute....Tous les mots ne suffiraient pas...Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien et votre amour, ce modeste travail doit vous servir d'exemple pour réussir et faire mieux que votre maman ; Je vous aime,

Merci à mes proches notamment mes frères, mes sœurs, ma belle famille, mon gendre Adel et mes amis pour votre soutien et votre présence à mes côtés,

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que je ressens envers toi, ma petite fille Nadine, tu nous as apporté un bonheur sans faille depuis ta naissance. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A la mémoire de ma mère Djamila et mon père lamri pour m'avoir donné la vie et la joie de vivre. Vos conseils et bénédictions n'ont jamais fait défaut, que Dieu le tout puissant vous accorde son paradis éternel (amin).

REMERCIEMENTS

L'information et la formation ne sont que directives mais le fruit et l'épanouissement en sont la résultante.

Ce travail de thèse a atteint son terme grâce à l'assistance et à la collaboration de nombreuses personnes. Je profite de cette occasion de gratitude et de reconnaissance pour remercier tous ceux qui de loin ou de près ont contribué.

Avant tout, je voudrai exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements à monsieur le professeur Abderrahmane Baghiani, mon directeur de thèse, qui a tout d'abord accepté la conduite et la direction de ma thèse, par sa rigueur scientifique, par ses conseils et ses encouragements, il m'a toujours aidé à aller de l'avant, veuillez trouver ici l'expression de mon estime et ma considération.

Ma profonde gratitude va à Monsieur Rachid Belhattab, professeur à l'université Ferhat Abbas Sétif, qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie vivement les membres de jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail, madame Khettal Bachra, professeur à l'université Abderrahmane Mira, Bejaia, le Professeur Zellagui Amar et le professeur Gherraf Noureddine Université Larbi Ben M'Hidi, Oum El Bouaghi.

Je remercie le professeur Mohammad S. Mubarak et le Professeur Musa H. Abu Zarga, Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Amman Jordanie pour leur contribution dans le partage de leurs compétences en RMN et spectrométrie de masse pour la détermination des structures des composés isolés de la plante.

Je tiens à remercier sincèrement le professeur Lekhmici Arrar pour ses conseils, directives et contributions lors de la rédaction du manuscrit.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe du laboratoire de biochimie.

Résumé

La présente étude s'articule autour de la connaissance des activités biologiques et de la composition phytochimique des racines de la plante *Tamus communis* L. L'étape d'extraction des polyphénols a été complétée par un screening chimique partiel suivie par le dosage des polyphénols et des flavonoïdes. Les résultats ont montré que l'extrait méthanolique (EMeOH) est plus riche en polyphénols ($69,786 \pm 0.10$ mg Equivalents d'Acide Gallique pour 1g d'extrait/g d'extrait) que l'extrait brut (EBr) ($29,571 \pm 0.11$ mg EAG/g d'extrait). Le fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'EMeOH a permis d'obtenir 6 fractions (FI-FVI) selon leur profil sur CCM. Des purifications ont été opérées pour deux fractions (FIV et FV) et des analyses chimiques ; la spectroscopie de masse (SM) et la RMN du proton H^1 et C^{13} ont permis la détermination de la structure de deux composés purs, C1 : le diméthoxypsoralène et C2 : l'héraclénine. Ces deux composés sont des furanocoumarines isolés pour la première fois dans cette plante. Plusieurs méthodes permettant d'évaluer l'activité antioxydante *in vitro* ont été utilisées. L'inhibition du DPPH radicalaire a montré que l'EMeOH ($0,1187 \pm 0,025$ mg/ml) et l'EBr ($0,2363 \pm 0,019$ mg/ml) possèdent l'activité antioxydante la plus efficace. Le blanchissement du β -carotène suivi pendant 24 heures est ralenti fortement en présence de tous les extraits et particulièrement des deux composés C1 et C2 ($I\% = 66,03 \pm 0,64\%$, $I\% = 72,69 \pm 1,87\%$, respectivement). L'effet inhibiteur de la peroxydation des lipides a montré que les taux d'inhibition de l'EBr ($86,23 \pm 0,057$), de l'EMeOH ($87,56 \pm 1,13$) et du C1 ($89,9 \pm 0,1$) sont semblables à celui du BHT ($86,03 \pm 0,45$) ($p > 0.05$). L'effet inhibiteur sur la xanthine oxydase (XO) des composés purs C1 et C2 s'avère intéressant avec des valeurs respectives d' $IC_{50} = 0,074 \pm 0,003$ mg/ml et $0,099 \pm 0,002$ mg/ml. Les extraits, les fractions ainsi que les deux composés purs ont montré une activité anti-hémolytique considérable exprimée par une importante prolongation de l' HT_{50} qui varie de 70.34 ± 2.15 min pour le contrôle CTL (AAPH) à $207 \pm 5,657$ mn pour FI dont

l'HT₅₀ du composé C1 (130,485 ± 7,77 mn) s'est montré supérieur à celui du C2 (88,86 ± 5,10 mn). Une approche *in vivo* a été réalisée sur des souris traitées par une dose de 100 mg /Kg/j d'EBr afin de déterminer le potentiel antioxydant, en se basant sur des paramètres biochimiques ; tissulaires, plasmatiques et du sang totale. Les résultats ont exhibé une diminution significative (54,09%) de la teneur de malondialdéhyde (MDA) dans le foie et une augmentation du taux de glutathion (GSH) et de la catalase (47,30% et 46,87%, respectivement). Ces résultats montrent que les racines de *T.communis* est une source prometteuse d'agents antioxydants.

Mots clés : *Tamus communis*, polyphénols, furanocoumarine, Xanthine oxydase, activité antihémolytique, peroxydation des lipides.

EBr at a dose of 100 mg / Kg / day to determine the antioxidant potential based on biochemical parameters in tissue, plasma and whole blood. The results exhibited a significant decrease (54.09%) of the content of malondialdehyde (MDA) in the liver and increased glutathione (GSH) and catalase (47.30% and 46.87% respectively). These results indicate that the roots of *T.communis* are a promising source of antioxidants.

Keywords : *Tamus communis*, polyphenols, furanocoumarins, xanthine oxidase, antihemolytic activity, lipids peroxidation

ملخص

تهدف الدراسة الحالية إلى معرفة النشاطات البيولوجية والتركيب الكيميائي لجذور نبات *Tamus communis*. اتبعت طريقة استخلاص المركبات الفينولية بتحليل كيميائي مع تقدير عديدات الفينول الكلية والفلافونيدات. أظهرت النتائج أن المستخلص الميثانولي كان الأكثر غنى بعديدات الفينول (0.10 ± 69.786 مغ مكافئ حمض الغاليك/ غ من الوزن الجاف) من المستخلص الخام (0.11 ± 29.571 مغ مكافئ حمض الغاليك/ غ من الوزن الجاف). سمحت الفصل بواسطة كروماتوغرافيا العمود على هلام السليس للمستخلص الميثانولي بالحصول على ستة أجزاء (FI - FVI) حسب تموضعها على الطبقة الرقيقة للسليس. سمحت تنقية والتحليل الكيميائي للجزئين (FV و FIV) باستعمال جهاز القياس الطيفي للكتلة (SM) و RMN ل H^1 و C^{13} بتحديد بنية مركبين نقيين هما C_1 : diméthoxypsoralène و C_2 : héraclinine. ينتمي هذين المركبين إلى عائلة furocoumarines التي تم عزلها لأول مرة من هذه النبتة. تم استعمال العديد من الطرق لتقدير النشاطية المضادة للأكسدة *in vitro*. أظهر تثبيط جذور DPPH، أن كل من المستخلص الميثانولي (0.025 ± 0.1187 مغ/مل) و المستخلص الخام (0.019 ± 0.2363 مغ/مل) يملكان أعلى نشاطية مضادة للأكسدة. سجل انخفاض عالي لايضاض جزيئات β -carotène الذي تم تتبعه خلال 24 ساعة بالنسبة لكل المستخلصات خصوصا المركبين C_1 و C_2 ($I\% = 66.03 \pm 0.64$ ، $I\% = 1.87 \pm 72.69$ على الترتيب). في حين أظهرت نتائج التأثير التثبيطي لفوق أكسدة الليبيدات أن نسبة تثبيط كل من المستخلص الخام (0.057 ± 86.23) و المستخلص الميثانولي (1.13 ± 87.56) و C_1 (0.1 ± 89.9) تملك تأثيرا مقاربا لتأثير BHT (0.45 ± 86.03) ($P > 0.05$). فيما يخص التأثير التثبيطي لانزيم XO، فإن المركبين النقيين C_1 و C_2 يملكان تأثيرا معتبرا بقيم IC_{50} مساوية ل 0.003 ± 0.074 و 0.002 ± 0.099 مغ/مل على التوالي. كما يملك هذين المركبين نشاطية معتبرة مضادة للانحلال الدموي وذلك بتسجيل زيادة في قيم HT_{50} في كل من المستخلصات والأجزاء بالإضافة الى المركبين النقيين بقيمة تتراوح بين 2.15 ± 70.34 دقيقة بالنسبة للشاهد AAPH إلى 5.657 ± 207 دقيقة بالنسبة ل FI، حيث قدرت قيمة HT_{50} ل C_1 (7.77 ± 130.485 دقيقة) والتي تجاوزت قيمة $2C$ (5.10 ± 88.86 دقيقة). أجريت دراسة *in vivo* على الفئران، تم معالجتها بجرعة 100 مغ/كغ/يوم من المستخلص الخام من أجل قياس القدرة المضادة للأكسدة وذلك بالاعتماد على عوامل بيوكيميائية نسيجية وبلازمو و الدم الكلي. سجلت الدراسة انخفاضا معتبرا (54.09%) في مستوى MDA في الكبد وزيادة في مستويات GSH ونشاطية CAT (47.30% و 46.87% على التوالي). أظهرت النتائج أن جذور نبات *T.communis* تمثل مصدرا هاما للعوامل المضادة للأكسدة.

كلمات البحث: : الكرمة السوداء عديدات الفينول ،XOإنزيم، النشاط مانع انحلال الدم، بيروكسيد الدهون.
furanocoumarin

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les principales espèces ERO et ERA générées dans les systèmes biologiques.....	5
Tableau 2. Classification et structure des flavonoïdes	24
Tableau 3. Effet de la structure sur les activités antioxydantes, inhibitrice d'enzyme et cytotoxique des coumarines.....	30
Tableau 4. L'activité totale et oxydase de la XOR purifiée à partir du lait bovin frais.....	64
Tableau 5. Différents groupes de composés mis en évidence dans l'EBr des racines de <i>T.communis</i>	65
Tableau 6. RMN du RMN- ¹ H du composé C1.....	69
Tableau 7. RMN- ¹³ C du composé C1	70
Tableau 8. RMN- ¹ H du composé C2	77
Tableau 9. RMN- ¹³ C du composé C2.....	82
Tableau 10. Teneur des Polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits/fractions des racines de <i>T.communis</i>	85

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale	3
Figure 2. Réactions de base intervenant lors de la synthèse et la dégradation des ERO et des ERA.....	4
Figure 3. Sites de production intracellulaire des radicaux libres	9
Figure 4. Génération extracellulaire des radicaux libres.....	10
Figure 5. Lésions cellulaires induites par les radicaux libres.....	11
Figure 6. Les espèces réactives, le dommage oxydatif et les réponses cellulaires au stress oxydatif	14
Figure 7. Classification des polyphénols	21
Figure 8. Structure générale du noyau des flavonoïdes.....	23
Figure 9. Activité biologique des polyphénols.....	24
Figure 10. Structure de base de coumarine.....	25
Figure 11. Coumarine simple.....	26
Figure 12. Structure chimique d'un furocoumarine	26
Figure 13. Structure d'un pyranocoumarine	27
Figure 14. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des furocoumarines	28
Figure 15. Mécanisme catalytique au niveau du site actif (molybdène) de la XOR en produisant l'acide urique à partir de la xanthine	31
Figure 16. Structure de l'enzyme xanthine oxydoréductase.....	33
Figure 17. les différentes parties de la plante <i>Tamus communis</i> L.....	38
Figure 18. Les différentes étapes de fractionnement et de purifications de l'extrait brut des racines de Tc.....	45
Figure 19. Droite d'étalonnage de l'acide Gallique.....	48
Figure 20. Courbe d'étalonnage de la Quercétine et de la rutine	49
Figure 21. Structure chimique du radical libre DPPH•.....	52
Figure 22. Spectre d'absorption UV-Vis (A) et électrophorèse (SDS-PAGE) (B) de la XO purifiée.....	65
Figure 23. CCM des fractions.....	66
Figure 24. CCM des deux composés C1 et C2.	67
Figure 25. Spectre de masse du composé C1	68
Figure 26. Spectre RMN ^1H du composé C1.....	69

Figure 27. Spectre RMN- ^{13}C du composé C1	70
Figure 28. Spectre DEPT du composé C1.....	71
Figure 29. A Spectre COSY du composé C1, B spectre étalé.....	72
Figure 30. Spectre HSQC du C1.....	74
Figure 31. Spectre HMBC du composé C1.....	75
Figure 32. Structure de la molécule du composé C1 : 5, 8- Diméthoxypsoralène	75
Figure 33. Spectre de masse du composé C2.....	76
Figure 34. Spectre du ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz).....	77
Figure 35. Spectre- RMN- ^{13}C	78
Figure 36. Spectre DEPT du composé C2.....	79
Figure 37. Spectre 2D COSY.....	80
Figure 38. Spectre 2D HSQC du composé C2.....	81
Figure 39. Spectre 2D HMBC du composé C2.....	82
Figure 40. Molécule du composé C2 : héraclénine	83
Figure 41. La teneur en polyphénols totaux	84
Figure 42. IC_{50} du radical DPPH des différents extraits/ fractions des racines de Tc, des deux composés purs C1,C2 et des composés phénoliques (Rutine, Quercétine, Acide gallique) avec un standard (BHT).....	88
Figure 43. Activité antioxydante des extraits des racines de Tc et des composés purs C1,C2 par rapport au BHT, MeOH et H_2O par le test de β -carotène / acide linoléique.....	90
Figure 44. Activité antioxydante des extraits/fractions des racines de Tc, C1,C2, BHT, MeOH et H_2O (après 24 h) par le test de β -carotène / acide linoléique.....	90
Figure 45. Pouvoir réducteur des EBr, EMeOH et FII des racines de Tc, du BHT et de la Vit C à 700 nm.	92
Figure 46. Histogrammes exprimant la concentration efficace ($\mu\text{g/ml}$) permettant la réduction de 50 % du fer.....	93
Figure 47. Activité chélatrice de l'EMeOH, l'EBr des extraits de racines de Tc et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux.....	97
Figure 48. Histogramme des valeurs des concentrations nécessaires pour la chélation de 50 % du fer des différents extraits.....	95
Figure 49. Evaluation du taux d'inhibition de la peroxydation lipidique	98
Figure 50. Cinétique représentant le taux d'inhibition de la peroxydation lipidique en fonction du temps (98h) de l'EBr, l'EMeOH, FIV, FV, C1et C2 en comparaison avec le méthanol et le contrôle négatif H_2O	99

Figure 51. IC ₅₀ des extraits/fractions des racines de Tc, C1,C2 et l'allopurinol.....	102
Figure 52. Les concentrations des extraits/fractions des racines de Tc et C1,C2 qui inhibent la réduction de 50 % du Cyt c ³⁺	103
Figure 53. Les concentrations des extraits/fractions des racines de Tc et C1,C2 qui inhibent 50 % de l'activité de la XO en comparaison avec celles qui inhibent la réduction de 50 % du Cyt c par l'O ⁻ ₂ généré par la XO.	104
Figure 54. A. % d'hémolyse, B. HT ₅₀ (mn) des extraits/fractions des racines de Tc, C1,C2, Vit C et C ⁻	107
Figure 55. Cinétique d'hémolyse des extraits/fractions des racines de Tc, C1,C2, Vit C et C ⁻ (AAPH) pendant 208mn.	108
Figure 56. Comparaison de la concentration des MDA au niveau du tissu hépatique, traité par l'EBr de Tc (100mg/ml) et la Vit C (50mg/ml).	111
Figure 57. Taux du GSH dans l'hépatocyte.	113
Figure 58. Activité de la catalase.....	114
Figure 59. Capacité anti-oxydante réductrice des groupes traités par EBr de Tc et la Vit C comparés au groupe normal C-	116
Figure 60. Capacité anti-oxydante représentée par le pourcentage d'inhibition du radical DPPH des groupes traités par EBr de Tc et la Vit C comparés au groupe normal CTL	116
Figure 61. Temps de demi-hémolyse (HT ₅₀) des groupes traités par l'EBr, la Vit C comparés au groupe non traité.	119
Figure 62. Cinétique de la lyse érythrocytaire en présence de t-BHP pour les différents groupes.....	119

LISTE DES ABREVIATIONS

AA %	pourcentage de l'activité antioxydante
AAPH	(2,2-azo-bis (2-amidinopropane) dihydrochloride)
ANOVA	analyse de la variance
BHA	Butylated hydroxyanisole
BHT	Butylated hydroxytoluene
BMXO	Bovine milk xanthine oxidase
CAO	capacité antioxydante
CAP	capacité antioxydante plasmatique
CAT	catalase
CBB	Coomassie brilliant blue
CCM	chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	solvant deutéré
COSY	CORrelation SpectroscopY
Cyt C	cytochrome c
Da	dalton
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DO	Densité optique
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	(5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)),
EAG	équivalent acide galique
EBr	extrait brut de la plante
EMeOH	extrait méthanolique
EQ	équivalent de quercétine
ER	équivalent de rutine
ERA	espèces réactives de l'azote
ERO	espèces réactives de l'oxygène

FTC	thiocyanate ferrique
GPx	glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion disulfure oxydé
HO•	radical hydroxyle
HOCl	acide hypochloreux
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HRMS	Spectres de masse à haute résolution
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation,
HT ₅₀	Half-hemolysis time
I %	pourcentage d'inhibition
IC ₅₀	concentration inhibitrice de 50 % de l'activité
KRL	Kit radicaux libres
LDL	lipoprotéine de base densité
LMWA	low molecular weight antioxydant
MDA	malondialdéhyde
MeOH	méthanol
MoO ₄ ²⁻	phosphomolybdique
MoO ₄ ²⁻	phosphomolybdique
MPO	myéloperoxydase
NO•	monoxyde d'azote
NO ₂ •	radical nitrite
NOS	nitrique oxyde synthase
¹ O ₂	oxygène singulet
O ₂ ⁻	anion superoxyde
OH•	radical hydroxyle

ONOO ⁻	anion peroxydinitrite
ONOOH	nitroperoxyde
PBS	tampon phosphate salin
PFR	protein to flavin ratio
ppm	partie par million
R [•]	radical libre oxydant
rpm	rotation par minute
SD	standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis
SM	Spectrométrie de masse
SOD	superoxydes dismutase
TBA	acide thiobarbiturique
t-BHP	tert-butyle hydroperoxyde
Tc	Tamus communis L.
TCA	acide trichloracétique
TEMED	N,N,N',N' tetraméthylène diamine
TMS	tétraméthylsilane
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
(WO ₄ ²⁻) ⁻	phosphotungstique
XDH	Xanthine deshydrogenase
XO	Xanthine oxydase

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Le stress oxydant.....	3
1.1. Les espèces réactives de l'oxygène.....	4
1.2. Les espèces réactives de l'azote.....	8
1.3. Sources métaboliques des ERO et ERA.....	8
1.3.1. La production intracellulaire	8
1.3.2. La production extracellulaire.....	9
1.4. Les cibles des ERO et des ERA.....	10
1.5. Les pathologies liées au stress oxydant.....	15
2. Les antioxydants.....	15
2.1. Les systèmes de défense antioxydants naturels.....	15
2.1.1. Antioxydants enzymatiques.....	17
2.1.2. Antioxydants de faible poids moléculaire.....	18
2.2. Antioxydants synthétiques.....	19
3. Les composés phénoliques.....	20
3.1. Les flavonoïdes.....	23
3.2. Les coumarines.....	25
4. La xanthine oxydoréductase (XOR)	31
4.1. Structure.....	32
4.2. Fonctions de la XO	33
4.3. Inhibiteurs de la XO.....	34
5. Evaluation de l'activité antioxydante	35
5.1. Transfert d'atome d'hydrogène (<i>HAT, hydrogen atom transfer</i>).....	35
5.2. Transfert mono-électronique d'électron (<i>SET, single electron transfer</i>).....	35
5.3. Réaction d'oxydoréduction.....	35
6. la plante <i>Tamus communis</i> L.....	36
6.1. Noms vernaculaire.....	36
6.2. Classification systématique.....	37

6.3. Description botanique	37
6.4. Distribution géographique.....	38
6.5. Propriétés d'utilisation traditionnelles et médicales.....	38
6.6. Données phytochimiques.....	39
6.7. Données pharmacologiques.....	40
6.8. Données toxicologiques	40

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel.....	42
1.1. Matériel végétal.....	42
1.2. Choix des animaux.....	42
2. Méthodes	42
2.1. Procédure d'extraction	42
2.2. Screening phytochimique partiel.....	42
2.3. Méthodes chromatographiques analytiques.....	44
2.3.1. Isolation.....	46
2.3.2. Techniques de détermination de la structure des composés isolés.....	46
2.4. Dosage des composés phénoliques.....	47
2.5. Dosage des flavonoïdes.....	48
2.6. Purification de la xanthine oxydoréductase (XOR).....	49
2.7. Évaluation chimique de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	51
2.7.1. Détermination de l'activité antiradicalaire des extraits par la méthode au DPPH	52
2.7.2. Test de Co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique.....	53
2.7.3. Evaluation de l'inhibition de la xanthine oxydase par les extraits de plantes.....	54
2.7.4. Mesure de l'activité Scavenger de l'Anion Superoxide ($O_2^{\bullet-}$).....	54
2.7.5. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC).....	55
2.7.6 Test du pouvoir réducteur.	56
2.7.7. Chélation du fer ferreux	56

2.7.8. Évaluation biologique de l'activité antioxydante par le test KR	57
2.8. Etude, <i>in vivo</i> , de la capacité antioxydante (CAO) de l'extrait brut (EBr) des racines de <i>Tamus communis</i> L	58
2.8.1. Evaluation de la capacité antioxydante (CAO) totale du sang	59
2.8.2. Evaluation de la CAO plasmatique vis-à-vis du radical DPPH	60
2.8.3. Evaluation de la CAO plasmatique vis-à-vis de la réduction du fer.....	60
2.8.4. Analyse des paramètres tissulaires	60
3. Analyses statistiques.....	62
 RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Extraction des polyphénols	63
2. Purification de la xanthine oxydase	63
3. Test partiel phytochimique	65
4. Fractionnement.....	66
4.1.. Identification du composé C1	67
4.2. Identification du composé C2	76
5. Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes	83
6. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	87
6.1.Effet capteur du radical DPPH	87
6.2. Test de β -carotène / acide linoléique	88
6.3. Pouvoir réducteur	92
6.4. Chélation du fer ferreux	94
6.5. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique	97
6.6. Evaluation de l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase	100
6.7. Effet scavenger de l'ion superoxyde $O_2^{\circ-}$ généré par la XO	102
6.8. Évaluation de l'activité antioxydante par le test biologique KRL	105
7. Evaluation du potentiel antioxydant <i>in vivo</i>	109
7.1. Au niveau tissulaire (foie)	110
7.1.1. Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)...	111

7.1.2. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase et du GSH	112
7.2. Capacité antioxydante du plasma	115
7.3. Capacité antioxydante du Sang total	118
DISCUSSION GENERALE	120
REFERENCES	126

INTRODUCTION

Le stress oxydant résulte du déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants, au profit des premiers. Il est impliqué dans de nombreuses pathologies, comme cause ou conséquence. Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species : ROS) sont capables d'endommager diverses biomolécules telles que les protéines, les acides désoxyribonucléiques (ADN) ou les acides gras polyinsaturés.

La carence en substances nutritives protectrices et antioxydantes nécessaires dans le régime alimentaire et certaines conditions héréditaires et pathologiques peuvent affecter négativement l'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants dans l'organisme. Bien que la relation entre le stress oxydatif et les maladies demeure imprécise, les radicaux libres sont produits en plus grandes quantités lors de certaines maladies dégénératives. Pour maintenir l'équilibre antioxydant/pro-oxydant, l'organisme humain est protégé contre le stress oxydatif par un système antioxydant complexe. Le système de défense antioxydant consiste en un réseau enzymatique et non enzymatique aussi bien endogène qu'exogène, agissant synergiquement. Pour renforcer le système antioxydant spontané qui peut être défaillant dans certaines conditions, une supplémentation en molécules antioxydantes naturelles est nécessaire.

En s'appuyant sur cette vision, Il devient indispensable d'intensifier l'effort de recherche pour développer de nouveaux médicaments accessibles à tous, obtenus à partir de plantes locales, de formulations aisées et peu coûteuses.

La plante médicinale El Karma Souda ou *Tamus communis* L. présente dans les montagnes est une usine sauvage commune de la famille Dioscoreaceae. C'est une plante herbacée avec de grands tubercules charnus. La plus grande densité ainsi que la plus grande diversité des Dioscoreaceae se retrouve sous les climats méditerranés. En Afrique du Nord et en particulier dans la partie nord de l'Algérie, la racine est utilisée en médecine traditionnelle

comme remède contre les contusions ce qui a valu à la plante le nom d'herbe aux femmes battues. Les rhizomes avec mucilages et raphides d'oxalate de Ca sont utilisés comme rubéfiants (antirhumatismal) et anti-ecchymotique.

Peu de travaux concernant la composition phytochimique ont été réalisés sur cette plante, et aucune étude ne s'est intéressée à la synergie qui peut exister entre les antioxydants une fois séparés. C'est la raison pour laquelle nous avons axé nos travaux sur l'étude de cette plante, tant d'un point de vue phytochimique que sur l'activité antioxydante des extraits de ses racines.

Le présent travail est structuré en deux parties:

- screening phytochimique de l'extrait brut des racines de la plante, cette partie concerne la purification et la caractérisation des molécules obtenues lors de cette étude.
- le deuxième volet est consacré à l'étude de l'activité antioxydante in vitro et in vivo ;
 - Evaluation du pouvoir piègeur (scavenger) vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH) et du radical superoxyde généré par un système enzymatique (xanthine/xanthine oxydase).
 - Effet anti-lipoperoxydant en utilisant le système acide linoléique/ β -carotène et la méthode au thiocyanate ferrique (FTC).
 - Etude de l'activité chélatrice des métaux de transition et du pouvoir réducteur.
 - Activité inhibitrice de la xanthine oxydase
 - Etude de l'effet protecteur des extraits contre l'hémolyse oxydative des érythrocytes.
 - Effet de l'EBr des racines sur l'amélioration du potentiel globale de défenses antioxydantes chez la souris par la détermination de la capacité antioxydante totale du sang, plasmatique et tissulaire.

Partie I

Bibliographie

1. Le stress oxydant

L'oxygène est indispensable à la vie des organismes aérobies où les mitochondries, "poumons" de la cellule, qui en utilisent la majeure partie comme substrat de la chaîne respiratoire pour la production de l'énergie sous forme d'ATP (**Figure 1**). Ce métabolisme induit la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) en équilibre avec les systèmes antioxydants (Roede et Jones, 2010). Le stress oxydant est défini comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants et leur élimination.

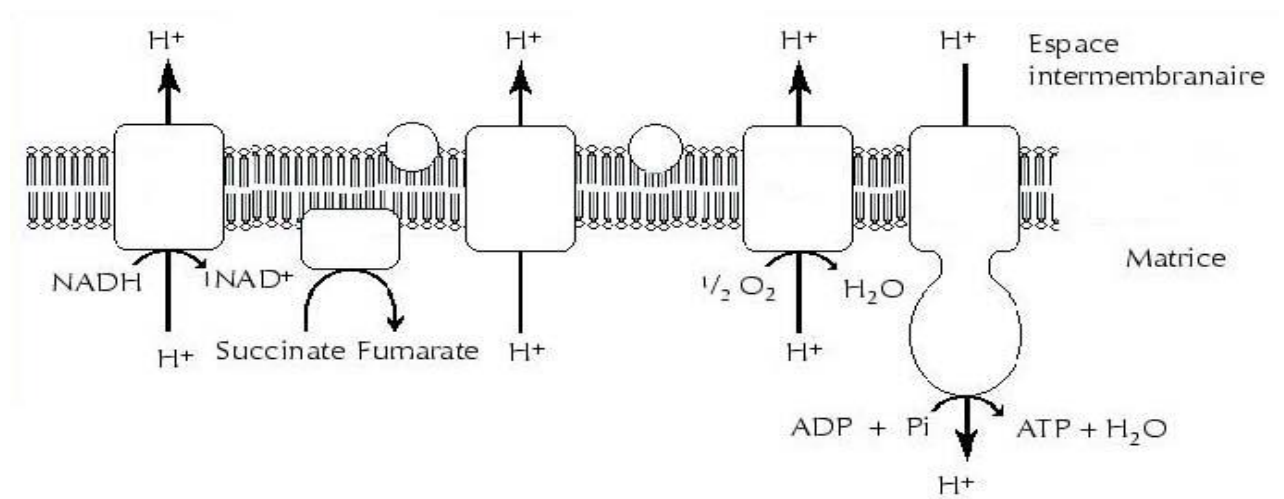


Figure 1. Représentation schématique d'une partie de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cadenas and Davies 2000)

Radicaux libres

« Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ». Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) ou de l'azote (ERA ou RNS) (Serteyn 2002) (**Figure 2**).

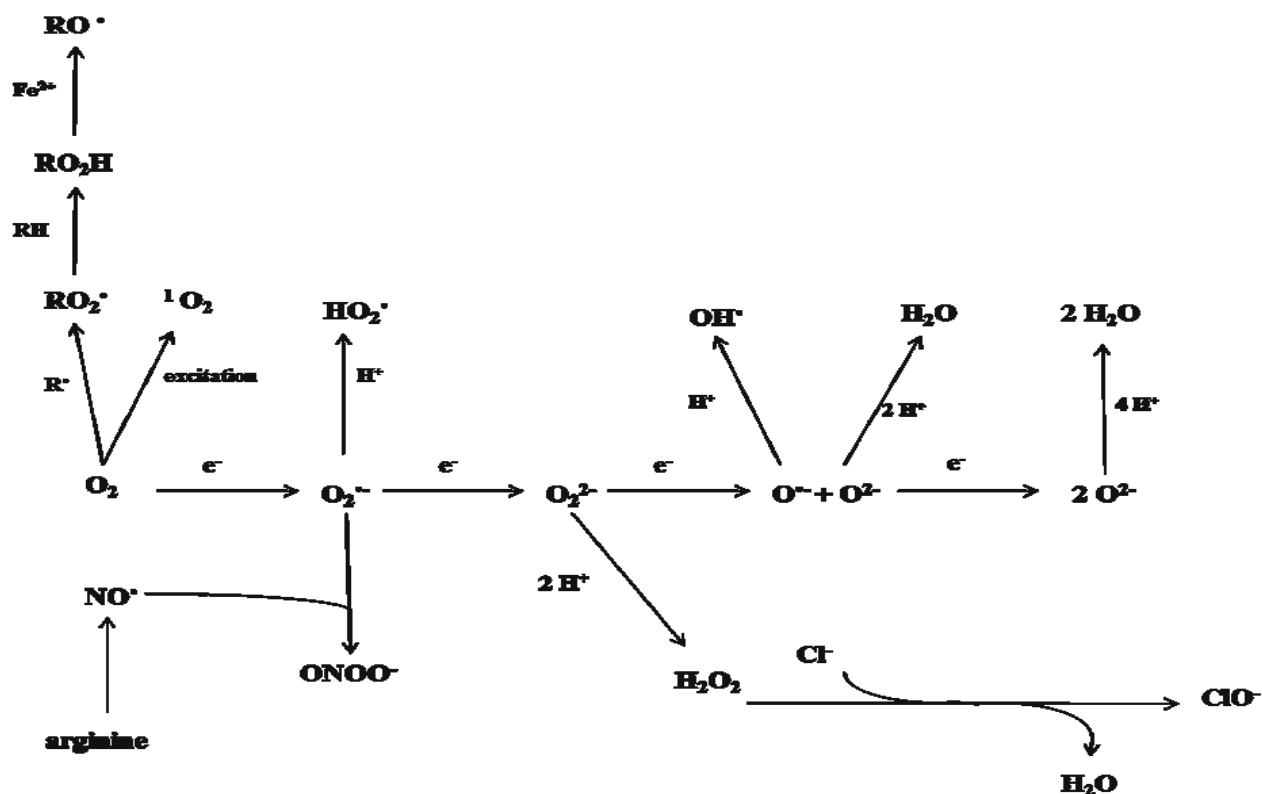


Figure 2. Réactions de base intervenant lors de la synthèse et la dégradation des ERO et des ERA (Smirnoff, 2005).

1.1. Les espèces réactives de l'oxygène

L'instabilité des espèces oxygénées réactives (**Tableau 1**) rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures. La durée de vie des espèces oxygénées réactives est extrêmement très courte de la nano à la milli seconde (Jacob, 1995).

En effet, la toxicité des espèces oxygénées réactives n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité, dans plusieurs cas des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demie vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles où elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production (Kohen and Nyska, 2002).

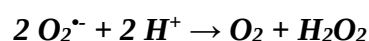
Tableau 1. Les principales espèces ERO et ERA générées dans les systèmes biologiques (Bartosz, 2003)

Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$
Radical hydroxyle	$OH^{\bullet}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\bullet}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulet	1O_2
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Radical alcoxy	RO
Radical peroxy	ROO^-

1.1.1. Le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$

L'anion superoxyde est une ERO primaire, formée par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire. Radical ayant la réactivité la plus faible parmi les radicaux libres du stress oxydant, il est généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et physiopathologiques (Gardès-Albert *et al.*, 2005) où la mitochondrie est considérée comme source principale (Lambert *et al.*, 2009).

Il est cependant hautement réactif avec certains métaux de transition comme le cuivre, le fer et le manganèse (Abreu *et al.*, 2010). Le radical superoxyde ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène :



Bien que le radical superoxyde ne soit pas considéré comme particulièrement réactif, son principal danger est due à la sa neutralisation productrice de peroxyde d'hydrogène ou d'acide hypochloreux nettement plus puissants. Au cours de l'inflammation, il est généré en grande quantité par les neutrophiles et les macrophages (Ames *et al.*, 1993). Ce processus implique l'activation de la NADPH oxydase membranaire induisant le relargage de grandes quantités d'ERO. Bien que l'anion superoxyde ne soit pas l'ERO la plus effective dans la lutte

contre les infections, sa production continue au cours du processus inflammatoire et peut induire des atteintes tissulaires (Kruidenier *et al.*, 2002).

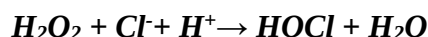
1.1.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 n'est pas une espèce radicalaire, il n'est pas chargé et peut donc diffuser très facilement à travers les membranes. De ce fait son action n'est pas restreinte à son lieu de production mais peut se dérouler dans différents compartiments cellulaires tel que le noyau, ce qui en fait un ERO assez toxique. C'est un oxydant impliqué notamment dans la voie de l'apoptose (Barouki, 2006). Cependant, il a été montré que les dommages attribués à H_2O_2 sont en fait causés, pour la plupart, par sa réduction en radical hydroxyle $HO\cdot$ via la réaction de Fenton (Wardman *et al.*, 1996).



1.1.3. L'acide hypochloreux $HOCl$

Comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux ne rentre pas dans la définition stricte du radical. Cependant, au cours de l'inflammation, la métabolisation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux par l'enzyme, la myéloperoxydase est élevée (Deby-Dupont *et al.*, 1999). L'acide hypochloreux est un agent chlorant et un oxydant fort.

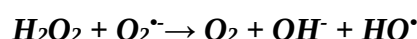


L'acide hypochloreux est considéré comme 100 à 1000 fois plus toxique que le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Il intervient à des cibles bien marquées : inactivation enzymatique, oxydation des groupements thiols de la membrane plasmique, diminution des propriétés d'adhésion de certains composés de la matrice extracellulaire.

1.1.4. Le radical hydroxyle HO•

Le radical hydroxyle est produit durant l'inflammation en grande quantité lors des interactions entre l'anion superoxyde et l'acide hypochloreux, entre l'acide hypochloreux et les ions ferreux (Fe²⁺) ou entre le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote (Kruidenier *et al.*, 2002).

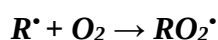
Le radical hydroxyle est formé à partir du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction de Fenton ou à partir de l'anion superoxyde dans la réaction d'Haber-Weiss :



HO• est considéré comme l'ERO la plus réactive (Lubec, 1996), inactivant la pyruvate-déshydrogénase de la mitochondrie, dépolymérisant le mucus du tractus gastro-intestinal ou induisant directement des atteintes oxydatives de l'ADN.

1.1.5. Les radicaux peroxyde

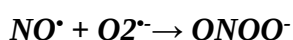
Les radicaux peroxyde sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le carbone (R•). Les radicaux R• sont issus de l'action des radicaux hydroxyles sur les substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons).



Plusieurs modes d'actions sont décrits pour les propriétés oxydantes des radicaux peroxyde : transfert de charge (arrachement d'un électron) ou d'un atome d'hydrogène (arrachement d'un atome H), addition sur les doubles liaisons (réactions intramoléculaires ou intermoléculaires) et formation d'endoperoxydes radicalaires ROOR•. Les radicaux RO₂• peuvent également se décomposer avant d'avoir réagi avec un substrat en donnant des radicaux superoxydes (Gardès-Albert *et al.*, 2005).

1.2. Les espèces réactives de l'azote

Par analogie avec les espèces réactives de l'oxygène, les métabolites dérivés de l'azote sont nommés espèces réactives de l'azote ; il s'agit du monoxyde d'azote ($\text{NO}^\bullet$) et du peroxynitrite (ONOO^-) (**Tableau 1**). Le monoxyde d'azote est produit de manière endogène lors du métabolisme de l'arginine par les « nitric oxide synthases » (NOS) dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. L'isoforme inductible iNOS de l'enzyme peut être exprimée en réponse aux agents pro-inflammatoires, produisant ainsi de grandes quantités de monoxyde d'azote comparativement aux faibles quantités générées par l'isoforme endothéliale eNOS (Rao, 2004). Le monoxyde d'azote lui-même se caractérise par une diffusivité élevée, une réactivité limitée et une demi-vie qui n'excède pas quelques secondes, il n'est donc pas particulièrement délétère pour les structures cellulaires (Blanc *et al.*, 2005). Cependant le $\text{NO}^\bullet$ peut interagir rapidement avec l'anion superoxyde et produire du peroxynitrite beaucoup plus réactif et délétère que ses précurseurs (Murphy *et al.*, 1998).



1.3. Sources métaboliques de ERO et ERA

1.3.1. La production intracellulaire

La production des ERO dans les cellules des mammifères découle de plusieurs sources (**Figure 3**) essentiellement d'origine enzymatique. Les oxydases (NADPH oxydase) constituent un "point d'entrée" en produisant l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) dont dérivent d'autres ERO. La NOS produit l'oxyde nitrique ($\text{NO}^\bullet$) indépendamment de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et constitue un autre "point d'entrée" (Serteyn *et al.*, 2002). La myéloperoxydase (MPO) produit HOCl qui amplifie la production des ERO (Serteyn *et al.*, 2003). D'autres enzymes sont également sources de génération des radicaux libres telque, les déshydrogénases, oxygénases, cyclo- et les lipoxygénases, peroxydases et la xanthine oxydase (cette dernière fera l'objet d'un chapitre à part).

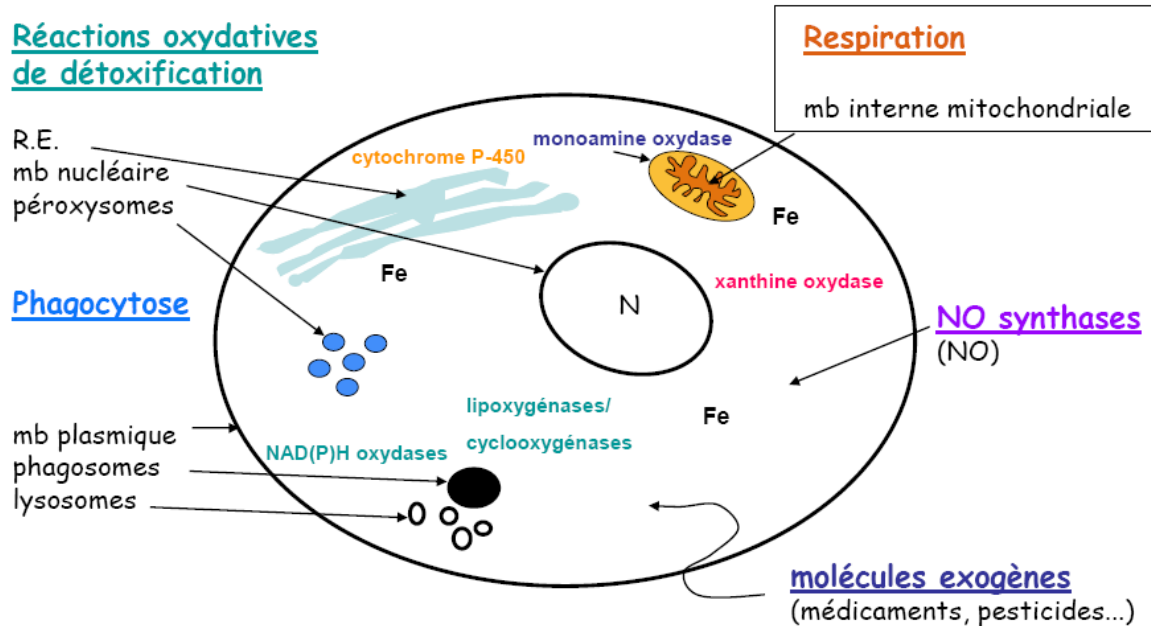


Figure 3. Sites de production intracellulaire des radicaux libres (Serteyn *et al.*, 2003).

De même, les radicaux libres sont produits *in vivo* sous l'action de plusieurs systèmes biochimiques tel que, les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires (macrophages). Des radicaux libres sont également produits sous l'influence d'autres facteurs endogènes, notamment le stress intellectuel ou thermique (Ansari, 1997 ; Valko *et al.*, 2006).

1.3.2. La production extracellulaire

Des facteurs exogènes liés à l'environnement ou au mode de vie sont également à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans l'organisme par l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent directement ou indirectement être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes). L'exposition prolongée au soleil, ainsi les rayonnements UV induisent la synthèse de $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, 1O_2 et d' H_2O_2 l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants (Martínez-Cayuela, 1995 ; Chen *et al.*, 2012) (**Figure 4**).

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels), ainsi qu'une alimentation « chimiquée » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (Mena *et al.* , 2009) qu'une alimentation déséquilibrée (carences en vitamines et oligo-éléments) ou encore les situations cliniques (chirurgie, transplantation).

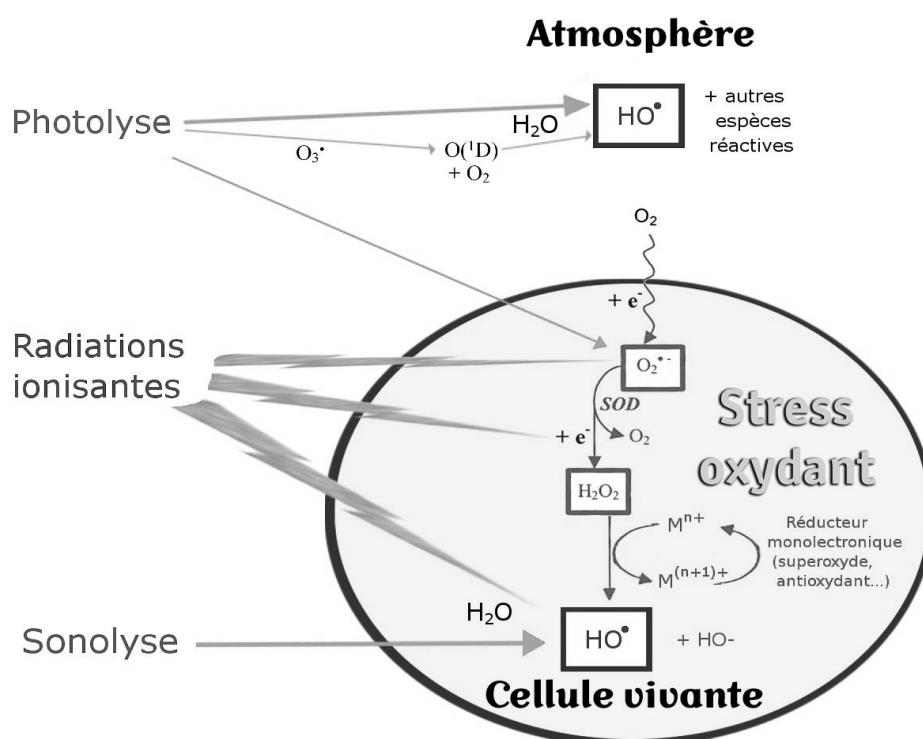


Figure 4. Génération extracellulaire des radicaux libres

1.4. Les cibles des ERO et des ERA.

La production de ces espèces pro-oxydantes est normale à faible concentration et s'accompagne d'un rôle physiologique important. Du fait de leur haute réactivité, elles régulent le phénomène d'apoptose, en entraînant la mort de cellules évoluant vers un état cancéreux (Wang *et al.*, 1999; Soobrattee *et al.*, 2005). Elles activent des facteurs de transcription, eux-mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (phagocytose) (Goldsby *et al.*, 2001). Elles modulent encore l'expression de gènes de structure

codant pour les enzymes antioxydantes (Valko *et al.*, 2007). A concentration élevée, leurs effets deviennent délétères pour les cellules, les tissus et diverses fonctions physiologiques. Les effets néfastes des ERO sont associés aux perturbations du statut rédox.

Ces espèces s'attaquent à la plupart des molécules organiques et inorganiques présentes dans les cellules, parmi lesquelles l'ADN, les protéines, les lipides, les acide-aminés, les sucres et les métaux. Ils agissent selon trois modes d'actions : en arrachant soit un électron, soit un atome d'hydrogène ou encore en s'additionnant sur les doubles liaisons. Les ERO et ERA induisent des atteintes oxydatives sur des composés cellulaires et extracellulaires en général proches de leur site de production du fait de leur demi-vie relativement courte (Jacob, 1995) (Figure 5).

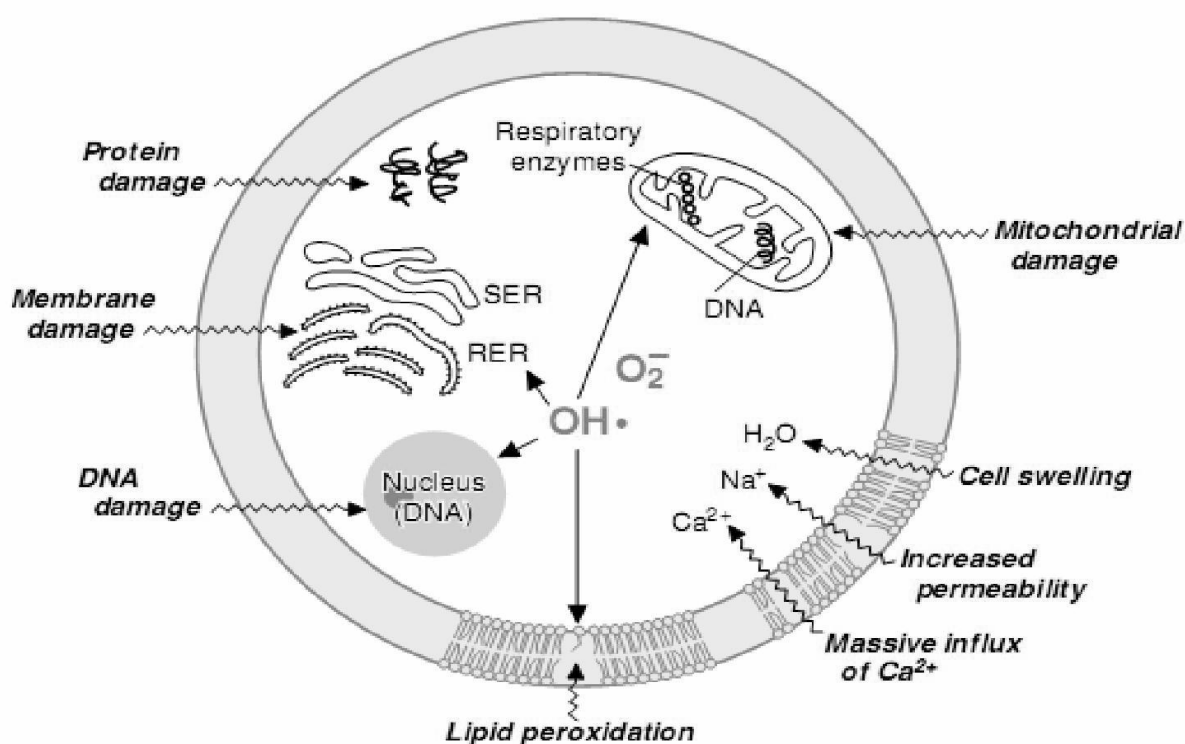


Figure 5. Lésions cellulaires induites par les radicaux libres.

Les radicaux superoxydes et les radicaux hydroxyles initient la peroxydation lipidique dans les membranes cellulaires, mitochondriales, nucléaires et du réticulum endoplasmique. L'augmentation de la perméabilité cellulaire entraîne un influx des ions calcium qui cause plus de lésions mitochondriales. Les groupes cystéine sulfhydrile et d'autres acides aminés sont oxydés et dégradés. L'ADN

mitochondrial et nucléaire peuvent être oxydés aboutissant à une rupture des doubles brins et à d'autres types de dommages. Les ERA (NO, NO₂ et peroxydinitrite) ont des effets similaires.

a. Oxydation des composés lipidiques

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les membranes sont plus particulièrement visées par le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction de peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Ce processus génère des hydro peroxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Le radical peroxyde peut, quant à lui, libérer différents aldéhydes toxiques, le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonéal. Ainsi un unique événement oxydatif peut altérer de nombreuses molécules lipidiques et induire une accumulation d'hydro peroxydes dans les membranes ce qui réduira leur fluidité ainsi que l'activité des protéines transmembranaires (Valko *et al.*, 2006).

b. Oxydation des composés protéiques

Les protéines sont les constituants cellulaires les plus abondants et sont par conséquent des cibles importantes du stress oxydant (Hunt and Wolff, 1991 ; Thannickal and Fanburg, 2000). La modification structurale mineure d'une protéine peut induire une modification dans le fonctionnement de celle-ci. Comme pour les lipides, c'est le radical hydroxyle qui est le plus réactif responsable des altérations oxydatives des protéines introduisant de nouveaux groupes fonctionnels telles que les fonctions hydroxyles ou carbonyles qui contribuent aux altérations de la fonction des protéines, la modification de leur conformation et de leur fragmentation. L'oxydation des protéines peut également induire des réticulations inter- et intra-protéines par addition d'un groupement lysine sur le groupement carbonyle d'une protéine oxydée, par

oxydation d'un groupement sulfhydryle des résidus cystéine formant ainsi des ponts disulfures ou par oxydation des résidus tyrosine formant des ponts Tyr-Tyr. De plus, la nitration des protéines par addition du peroxynitrite sur les fonctions tyrosine peut induire de sévères modifications de fonction (Baudin, 2006). En effet, la tyrosine est un acide aminé particulièrement impliqué dans les voies de signalisation, en particulier par les réactions de phosphorylation/déphosphorylation. Ainsi le stress oxydant peut avoir un effet sur la fonction propre d'une protéine mais peut également avoir des répercussions sur l'ensemble de la régulation cellulaire (Valko *et al.*, 2006).

c. Oxydation de l'ADN

L'ADN nucléaire et mitochondrial sont également des cibles des ERO. Les altérations les plus communes sont l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques et du squelette désoxyribose provoquant le clivage des brins et des mutations génétiques (Valko *et al.*, 2006). Ces altérations de la molécule d'ADN peuvent conduire soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, soit à l'implication des erreurs de réplication soit encore à une instabilité génomique et l'ensemble est associé au phénomène de carcinogenèse (Valko *et al.*, 2006). Une des altérations fréquentes de l'ADN est observée au niveau de l'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle formant la 8-hydroxy-guanine (8-OHG). Ce produit de l'oxydation de l'ADN peut être facilement dosé dans les urines et est considéré comme un marqueur de carcinogenèse (Valko *et al.*, 2006).

Les ERA peuvent également induire des oxydations de l'ADN où le monoxyde d'azote et le peroxynitrite interviennent dans l'oxydation de la chromatine. De plus, le peroxynitrite peut induire la formation de 8-nitroguanine. Les altérations oxydatives de l'ADN sont induites dans la majorité des cas, par le radical hydroxyle. Lorsque le peroxyde d'hydrogène échappe aux enzymes de régulation, il gagne le noyau de la cellule et réagit avec les ions Fe_2^+ et Cu^+

associés à la chromatine produisant ainsi *in situ* le radical hydroxyle qui attaque l'ADN la plus proche (Valko *et al.*, 2007) (Figure 6).

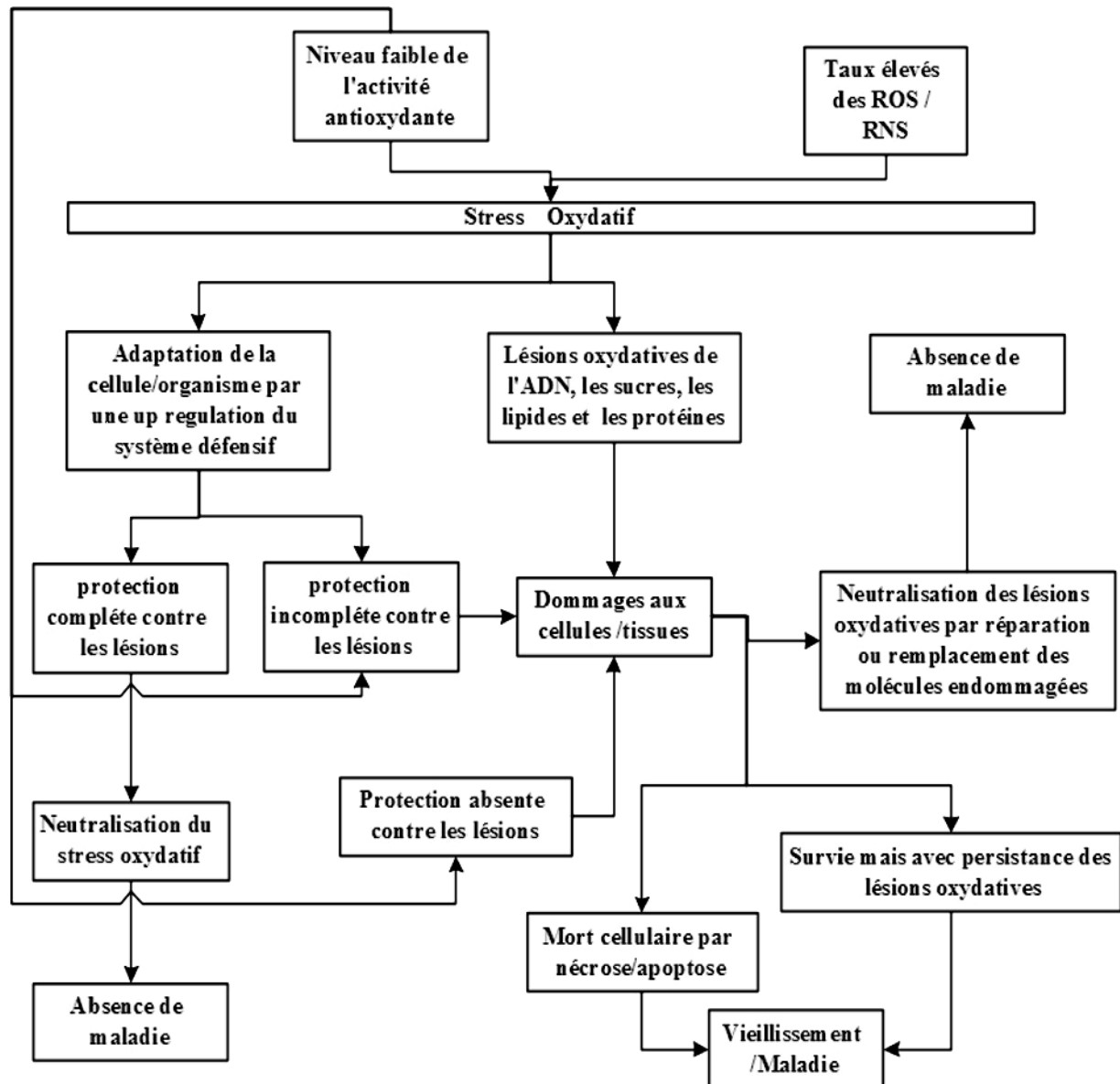


Figure 6. Les espèces réactives, le dommage oxydatif et les réponses cellulaires au stress oxydatif. (Kohen and Nyska, 2002).

1.5. Les pathologies liées au stress oxydant

Dans l'état actuel des connaissances, nous pouvons avancer les certitudes suivantes concernant le stress oxydant et les problèmes de santé qui en découlent (Gil del Valle *et al.*, 2013). L'oxydation des lipides et celle de l'ADN via la formation de dérivés toxiques de

l'oxygène sont respectivement impliquées dans le développement de maladies cardiovasculaires et du cancer (lesgards *et al.*, 2002). Le rôle du stress oxydant dans la relation syndrome métabolique – diabète de type II – maladies cardiovasculaires est de plus en plus établi (Kusano and Ferrari, 2008).

Les maladies dégénératives seraient imputables au stress oxydatif généré par les radicaux libres (Lesgards *et al.*, 2002). Par conséquent, il est de plus en plus évident que nos défenses naturelles ne suffisent plus à combattre ces ennemis. Nous observons aujourd'hui un déséquilibre en faveur des radicaux libres sur les défenses naturelles de l'organisme. Cette montée en faveur des radicaux libres explique, en partie du moins, la recrudescence des cas d'Arthrose et polyarthrite rhumatoïde (Henrotin *et al.*, 2005) et de l'Inflammation (Zafrilla *et al.*, 2002).

2. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Park *et al.*, 2001).

2.1. Les systèmes de défense antioxydants naturels.

Pour lutter efficacement contre les dommages oxydants, l'organisme est équipé de plusieurs systèmes de défense ; les systèmes de réparation (enzymes réparatrices de l'ADN), d'élimination de molécules endommagées par les ERO ou les systèmes dits de prévention empêchant la formation de radicaux libres, notamment par chélation des métaux de transition. Des protéines telles que l'albumine, la céruloplasmine (Gladston *et al.*, 1987) ou la ferritine (Cairo *et al.*, 1995) ainsi que des hormones tel que l'oestrogène (Behl, 2001 ; Green *et al.*, 2000) ou mélatonine (Reiter *et al.*, 2000) participent également, de façon indirecte, à la lutte

contre le stress oxydant. Enfin, une grande variété de molécules, désignées sous le terme d'antioxydant, assurent une protection des sites biologiques par élimination directe des molécules pro-oxydantes.

Les antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant les ERO, en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant les métaux de transition libres ou en générant du glutathion (GSH), molécule biologique antioxydante d'importance. Les antioxydants sont donc des régulateurs du taux de pro-oxydants dans l'organisme.

En biologie, les premières recherches sur les antioxydants concernent la réduction de l'oxydation des acides gras insaturés, responsable du rancissement. Cependant, ce n'est qu'avec la découverte des caroténoïdes qu'est apparue l'importance des antioxydants dans la biochimie des organismes vivants. Les recherches concernant le rôle de la vitamine E dans la limitation de l'oxydation des lipides, ont démontré par son action dans l'élimination des molécules contenant un atome d'oxygène actif avant que ces dernières n'attaquent les cellules (Herrera *et al.*, 2001).

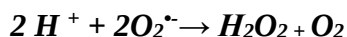
Il existe trois familles d'antioxydants : enzymatiques, moléculaires naturels et synthétiques. Pour cela, les cellules disposent de systèmes de défenses antioxydantes classées en antioxydants enzymatiques ou non-enzymatiques. Parmi ces composés, les systèmes de défense enzymatiques sont reconnus comme étant les plus performants.

2.1.1. Antioxydants enzymatiques

a. La superoxyde dismutase (SOD)

Cette métalloprotéine est classée en trois catégories, la SOD cytosolique (Cu- et Zn-dépendante), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante) et la SOD extracellulaire. La SOD est une des plus importantes enzymes cellulaires possédant une fonction antioxydante. C'est

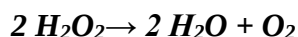
l'enzyme antioxydante "anti-O₂^{•-}" la plus importante dans toutes les cellules vasculaires car elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée. L'absence de cette enzyme peut être létale.



Le peroxyde d'hydrogène formé peut être à son tour éliminé par deux autres enzymes : la catalase et la glutathion peroxydase.

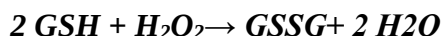
b. La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et des hépatocytes.



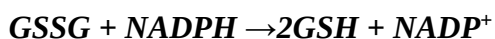
c. La glutathion peroxydase (GPX)

Les enzymes de cette famille sont Sélénium (Se)-dépendante. La glutathion peroxydase (GPX) est présente dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction des hydro peroxydes (H₂O₂) et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène.



Au contraire, la glutathion peroxydase, sélénium dépendante, possède une forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène et par conséquent, catalyse l'élimination de H₂O₂ même présent à de très faibles concentrations.

D'autres enzymes à caractère antioxydant sont également présentes dans l'organisme ; telle que, la glutathion réductase (GR) associée au NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) qui permet la régénération du glutathion réduit.



2.1.2.. Antioxydants de faible poids moléculaire

Les antioxydants de faible poids moléculaire (LMWA : low molecular weight antioxydant) sont capables de prévenir des dommages oxydatifs. Ils interviennent sur les molécules pro oxydantes de façon directe, en cédant leurs électrons aux radicaux libres, ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton.

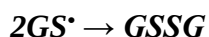
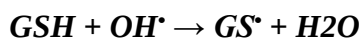
Les antioxydants piègeurs de radicaux libres (scavengers en anglais) possèdent un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Les LMWA regroupent un grand nombre des molécules hydrophiles ou lipophiles et sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques.

Néanmoins le nombre d'antioxydants produits *in vivo* est très limité ; on peut citer parmi les plus actifs : le glutathion (Masella *et al.*, 2005), le NADPH, les dipeptides (Boldyrev, 1993), l'acide urique (Ames, 1993), l'acide lipoïque (Packer *et al.*, 2001) ou la bilirubine (Stocker *et al.*, 1987). Le taux de LMWA dans l'organisme est essentiellement assuré par un apport alimentaire. Parmi les LMWA naturels les plus connus, on peut citer la vitamine C ou acide ascorbique (AA), les tocophérols (dont la Vitamine E), la vitamine A ou son précurseur le β -carotène, les thiols, les polyphénols, le zinc (Rostan, 2001) ou encore le sélénium, co-facteur de la glutathion peroxydase.

a) Thiols - Cas particulier du glutathion

Les thiols, composés contenant le groupement sulfhydrile (SH), jouent un rôle important dans la protection des systèmes biologiques contre les agressions oxydantes. Ils sont aussi impliqués dans la transduction des signaux biologiques, la régulation métabolique et l'expression des gènes. Parmi les thiols, le glutathion (GSH) est le plus abondamment présent dans le milieu intracellulaire.

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Avec son groupement sulfhydryle, il est le thiol majoritaire au niveau intracellulaire et est essentiellement présent sous forme réduite (la concentration de la forme oxydée dissulfure GSSG est au moins 10 fois plus faible). Le GSH joue son rôle d'antioxydant en tant que substrat d'enzymes antioxydantes telles que les glutathion peroxydases (GPx) (Couto *et al.*, 2013). En effet, le glutathion prévient l'oxydation des groupements thiols grâce à son pouvoir réducteur. Il doit son pouvoir antioxydant à son caractère nucléophile et radicalaire (Jump up-Hughes, 1964 ; Schols *et al.*, 1989).



2.2. Antioxydants synthétiques

Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle) sont des antioxydants synthétiques lipophiles. Le BHA et le BHT sont les plus fréquemment utilisés. Ceux-ci sont principalement employés comme conservateurs, à faible concentration, dans les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides du rancissement. Néanmoins, leur utilisation reste controversée, les produits de dégradation du BHA et du BHT étant suspectés d'être cancérogènes (Ito *et al.*, 1983 ; Chen *et al.*, 1992). De plus, dans le domaine alimentaire, des réactions d'hypersensibilité ont été recensées pour les gallates, le BHA et le BHT. Enfin, des réactions allergiques (de type urticaire) ont été observées chez certains sujets sensibles au BHA et BHT (Schrader and Cooke, 2000 ; Baur *et al.*, 2001). A ce jour, aucun texte ne mentionne ni ne réglemente l'utilisation de tels antioxydants.

3. Les composés phénoliques

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie

de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires.

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont le produit du métabolisme secondaire des plantes, ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement.

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » englobe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques. Ces molécules présentent toutes un point commun : la présence d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones (phénol) lui-même porteur d'une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH). On distingue plusieurs familles de molécules dont la structure est relativement proche.

Les polyphénols sont communément subdivisés en plusieurs groupes (**Figure 7**)

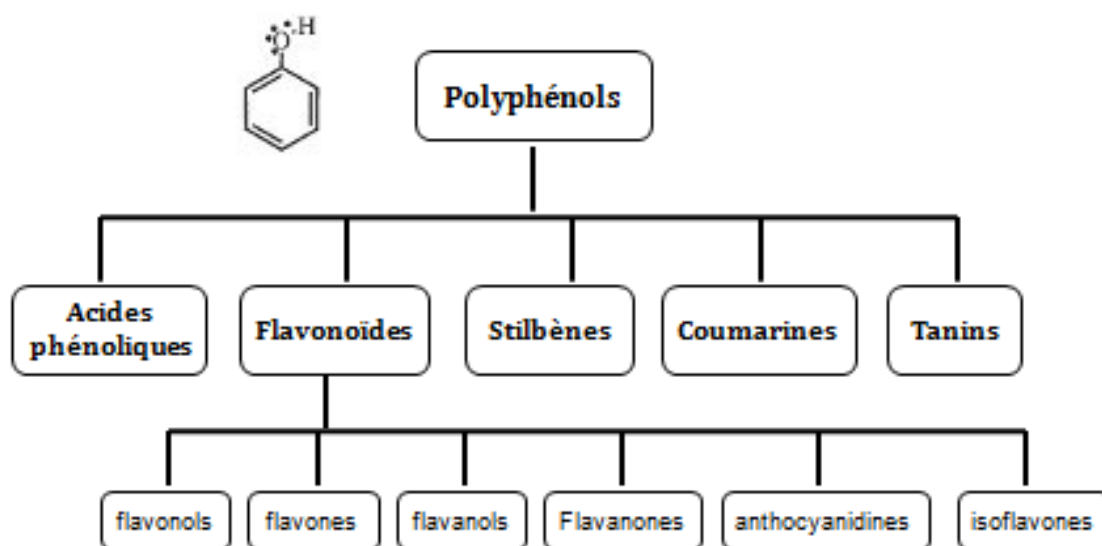


Figure 7. Classification des polyphénols (Macheix *et al.*, 2006).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta *et al.* 2005). Deux grands groupes de polyphénols feront l'objet des prochains paragraphes, les coumarines et les flavonoïdes.

Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques, ils sont doués d'activité antiallergique, anti-inflammatoire, hépatoprotective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007) (**Figure 8**).

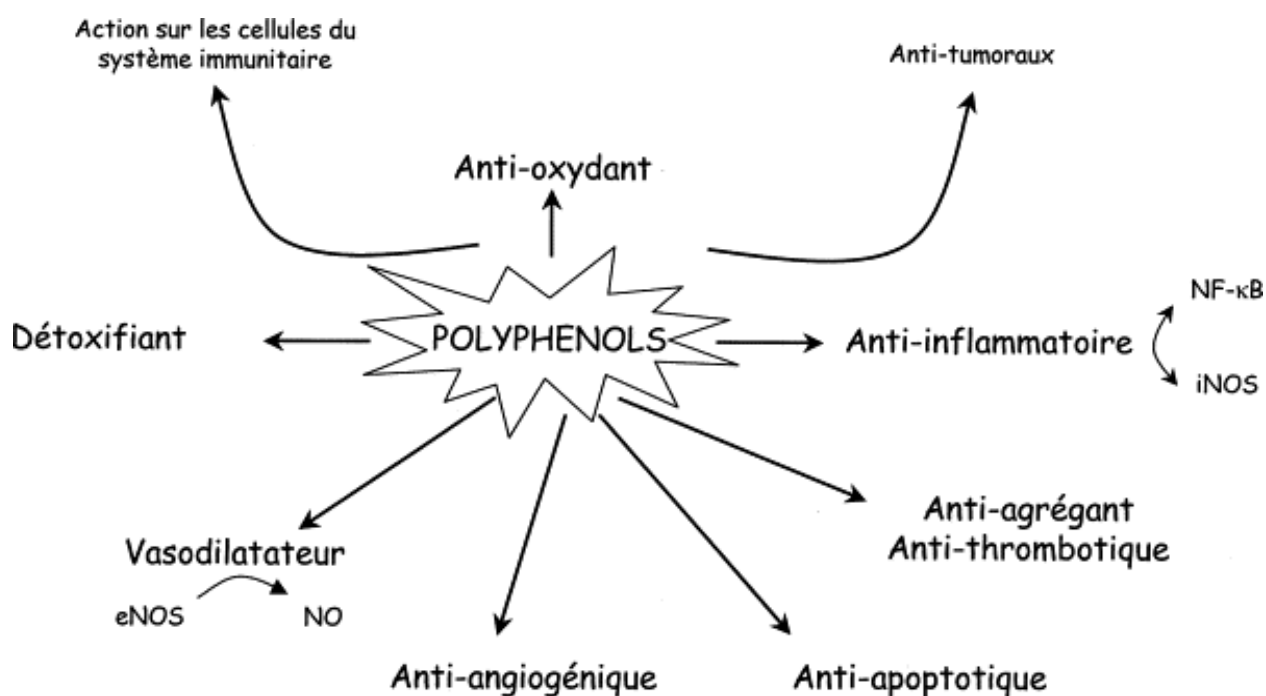


Figure 8. Activité biologique des polyphénols.

De même, les flavonoïdes pourraient être à l'origine des vertus préventives et curatives de plusieurs plantes médicinales. La principale propriété, initialement attribuée aux flavonoïdes, le rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et viraux (anti-HIV) (Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004 ; Annadurai *et al.*, 2012). Ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes et nitrites (Li *et al.*, 2011) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires (Yang *et al.*, 2012) ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker *et al.* 1996 ; Benavente-Garcia *et al.*, 1997).

3.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la grande famille des polyphénols, molécules connues pour leurs multiples activités biologiques. Leurs propriétés sont décrites dans la littérature comme antiradicalaire, anti-inflammatoire, antibactérienne, antiallergique, antivirale et stimulante des défenses immunitaires (Rice-Evans *et al.*, 1996; Svobodová *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2004).

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ils sont omniprésents dans les fruits et les légumes (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002). Plus de 6000 différents flavonoïdes ont été répertoriés et identifiés (Ferrer *et al.*, 2008), ils ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés en une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane (Yao *et al.*, 2004) (**Figure 8**).

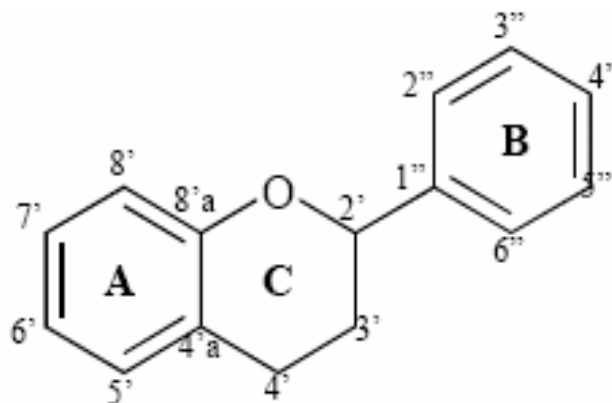


Figure 9. Structure générale du noyau des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002)

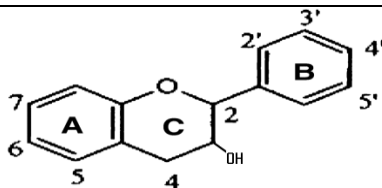
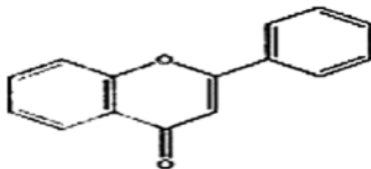
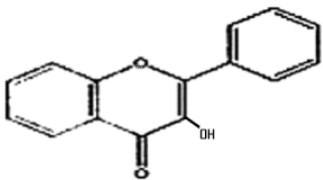
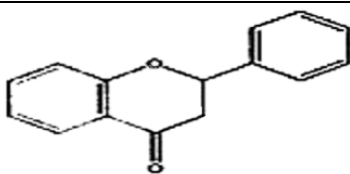
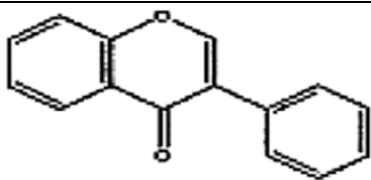
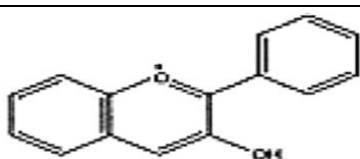
3.1.1. Classification des flavonoïdes

De point de vue structure, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituant portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus

répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim *et al.*, 2002 ; Hendrich, 2006) (**Tableau 2**).

Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituant (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres. . .) sur les deux cycles aromatiques A et B (Heim *et al.*, 2002).

Tableau 2. Classification et structure des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002).

Classe	Structure générale	Flavonoïde	Substituant
Flavanol		catéchine epicatéchine	3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH
Flavone		chrysine apigénine rutine luteoline	5, 7-OH 5, 7, 4'-OH 5, 7, 3', 4'-OH, 3-rutino 5, 7, 3', 4'-OH
Flavonole		kaempferole quercétine myricétine tamarixétine	3, 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH 3, 5, 7, 3'-OH, 4-OMe
Flavanone (dihydroflavone)		naringène naringénine taxifoline	5, 4'-OH, 7-rhamnoglucose 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH
Isoflavone		genistéine genistéine daïdzine daïdzeine	5, 4'-OH, 7-glucose 5, 7, 4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7, 4'-OH
Anthocyanidines		apigénidine cyanidine	5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 4'-OH, 3, 5-OMe

3.2. Les coumarines

Les coumarines sont le plus souvent englobées dans l'étude des flavonoïdes. Néanmoins, elles peuvent présenter certaines spécificités succinctement abordées dans cette partie.

La coumarine (1,2-benzopyrone) est un composé d'origine naturelle, étant présent dans une grande variété de plante notamment dans les racines. Environ 1620 dérivés de coumarine ont été isolés à partir de plusieurs espèces de plantes et de microorganismes (Sproll, 2008).

Les coumarines doivent leur nom de classe à « coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka, d'où la coumarine a même été isolée en 1820 par Vogel.

3.2.2. Structure et classification

Les coumarines sont caractérisées par une structure qui comporte le noyau benzo- α pyrone (coumarine), famille de molécules, qui se composent d'un noyau benzénique relié à un noyau pyrone (**Figure 10**) (Jain and Joshi, 2012).

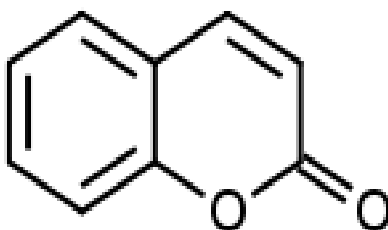


Figure 10. Structure de base de coumarine

Toutefois leurs structures restent très diverses et peuvent être classés en deux grands groupes: Coumarines simples et complexes à ce dernier un noyau furanne ou pyranne est associé au noyau benzo α pyrone (Floc'h *et al.*, 2002 ; Smyth *et al.*, 2009).

a. Les coumarines simples

Ce sont celles qui possèdent des substituants dans le cycle benzénique. Elles peuvent être des dérivés hydroxylés, méthoxylés, alkylés, alcoxylés et glycosylés de la molécule mère (Lake, 1999) (**Figure 11**).

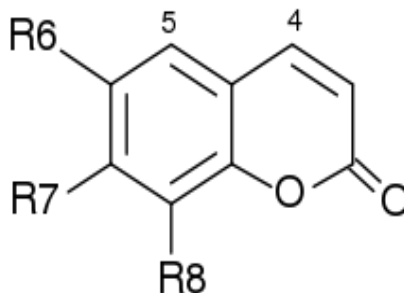


Figure 11. Coumarine simple

b. Coumarines complexes

- **les furocoumarines** (ou furanocoumarines) qui constituent une classe de molécules diversifiée chimiquement. Il existe deux types de furanocoumarines en fonction de la position du noyau furane sur l'hétérocycle coumarine. Le premier groupe est celui des furanocoumarines linéaires qui comprend le psoralène et ses dérivés. Le second, celui des furanocoumarines angulaires, comprend l'angélicine et ses dérivés (**Figure 12**).

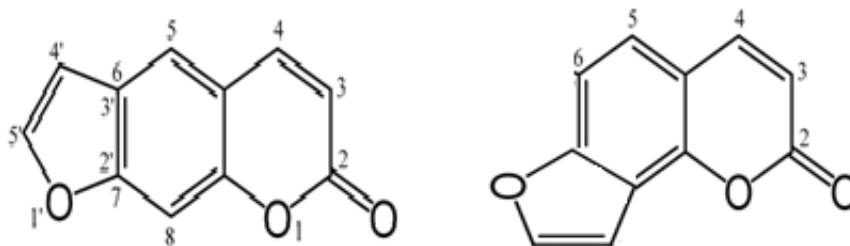


Figure 12. Structure chimique d'un furanocoumarine (Smyth *et al.*, 2009).

- **Les pyranocoumarines (ou pyranocoumarines)** composés formés par la fusion d'un hétérocycle pyrane avec la coumarine (**Figure 13**), soit dans le prolongement (forme linéaire) : xanthylétine ou latéralement (forme angulaire) : visnadine.

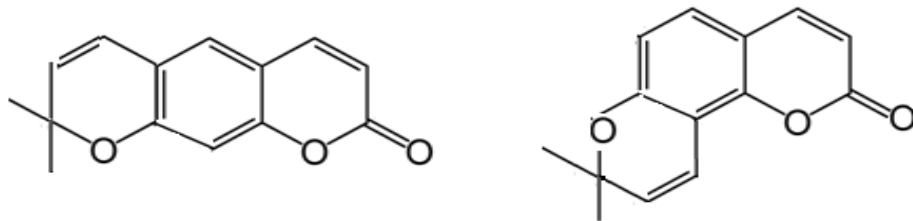


Figure 13. Structure d'un pyranocoumarine (Smyth *et al.*, 2009).

3.2.3. Biosynthèse d'un exemple de furanocoumarine

Le psoralène est produit à partir des coumarines, en particulier l'ombelliférone par la voie métabolique des furanocoumarines linéaires. La biosynthèse fait suite à la voie des phénylpropanoïdes (ou du shikimate) produisant l'acide cinnamique à partir de la phénylalanine, cette réaction est suivie par une série d'hydroxylation et lactonisation catalysée par l'enzyme marmésine synthase formant la marmésine, suivie d'une seconde hydroxylation avec départ d'acétone catalysée par la psoralène synthase formant le psoralène (Bourgau *et al.*, 2006) (**Figure 14**).

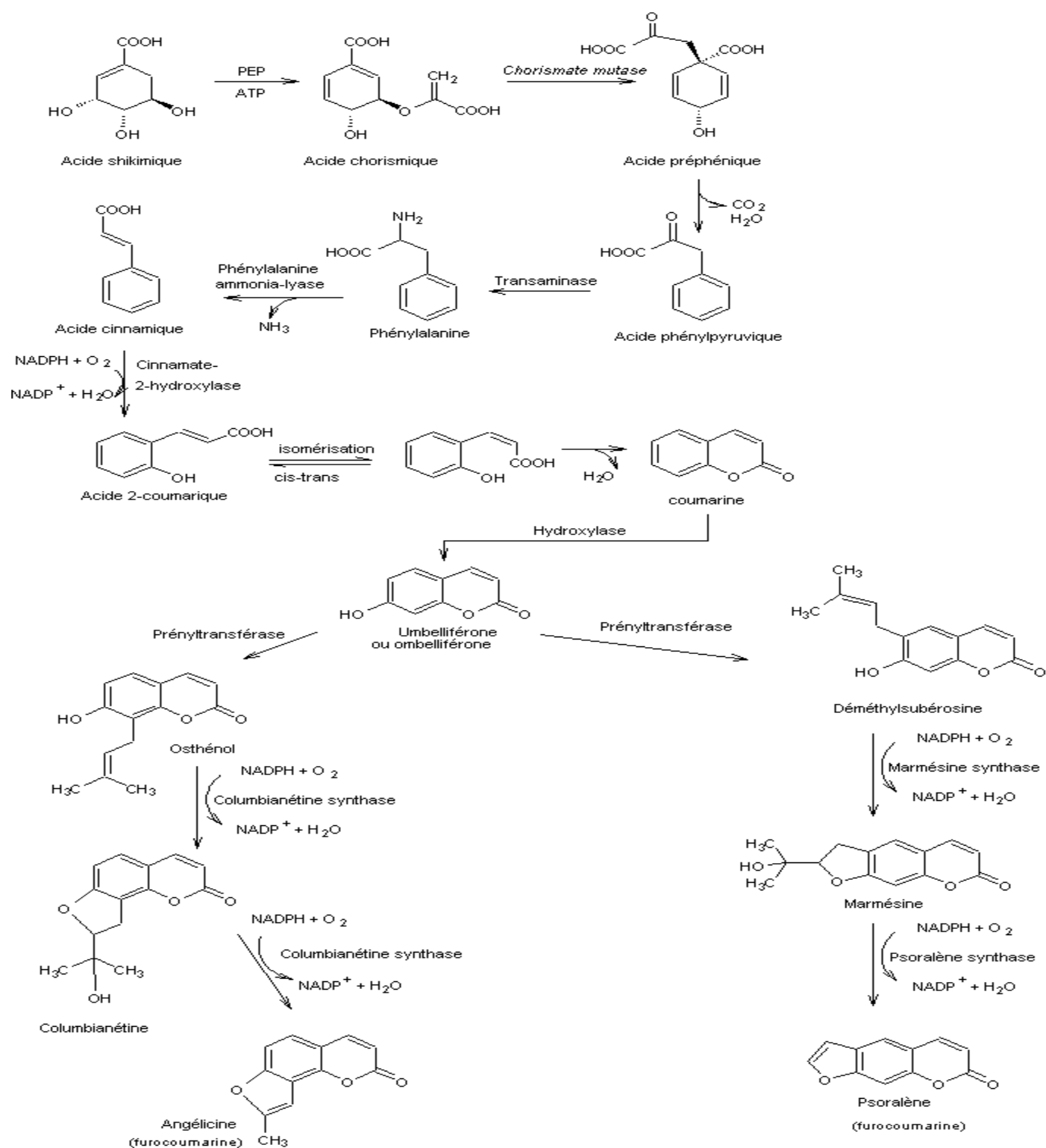


Figure 14. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des furanocoumarines.

3.2.4. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des coumarines

les coumarines ont fait l'objet de recherches actives lors des dernières années (Karamat *et al.*, 2012 ; Bajerovala *et al.*, 2014) en raison de leur grande activité pharmacologique. Elles manifestent diverses activités: anti-agrégation plaquettaire, anti-

inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique (Hoult and Payd, 1996 ; Khan *et al.*, 2005 ; Stefanova *et al.*, 2007 ; Thati *et al.*, 2007). Les coumarines ont un pouvoir cytotoxique pouvant s'avérer intéressant dans le cas de traitement anticancer (Kostova, 2005). En effet, il est apparu que la cytotoxicité des coumarines est dépendante de la cellule ciblée. De part leur propriété chélatante, antioxydante et anticoagulante, les coumarines apparaissent comme les molécules potentiellement cytotoxiques à intérêt thérapeutiques (Kostova, 2005). De même, ces molécules sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxydes (Anderson *et al.*, 1996 ; Hu *et al.*, 2005). Les coumarines se révèlent être des composés thérapeutiquement promoteurs dans l'amélioration du système immunitaire (action immunostimulante) : l'administration de la coumarine et de l'umbelliférone par des malades atteints de cancers ou de brucellose à raison de 100 mg par jour a provoqué une augmentation des lymphocytes T Helper dans la circulation sanguine (Stefanova *et al.*, 2007).

Concernant l'activité antibactérienne, les coumarines sont efficaces contre les bactéries à Gram positif (Cottiglia *et al.*, 2001 ; Khan *et al.*, 2005).

Par ailleurs, des chercheurs espagnols ont évalué l'activité anti-VIH de onze composés dérivés de la 4-phenyl coumarine isolés de l'espèce *Marila pluricostata* (Redoyal *et al.*, 2005). Il convient d'ajouter que les furanocoumarines sont impliqués dans bien d'autres mécanismes biologiques et qui constituent des pistes de recherches pour le traitement de maladies comme la sclérose en plaque et la dépression (Jain and Joshi, 2012).

3.2.5. Relation entre structure et activité biologique

Le mode d'action des coumarines sont similaires à ceux rapportés pour les flavonoïdes, toutes fois l'impact structurale sur leurs activités est différent (**Tableau 3**). Les différents substituant dans le noyau coumarine influencent fortement l'activité biologique des dérivés qui en résulte.

Kaneko et ses collaborateurs (2003) et Zhang et Wang (2004) ont étudié en particulier l'influence de la structure des coumarines sur leur activité antiradicalaire. Ils ont mis en évidence que la structure caractéristique des coumarines, c'est-à-dire la 1,2 pyrone, affecte peu l'activité antioxydante de ces molécules. Par contre, la présence d'une fonction catéchole a un rôle important pour les propriétés antiradicalaire.

Tableau 3. Effet de la structure sur les activités antioxydantes, inhibitrice d'enzyme et cytotoxique des coumarines (Kaneko *et al.*, 2003 ; Zhang and Wang, 2004).

Activité	Facteurs accroissant l'activité
antiradicalaire	Nombre de groupements OH libres Présence d'une partie catéchole
Inhibition de la xanthine oxydase	Absence de groupement en C5 Présence de la double liaison C4-C3 Groupements OH libres en C7, C6 La petite taille des groupements substituant la position C4
Cytotoxique	Présence d'une partie catéchole 2 groupements phénoliques en position 6,7 ou en 6,8

3.2.6. Toxicité des coumarines

La coumarine n'est pas toxique en soi, cependant, elle peut être convertie par les champignons, en une toxine le dicoumarol qui est typiquement présent dans le foin moisi ; chez le bétail, le dicoumarol provoque des hémorragies fatales en inhibant la vitamine K qui est un facteur de coagulation du sang (Repcak *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2005).

Chez l'homme la consommation des espèces végétales qui renferment des furanocoumarines linéaires ou angulaires provoque, s'il est accompagné d'une exposition à la lumière solaire, une dermite phototoxique d'intensité variable allant du simple érythème jusqu'à l'apparition de bulles et de vésicules au niveau des zones exposées, quelques jours

après le contact, les zones touchées présentent une hyperpigmentation (Marrot and Meunier, 2008). Les furanocoumarines linéaires peuvent être le support de cycloaddition avec les bases pyrimidiques de l'ADN ou de l'ARN, la duplication des brins est alors bloquée ainsi que la traduction de l'ARN. Cette propriété est souvent évoquée pour expliquer les caractères mutagènes et carcinogènes de ces molécules (Lake, 1999).

4. La xanthine oxydoréductase (XOR)

La XOR existe sous deux formes interconvertibles, la xanthine déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.204) et la xanthine oxydase (XO) (EC 1.1.3.22) (Stirpe et Della Corte, 1969). La xanthine déshydrogénase est la forme de l'enzyme à l'état physiologique normal, sous conditions ischémiques sa configuration change en XO. Les deux formes catalysent la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique (Hille et Nishino, 1995), selon la réaction suivante (**Figure 15**).

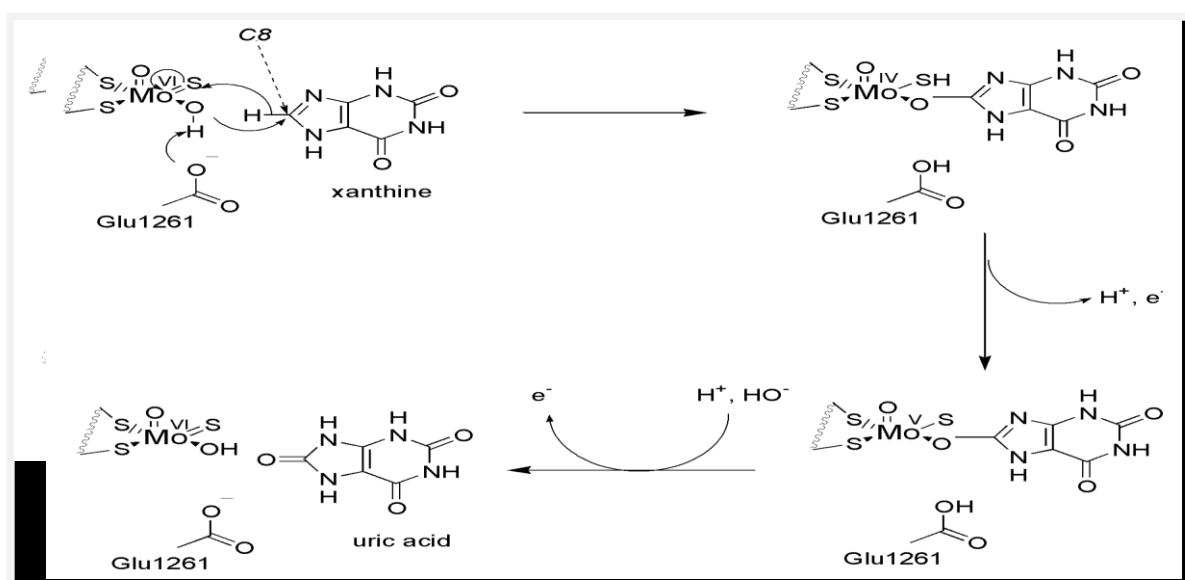
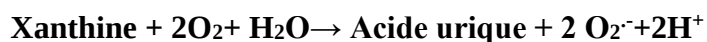


Figure 15. Mécanisme catalytique au niveau du site actif (molybdène) de la XOR en produisant l'acide urique à partir de la xanthine.

Cette réaction s'accompagne de la génération des ERO, $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 à partir du dioxygène. La voie de la xanthine oxydase est importante dans les processus d'oxydation des tissus, particulièrement après une ischémie-reperfusion (Sanhueza *et al.*, 1992).

La XOR est un métalloflavoenzyme présent dans le lait de vache à des concentrations élevées et d'où elle a été purifiée il y'a plus de 60 ans, elle reste la principale source de cette enzyme la mieux étudiée (Massey and Harris, 1997).

Chez les mammifères, l'activité de la XOR est largement distribuée dans tous les tissus avec un niveau plus élevé au niveau du foie et de l'intestin. Chez l'être humain, en dehors du foie et de l'intestin, la plupart des tissus montrent peu d'activité de la XOR (Saksela *et al.*, 1998).

4.1. Structure

La structure du locus génétique codant pour la XOR humaine a été élucidée et les gènes ont été attribués à des chromosomes 2p22 (Xu *et al.*, 1996). Ces gènes de mammifères contiennent des exons 36 et la structure exon- intron est fortement conservée.

Une structure primaire comprenant deux sous unités identiques dont chacune contient quatre centres redox, un molybdène (Mo- Co), un dinucléotide flavine adénine (FAD) et deux centres Fe / S, Le Mo -Co est le site de l'oxydation des purines en NAD^+ et la réduction O_2 se produit au niveau du FAD. Les deux groupes Fe /S fournissent le conduit pour le flux d'électrons entre le Mo -Co et le FAD (Enroth *et al.*, 2000) (**Figure 16**).

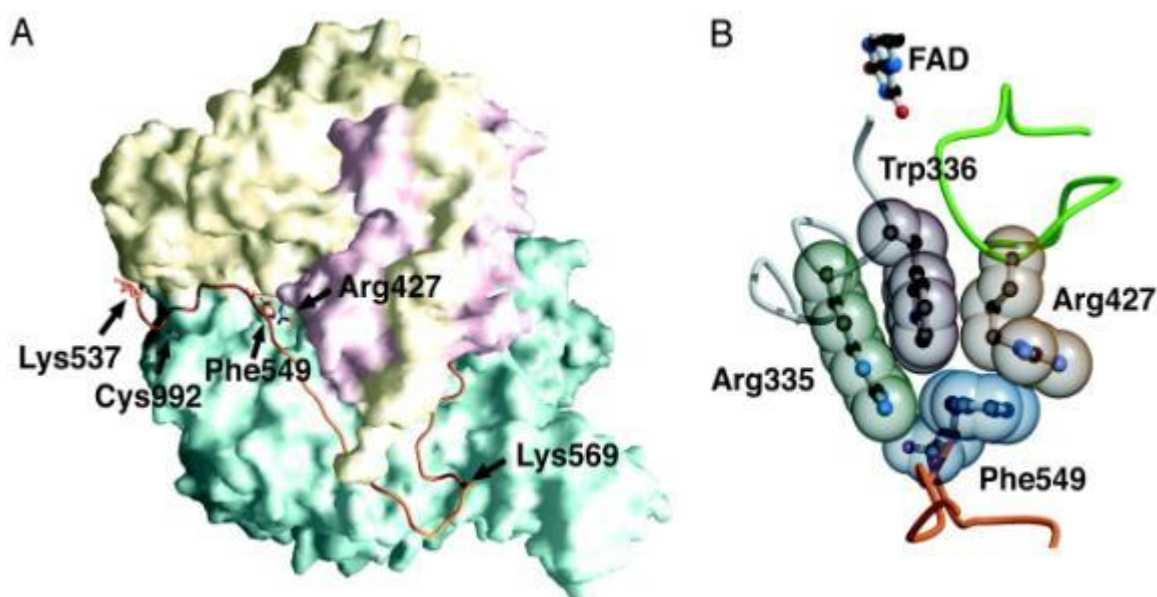


Figure 16. Structure de l'enzyme xanthine oxydoréductase. **A :** la surface moléculaire du monomère XDH divisé en trois domaines principaux. Les domaines sont le fer / soufre centre (résidus 3-165; rouges), DCP (résidus 226-531; jaune), et Mo-pt (résidus 590-1,331; bleu). L'éditeur de liens reliant le domaine de DCP avec le domaine Mo-pt (résidus 537 à 589) est représenté en orange. Les positions de Cys-992 et Lys-537, l'une encore visible dans la carte de densité d'électrons et les plus proches de Cys-535, sont présentés comme un modèle de bâton. Les positions de Lys-551 et Lys-569, responsable de la protéolyse, sont également indiqués. Les positions de Phe-549, qui est situé sur le segment de liaison reliant le domaine de Mo et de DCP, et Arg-427, qui est situé sur la boucle de glissement, sont représentées comme des modèles de bâton. **B :** l'espace de remplissage modèle des résidus de munitions importantes sous la forme de XDH qui sont impliqués dans la conversion XDH / XO.

4.2. Fonctions de la XO

Pendant de nombreuses décennies, la XOR est présumée être l'enzyme intervenant dans le catabolisme des purines, mais plus de preuves suggère un rôle biologique beaucoup plus large pour cette enzyme. La XOR possède des propriétés antimicrobiennes, car elle inhibe la croissance des bactéries *in vitro* (Hancock *et al.* 2002). Il est également décelé que la XOR joue un rôle antimicrobien *in vivo*, les nourrissons qui reçoivent du lait maternel riche en XOR sont moins susceptibles de développer une gastro-entérite que ceux qui sont nourris au lait maternisé (Stevens *et al.*, 2000).

En dépit de plusieurs années de recherche, les fonctions physiologiques de la XO sont restées mal caractérisées. L'objectif principal de la XO n'est pas de générer des oxydants

cytotoxiques, mais plutôt de participer à divers processus physiologiques, toute fois la XO peut produire en parallèle la formation d'un excès d'oxydants et entraîner des dommages cellulaires et tissulaires ; Le dysfonctionnement de protéines causé par le peroxynitrite généré a été impliqué dans la physiopathologie de plusieurs maladies cardiovasculaires, y compris la myocardite auto-immune, l'hypertension et l'insuffisance cardiaque (Turco et Murad, 2002 ; Naoghare *et al.*, 2010), la XOR est aussi impliquée dans les maladies inflammatoires et les lésions ischémiques (Pasher *et al.*, 2006).

4.3. Inhibiteurs de la XO

L'allopurinol a été approuvé par la Food and Drug Administration en 1966 pour le traitement de la goutte et demeure une pierre angulaire dans le traitement de l'hyperuricémie (Wortmann , 2005) . Toutefois, l'allopurinol comme tout médicament, n'est pas épargné des effets secondaires indésirables dont les plus fréquents sont les troubles gastro-intestinaux, des réactions d'hypersensibilité, une éruption cutanée et des symptômes de toxicité. Comme une drogue dans sa propre ligue, qui avait pratiquement pas de concurrents dans l'utilisation clinique d'un demi-siècle, est sur le point de changer. Ces dernières années, on s'est penché sur la recherche de nouveaux produits naturels extraits de plantes utilisés en médecine traditionnelle et qui pourraient représenter une « révolution » pour le traitement de la goutte (Saiful *et al.*, 2012).

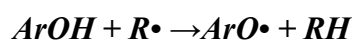
La Quercétine et la silibine ont montré une importante activité inhibitrice de la XO, conduisant par conséquent à une réduction des dommages oxydatifs (Chang *et al.*, 1993; Shoskes, 1998). Cos *et al.*, 1998 ont étudié la relation entre la structure des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la xanthine oxydase, une similarité structurale et du cycle purique de la xanthine et du cycle A des flavonoïdes a été mise en évidence par Da Silva et ses collaborateurs (2004).

5. Evaluation de l'activité antioxydante

Les principaux oxydants dans les milieux biologiques sont les radicaux libres et les métaux de transition. Les polyphénols désactivent les radicaux libres *via* trois mécanismes (Leopoldini *et al.*, 2011).

5.1. Transfert d'atome d'hydrogène (*HAT, hydrogen atom transfer*)

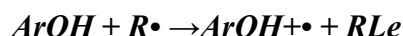
L'antioxydant phénolique agit avec le radical libre par transfert d'un atome d'hydrogène *via* la rupture homolytique de la liaison O-H.



Les produits de cette réaction sont la forme réduite (RH) du radical néfaste et le radical $ArO\bullet$ (forme oxydée de l'antioxydant). Bien que cette réaction donne naissance à un autre radical libre, celui-ci est moins réactif.

5.2. Transfert mono-électronique d'électron (*SET, single electron transfer*)

Dans ce mécanisme, un électron est transféré au radical libre $R\bullet$. L'anion R^- et le cation radical $ArOH^{+\bullet}$ ainsi formés sont généralement des entités stables.

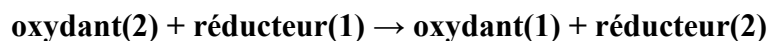


Le potentiel d'ionisation est le facteur déterminant du pouvoir piègeur d'électrons. Un potentiel bas implique un arrachement facile d'électron et en conséquence une réaction avec le radical libre.

5.3. La réaction d'oxydoréduction

Une réaction d'oxydoréduction est une réaction chimique au cours de laquelle se produit un transfert d'électrons pouvant s'accompagner par un transfert de protons. L'espèce chimique qui

capte les électrons est appelée « oxydant » ; celle qui les cède, « réducteur ». Donc, le réducteur s'oxyde (réaction d'oxydation), l'oxydant se réduit (réaction de réduction).



Ces notions sont d'une importance majeure, un antioxydant phénolique est un réducteur par définition, cela signifie que si sa forme oxydée n'est pas stabilisée, elle pourra engendrer une oxydation par la suite (prooxydant) (Quideau et *al.*, 2011).

Des études ont montré qu'une association d'une faible concentration d'AAPH (2,2'-azobis-(2-amidino propane) hydrochloride) et d'une forte concentration de tocophérol (α -TocH, dont la vitamine E) en absence d'un autre antioxydant va stimuler la formation du radical α -TocH $\cdot$. Le dernier initiera une propagation additionnelle de l'oxydation des LDLs, appelée tocopherol-mediated peroxidation (Zai-Qun et *al.*, 2006).

6. la plante *Tamus communis* L.

Le Tamier commun est un géophyte, c'est-à-dire subsistant, durant la mauvaise saison, grâce à son organe souterrain, un rhizome tubéreux.

6.1. Noms vernaculaire

Un grand nombre de ces dénominations ne sont souvent que des adaptations ou des traductions d'une langue à l'autre, ou même des emprunts de mots utilisés pour d'autres plantes. Nom latin : *Tamus communis* L., synonymes *Tamus baccifera*, *Tamus cordifolia*, *Tamus cretica* L., *Tamus racemosa*, *Dioscorea communis*. En langage usuel est dénommée El-Karma saouda, *en anglais*: black bryony, lady seal, murain berry, beaten woman's herb, wild wine et *en français*: tamier, taminier, herbe aux femmes battues, sceau de Notre Dame, sceau de la Vierge, vigne noire (vite nera en italien), haut liseron, raisin du diable.

6.2. Classification systématique

Classification systématique de *Tamus communis* selon (Caddick et *al.*, 2002)

Règne : *Plantae*,

Embranchement : *Spermatophytae*,

Sous-embranchement : *Angiospermae*,

Classe : *Monocotylédoneae*,

Ordre : *Liliales*,

Famille : *Dioscoreaceae*,

Genre : *Tamus*,

Espèce : *Tamus communis* L.

6.3. Description botanique

C'est une plante grimpante et décorative répandue dans les bois, les haies et les buissons de la plus grande partie de notre flore. Ses tiges grêles grimpantes et volubiles pouvant atteindre trois mètres de longueur, qui s'enroulent autour d'un support dans le sens des aiguilles d'une montre (**Figure 17A**). Elle fleurit en mars et en avril. Les fleurs verdâtres du tamier sont petites et réunies en grappes (**Figure 17B**). Les sexes sont séparés (plante dioïque), on distinguera : (1) des pieds males aux fleurs en grappes lâches, charnue riches de ses 6 étamines ; (2) des pieds femelles, aux fleurs pourvues de 3 carpelles, à l'origine d'une baie subsphérique. Les feuilles (**Figure 17C**) alternes, pétiolées, luisantes, sont en forme de cœur pointu, généralement lisses et brillantes comme si elles avaient été vernies. Les fruits sont de petites baies arrondies, rouges, brillantes à maturité et luisantes, juteuses et de 12 mm de diamètre (**Figure 17D**). Racines (rhizomes) (**Figure 17E**) sont grosses dont la tige souterraine noirâtre enfoncée verticalement dans le sol; celle-ci produit tous les ans à sa base des bourgeons qui donnent naissance à de nouvelles tiges aériennes. Plus ou moins en forme de navet, atteignent une longueur de 20 à 30 cm et une épaisseur de 5 à 10 cm ; elles renferment des matières féculentes ainsi qu'une quantité considérable d'oxalate de chaux qu'est le principe

actif de son emploi en médecine populaire. Chez quelques espèces de *Dioscorea* exotiques, connues sous le nom d'igname, les rhizomes, d'un poids pouvant aller jusqu'à 15kg, sont un aliment de base dans quelques pays (*D. globosa* de l'Inde et *D. batatas*, l'igname de Chine) ; leur consommation n'est possible qu'après la cuisson qui détruit les substances nocives (Boullard, 2003).

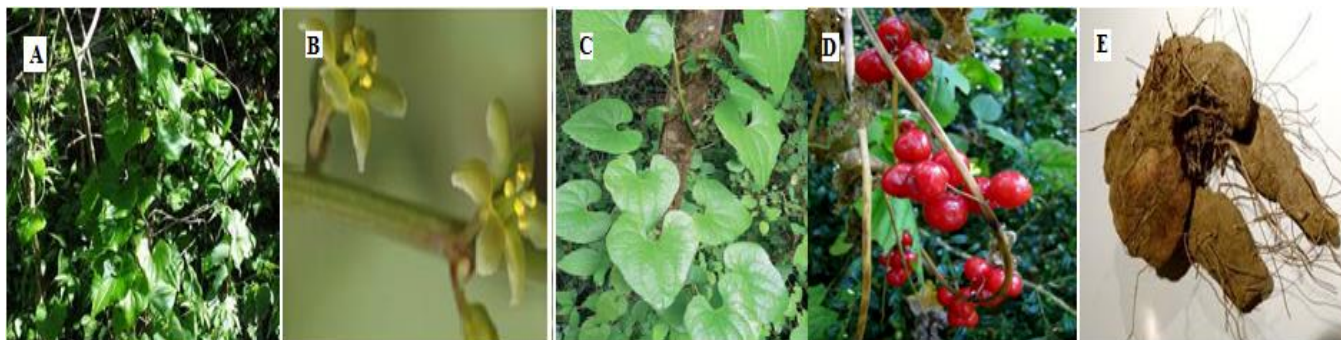


Figure 17. Les différentes parties de la plante *Tamus communis* L.

6.4. Distribution géographique

Le tamier commun vie dans différents endroits ou se croit sous forme de rangés d'arbustes. On les rencontre particulièrement dans les forêts montagneuses d'hauteur 1600m. Seulement quatre espèces de la famille Dioscoreaceae sont natales en Europe. *Dioscorea balcanica* Kusanin, *Borderea pyreniaca* Miegville, *Borderea chouardii* (Gausen) Heslot et *Tamus communis* L. Les espèces *Dioscorea* et *Borderea* sont endémiques dans la péninsule Balkanique et les Pyrénées, alors que *T.communis* affiche une plus large distribution dans la Grande – Bretagne, l'Europe Sud, Central sud et Ouest, comme on peut trouver le *Tamus communis* L. dans l'Asie (Iran), dans le Sud Ouest d'Afrique et en Afrique du nord. En ce qui concerne le Maroc et l'Algérie, on la rencontre dans le Tell et les hautes buttes (Maire ,1959).

6.5. Propriétés d'utilisation traditionnelles et médicales

Le Tamier est dans son ensemble un gros rhizome noirâtre contient un lait astringent (oxalates de calcium) qui peut provoquer des dermatites de contact (Schmidt and Moul, 1983). La pulpe était autrefois prescrite comme purgatif et diurétique, est principalement utilisée pour

ses propriétés antinévralgiques en usage externe sous forme de cataplasme (racine cuite) pour traiter les hématomes et les ecchymoses, d'où son nom vernaculaire d'herbe aux femmes battues (Boulard, 2003).

Les racines sont douées d'activité diurétique, hémolytique, émétique, cathartique et rubéfiante. Elle est même recommandée dans le traitement de la coqueluche, bronchite et contusions. Les rhizomes et tubercules sont utilisés en médecine folklorique comme rubéfiant, dans le traitement du rhumatisme, arthrose, lumbago et dermatose (Leporatti and Ivancheva, 2003).

Les fruits de *Tamus communis* doués d'activité anti-inflammatoire, ils sont frottés sur la peau pour soulager les douleurs arthritiques et rhumatismales (Guarrera et Leporatti ,2007). La racine fraîche grattée à une pâte et appliquées sous la forme d'un cataplasme pour traiter la goutte, les rhumatismes et la paralysie (Boullard ,2003).

D'autres part, les différentes parties de la plante sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des tumeurs et polypes (Kova'cs et *al.*, 2007).

6.6. Données phytochimiques

Les investigations phytochimiques réalisées sur *T. communis* ont indiqué la présence de nombreux composants tels que : spirostanes, furostanes, glycosides, stérols (les plus importants identifiés sont : β -sitostérol, stigmastérol, campestérol), caroténoïdes et substitués hydroxy/alkoxyphénanthrènes (Goodwin, 1955 ; Reisch et *al.* , 1972).

Cette espèce renferme ainsi des cristaux d'oxalate de calcium, des histamines (Schmidt and Moul, 1983) et des flavonoïdes telles que : la diosgénine (Capasso et *al.*, 1983).

Les principes actifs seraient surtout les phénanthrènes et les saponosides dérivés de la diosgénine, qui sont responsables de plusieurs effets biologiques (Guarrera et Leporatti, 2007). Douze différents composés (7 flavonols et 5 flavones) ont été caractérisés par HPLC (Al-

Khateeb *et al.*, 2012). D'autres flavonoïdes ont été découverts par Shaheen et ses collaborateurs (2009) kaempferol-3,4'-di-O- α -L-rhamnopyranoside (1) et trois flavonoïdes connus, kaempférol-4'-O- α -L-rhamnopyranoside (2), kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside (3), et serpyllin (4), qui ont été isolées pour la première fois à partir de cette plante. Les phénanthrènes et leurs dérivés ont été également isolés des extraits de rhizomes de *T.communis*, cas du 3-hydroxy-2,4-diméthoxy-7,8-méthylenedioxyphénanthrène et du 2,7-dihydroxy-1-méthyl-5-vinylphenanthrene (Aquino *et al.*, 1985 ; Dellagrecia *et al.*, 2002 ; Kova'cs *et al.*, 2007).

6.7. Données pharmacologiques

Des études ont démontré que des extraits de rhizomes de *T.communis* contiennent des glycosides stéroïdiens et phénanthrènes ayant un potentiel cytotoxique, anticancéreux, antiviraux antimicrobiens et anti-inflammatoires (Kova'cs *et al.*, 2007 ; Al-Khateeb *et al.*, 2012).

6.8. Données toxicologiques

Les grands tubercules de *T.communis* peuvent provoquer une irritation une fois frottée sur la peau. La plante bénéficie d'une réputation, totalement usurpée, d'action curatrice des ecchymoses ; cet usage est à proscrire formellement, les risques de dermatites étant bien supérieurs aux bénéfices attendus (Schmidt and Moul, 1983).

Les analyses chimiques ont montré la présence d'histamine dans le mucilage de rhizome de *T.communis*, ce qui peut contribuer à des réactions de dermatite de contact chez l'homme (Capasso *et al.*, 1983). En outre, les glycosides stéroïdes et les phénanthrènes isolés des rhizomes de *T.communis* suggèrent que ces éléments exercent une activité cytotoxique chez les animaux de laboratoire, mais leurs effets sur l'homme ne sont pas encore connus (Kova'cs *et al.*, 2007). La racine, dont la pulpe est rubéfiante et vésicante provoque des ampoules sur la peau.

Partie II

Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

La plante a été récoltée le mois de mai 2011 et a constitué le matériel biologique de notre étude. L'espèce a été authentifiée par le professeur Oudjhih B., botaniste à l'Université de Batna, Algérie. Les racines sont soigneusement lavées à l'eau courante puis mis à sécher au laboratoire, à l'abri de la lumière solaire directe et de la poussière. Elles sont ensuite broyées finement et conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité.

1.2. Choix des animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris mâles, *Swiss albinos* de 25 à 30g, procurées aux prés de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux sont hébergés dans des cages de polypropylène, elles ont accès libre à l'eau et à l'aliment issu de l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

2. Méthodes

2.1. Procédure d'extraction

Les racines de la plante sont coupées en petit morceaux, puis broyées afin d'obtenir une poudre. La poudre obtenue (2Kg) est mise à macérer dans 10 litres de mélange, méthanol/eau (85 %) pendant 5 jours à la température du laboratoire. Le macéra est filtré à travers le papier Wattman N°4. Ensuite les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif (BÜCHI), l'extrait obtenu est séché puis stocké à température de 4°C jusqu'à son utilisation.

2.2. Screening phytochimique partiel

Les différents groupes de composés (polyphénols, flavonoïdes, tannins et saponines) contenus dans l'extraits des racines de Tc ont été mis en évidence selon les méthodes décrites par Békro et ses collaborateurs (2007).

2.2.1. Les polyphénols

Pour mettre en évidence la présence des polyphénols, la réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a été utilisée. Ainsi à 2 ml de solution de l'extrait brut, est ajoutée une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. Le chlorure ferrique provoque en présence de dérivés polyphénoliques l'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée. La solution alcoolique d'acide gallique est utilisée comme témoin.

2.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont mis en évidence selon la réaction dite "la cyanidine". Deux (2) ml de l'extrait brut (EBr) ont été évaporés et le résidu a été repris dans 5 ml d'alcool chlorhydrique dilué 2 fois. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, il se dégage de la chaleur puis une coloration rose-orangée ou violacée apparaît. L'addition de 3 gouttes d'alcool isoamylique a intensifié cette coloration qui a confirmé la présence de flavonoïdes. Une solution alcoolique de quercétine a été utilisée pour servir de témoin.

2.2.3. Les tannins

Les tannins catéchiques sont identifiés par le réactif de STIASNY (Formol 30%, HCl concentré : 1/0,5). Cinq (5) ml de l'EBr ont été évaporés à sec. Après ajout de 15 ml du réactif de STIASNY au résidu, le mélange a été maintenu au bain- marie à 80 °C pendant 30 min. L'apparition d'un précipité en gros flocons caractérise les tanins catéchiques

Les tannins galliques sont identifiés par ajout de FeCl_3 . En effet, nous avons filtré la solution précédente. Le filtrat est recueilli et saturé d'acétate de sodium. L'addition de 3 gouttes de FeCl_3 à 2% provoque l'apparition d'une coloration bleu-noir intense dénotant la présence de tanins galliques. Une solution alcoolique d'acide gallique ou de catéchine est utilisée pour servir de témoin.

2.2.4. Les saponines

Pour mettre en évidence les saponines, nous avons introduit 10 ml de l'extrait dans un tube à essai. Le tube est agité pendant 15 secondes puis laissé au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponines.

2.3. Méthodes chromatographiques analytiques

Les 169g d'extrait obtenus des racines de *T.communis* (EBr), sont séparés en deux fractions l'une soluble dans le méthanol, la deuxième insoluble dans ce dernier. La fraction soluble dans le méthanol (138g) est soumise à une chromatographie sur colonne, le gel de silice (70–230 mesh, Merck, Switzerland) étant utilisé comme phase stationnaire. La colonne est éluée avec du chloroforme puis avec le mélange chloroforme/ méthanol de polarité croissante. Au total, 52 fractions (400 ml chacune) sont collectées et rassemblées selon leur profil sur CCM en six sous fractions (FI-FVI), elles sont ensuite séchées et lyophilisées. Les six différentes fractions ont fait l'objet de notre travail (**Figure 18**).

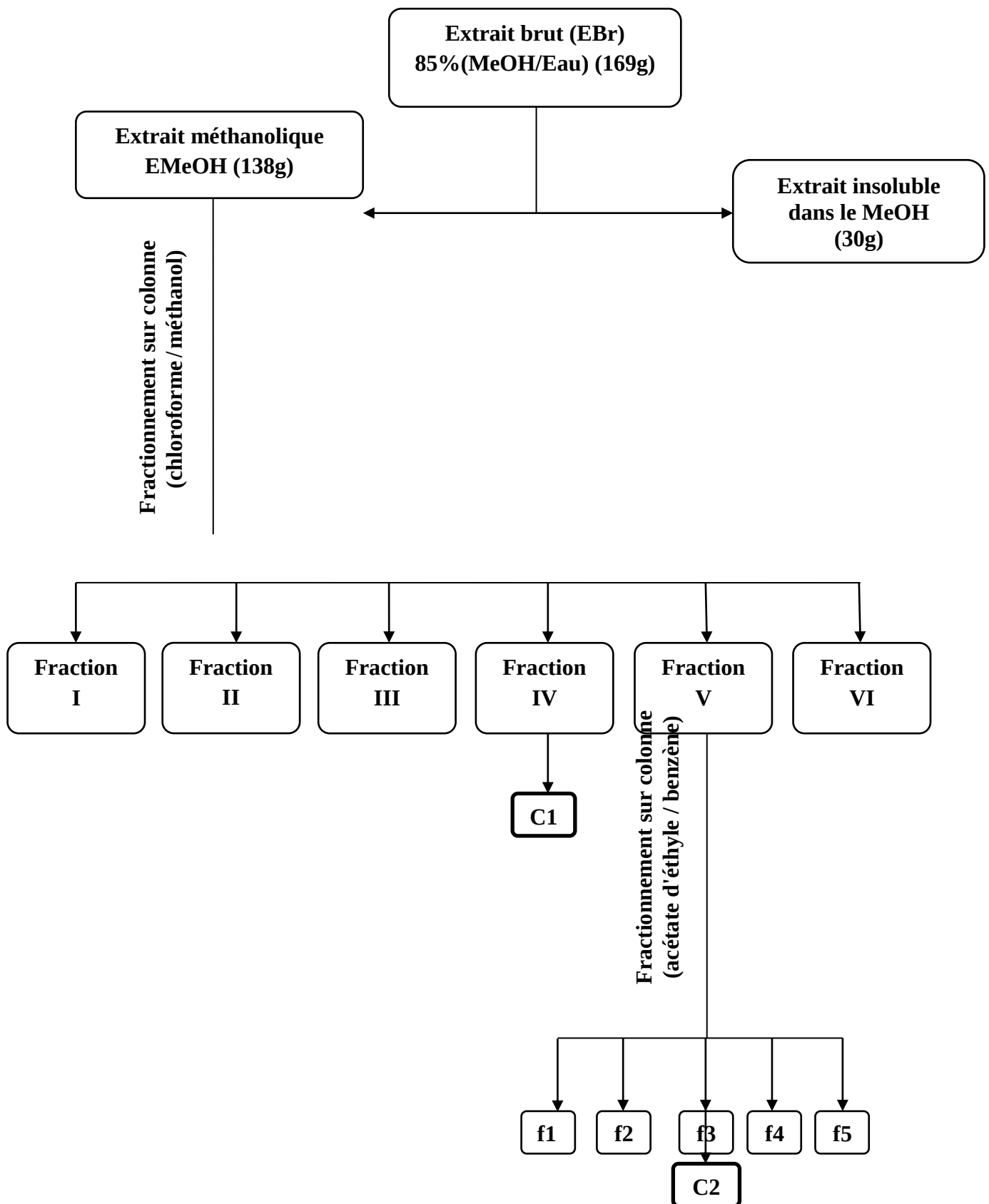


Figure 18. Les différentes étapes de fractionnement et de purifications de l'extrait brut des racines de *T. communis*

2.3.1. Isolation

La fraction IV a donné un solide blanc lors d'un traitement avec du méthanol. Le solide a été identifié comme le 5,8-diméthoxypsoralène (C1) (Elgamal et *al.*, 1979 ; Stevenson et *al.*, 2003). D'autre part, la fraction V a été purifiée suite à une chromatographie sur colonne, l'éluant utilisé est un mélange d'acétate d'éthyle / benzène de polarité croissante (1%, 2%, 3%, 5%, 10% et 20% v/v) 20 différentes fractions ont été obtenues (100 ml chacune), ces dernières ont été combinés en cinq sous-fractions (V-1-5). Par le traitement de la sous-fraction V-3 avec du méthanol, on a obtenu une matière solide qui a été identifiée comme l'héraclinine (C2) (Setzer et *al.*, 2000; Miftakhova et *al.*, 2001). La fraction insoluble dans le methanol (30 g) a été purifiée par lavage avec du méthanol pour donner un solide cristallin pur identifié comme étant un sucre commun.

2.3.2. Techniques de détermination de la structure des composés isolés

Les spectres RMN sont enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance II 500 MHz (Département de Pharmacie, Ulg), résonant respectivement à 500MHz (1H) et 125 MHz (13C). Les déplacements chimiques sont enregistrés en δ (ppm) en considérant le déplacement chimique du tétraméthylsilane (TMS, comme référence) $\delta_{TMS} = 0$. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hertz (Hz). Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant deutéré CDCl₃. Les programmes de séquence impulsionnelle standard fournie par Brüker ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles COSY, HSQC et HMBC. Les

Spectres de masse à haute résolution (HRMS) ont été obtenus avec une ionisation par électro nébulisation (ESI) technique par dissociation induite par collision sur un Bruker APEX-4 instrument (Brême, Allemagne). Les échantillons ont été dissouts dans de l'acétonitrile, dilué dans une solution de pulvérisation (chloroforme / acétate d'éthyle 1: 4 v / v) et perfusé au moyen d'une pompe à seringue à un débit de 2 ml. min⁻¹. La calibration de masse externe a été

menée avec des grappes arginine monoprotoné dans la gamme de masse m/z 175-871. La pureté des composés isolés a été vérifiée à l'aide d'une chromatographie sur couche mince; les plaques de verre, pré-revêtues de gel de silice (60GF254, Fluka) ont été utilisées. Le gel de silice utilisé pour la chromatographie sur colonne est du G-UV 254 (Macherey Nagel ou Merck) ou du gel de silice 60 (0,200 mm O.063-, Fluka, Steinheim, Allemagne). La CCM de routine a été effectuée sur du gel de silice G-254 UV coulé sur des plaques en verre de 0,25 mm (Macherey Nagel).

2.4. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques de l'EBr de la plante *T. communis* est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Li et *al.*, 2007) qui est basée sur la réduction en milieux alcalin d'un mélange de phosphotungstène (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un produit de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé et *al.*, 2005).

Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 μ l d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La quantité de polyphénols totaux, exprimée en mg équivalents d'acide gallique pour 1g d'extrait, est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage tracée en présence de l'acide gallique (**Figure 19**).

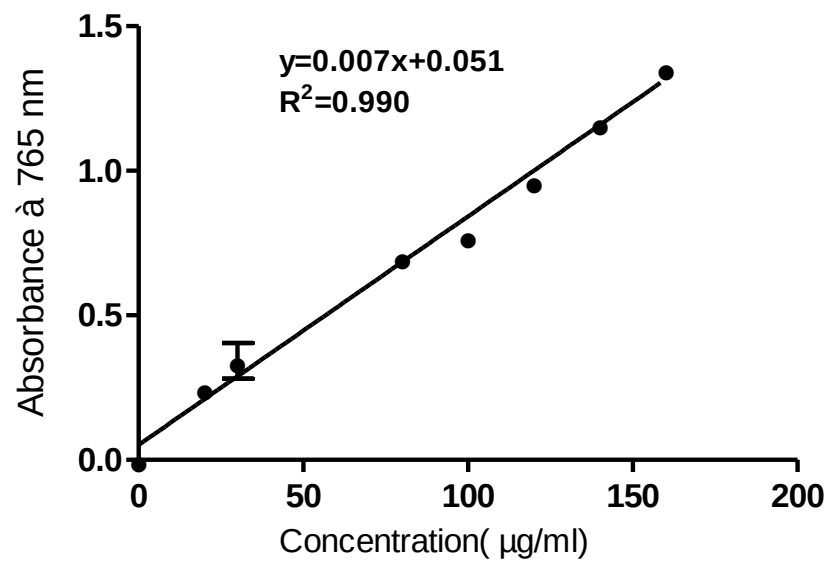


Figure 19. Droite d'étalonnage de l'acide gallique , chaque point de la courbe représente la Moyenne $\pm$ SD (n=3)

2.5. Dosage des flavonoïdes

Le dosage spectrophotométrique des flavonoïdes est effectué suivant la méthode de (Bahorun et *al.*, 1996). Elle se base sur les propriétés chélatrices de l'ion aluminium. 1ml d'une solution d'extrait à 1 mg/ml sont ajoutés à 2 ml d'une solution méthanolique de trichlorure d'aluminium (2%, Sigma, Saint-Louis, Etats-Unis). Le blanc est préparé en remplaçant le trichlorure d'aluminium par du méthanol. L'absorbance est lue à 430 nm après 10 minutes d'incubation. La quantité de flavonoïdes totaux, exprimée en mg équivalents de rutine pour 1g d'extrait, a été estimée à partir d'une droite d'étalonnage tracée avec la rutine et la Quercétine (**Figure 20**).

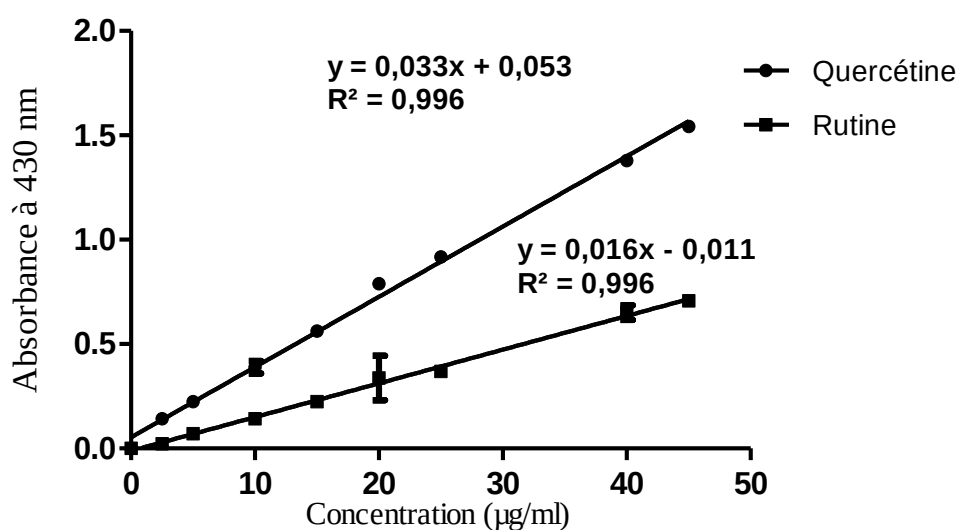


Figure 20. Courbe d'étalonnage de la Quercétine et de la rutine, chaque point des deux courbes représente la moyenne $\pm$ SD (n=3)

2.6. Purification de la xanthine oxydoréductase (XOR)

La purification de la xanthine oxydoréductase XOR est habituellement purifiée dans notre laboratoire à partir du lait bovin (BMXO) selon le protocole décrit par Nakamura et Yamazaki (1982) modifié par Baghiani et ses collaborateurs (2003). Le lait bovin est centrifugé à 5000 rpm pendant 20 minutes. La crème flottante est dissoute dans un volume double de phosphate de potassium (K_2HPO_4 0,2 M) contenant 1 mM d'EDTA et 5 mM de DTT. Le mélange est soumis à une agitation douce pendant 2 heures puis centrifugés à 6000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant récupéré est filtré à travers la laine de verre. Au filtrat, le butanol froid ($-20^\circ C$) à 15% (V/V) et le sulfate d'ammonium 15% (P/V) sont additionnés, le tout est soumis à une agitation douce pendant 1 heure, puis centrifugé à 1000 rpm pendant 20 minutes. Après filtration du surnageant obtenu à travers la laine de verre, celui-ci est précipité par addition progressive de sulfate d'ammonium 20% (P/V) suivis par une agitation douce pendant 1 heure et 30 minutes et enfin, l'étape est achevée par une centrifugation à 11000 rpm pendant 30 minutes. Le précipité obtenu (couche brunâtre) est récupéré soigneusement et

resuspendu dans un volume convenable de tampon héparine (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 25 mM, contenant 1 mM d'EDTA, pH 6,2) et dialysé contre ce même tampon pendant une nuit sous agitation. Afin d'éliminer les impuretés, le dialysat est centrifugé à 18000 rpm pendant 1 heure puis filtré à travers un filtre de 45 μm de diamètre, le produit final obtenu constitue l'extrait brut de la XO. Par la suite l'extrait brut est déposé sur une colonne de chromatographie contenant un gel d'héparine-agarose équilibré et lavé par le tampon héparine. La XO est éluée par le tampon héparine renfermant 0,1 M de NaCl suivi par le même tampon contenant 0,2 M de NaCl puis enfin dialysé contre un tampon Biscine 50 mM, pH 8,3 durant toute une nuit.

L'enzyme une fois récupérée, est répartie en aliquotes à raison de 0,5 ml et conservée par la suite à -20°C jusqu'à son utilisation. Sans oublier de mentionner que toutes ces étapes sont effectuées à une température de 4°C .

2.6.1. Contrôle de pureté de la XOR

Pour contrôler la pureté de la XOR, le rapport protéine / flavine ; PFR (protein to flavin ratio) est estimé, il correspond à l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm ($A_{280\text{nm}}/A_{450\text{nm}}$). La valeur de 5 ou proche de 5 indique une pureté significative (Bray, 1975). En plus une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dissociant (SDS-PAGE) (10%) est aussi réalisée pour confirmer la pureté de l'enzyme.

2.6.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) est réalisé selon la méthode de Laemmli (1970). Le gel de séparation (10% d'acrylamide et 2.4 % de bis-acrylamide) est préparé dans un tampon Tris- HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1 % de SDS (P/V) et polymérisé par addition de 0.042 % de N,N,N',N' tetraméthylène diamine (TEMED) (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Le gel de concentration est préparé dans le même tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1% de SDS (P/V) et polymérisé par addition de 0.1% de TEMED (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Les

échantillons : la XO et les standards (soit 1mg/ml) sont préparés dans une solution constituée de tampon Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), 2% de SDS, 20% de glycérol (V/V) et 0.005% de bleu de bromophénol (P/V), ensuite ils sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Les standards utilisés ont un poids moléculaire (Sigma) qui varie de 31000 à 200000Da.

La migration électrophorétique est réalisée dans un tampon Tris-HCl (25 mM) contenant 0.192 M de la glycine et 0.1% de SDS (P/V), un courant électrique de 37-45 mA est appliqué. Pour détecter la présence des protéines séparées, une coloration par une solution de bleu de Coomassie 0.2% (P/V) contenant 10% d'acide acétique (V/V), 45% de méthanol (V/V). Le tout est dilué dans l'eau distillée.

2.6.3. 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 (Avis et *al.*, 1956).

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).

2.7. Évaluation chimique de l'activité antioxydante in vitro

Beaucoup de tests standardisés évaluant l'activité antioxydante ont été retenus dans le cadre de cette étude.

2.7.1. Détermination de l'activité antiradicalaire des extraits par la méthode au DPPH

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams et *al.* 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Figure 21**). L'efficacité d'un antioxydant est proportionnelle à la réduction de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.

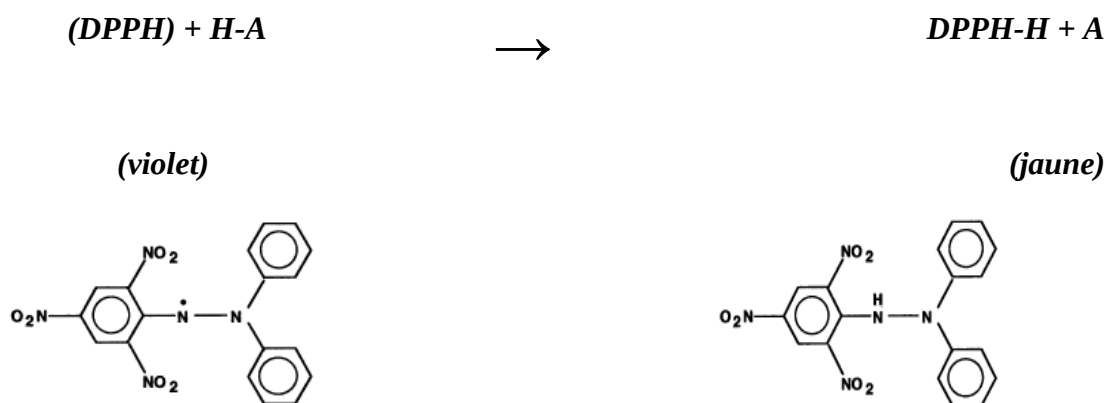


Figure 21. Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 Diphényle-1-Picryl- Hydrazyle)

Une série de dilutions successives, dans le méthanol, est réalisées à partir de solutions d'échantillon. Pour chaque concentration, on mélange 50 μ L d'échantillon et 1250 ml de DPPH (4% dans le méthanol) (Brand-Williams et *al.*, 1995 ; Burits et Bucar, 2000). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lue à 517 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre (UV/VIS-8500 Techom.).

L'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage de DPPH réduit selon la formule :

$$AAR (\%) = [(AC-AE)/AC] \times 100$$

AAR (%) : Pourcentage de l'Activité Anti-Radicalaire

AC : Absorbance en absence de l'extrait (contrôle négatif)

AE : Absorbance en présence de l'extrait

La concentration d'extrait réduisant 50% de DPPH (IC₅₀) est obtenue à partir de la courbe donnant l'AAR en fonction de la concentration de l'extrait.

2.7.2. Test de Co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco (1968), puis légèrement modifiée par Miller (1971). Elle consiste à mesurer à 490 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par le Tween 40. L'addition d'antioxydants purs (Von Gadow et *al.*, 1997) ou sous forme d'extraits végétaux (Koleva et *al.*, 2002) induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple, il s'agit d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. L'activité antioxydante des extraits est évaluée par le système β -carotène / acide linoléique (Dapkevicius et *al.* 1998).

Une solution de β -carotène est préparée par solubilisation de 4mg du β -carotène dans 2 ml de chloroforme. Un millilitre de la solution obtenue est évaporé à 40°C au moyen d'un évaporateur rotatif, une fois le chloroforme évaporé, 25 μ l de l'acide linoléique, 200 mg du Tween 40 et 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène (100 ml / min / 30 min) sont ajoutés et mélangés vigoureusement. 2.5 ml de cette émulsion sont transférés dans différents tubes contenant chacun 350 μ l de l'extraits (2 mg/ ml de concentration). L'absorbance à 490 nm est utilisée pour la lecture à des temps variables, 1 heure, 2h, 3h, 4h, 6h et 24 h d'incubation à température ambiante et à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité antioxydante (AA%) est calculé selon l'équation suivante:

$$AA \% = A \text{ échantillon} / A \text{ BHT} \times 100$$

A : représente l'absorbance de l'échantillon,

A BHT : représente l'absorbance du standard utilisé.

2.7.3. Evaluation de l'inhibition de la xanthine oxydase par les extraits de plantes

L'évaluation de l'effet des extraits sur la Xanthine Oxydase est déterminé par spectrophotométrie à 295 nm, en utilisant le coefficient d'absorption à 9600 M cm⁻¹ (Avis et *al.*, 1956). Différentes concentrations des extraits à tester sont additionnées au milieu réactionnel en premier avant l'addition de l'enzyme, leur effet dans la génération de l'acide urique est utilisé pour calculer la droite de régression et les valeurs de l'IC₅₀. La réaction est achevée par l'addition de la XO (1511 nmoles urate/min/mg XO).

L'activité de l'enzyme du control négatif (en absence de l'inhibiteur) est considérée égale à 100%. L'allopurinol est utilisé comme substance de référence.

$$I\% = [(AC-AE)/AC] \times 100$$

AC : Absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

AE : Absorbance en présence de l'inhibiteur

L'IC₅₀ de chaque extrait (concentration inhibitrice de 50% de l'activité enzymatique) est calculée à partir de la droite $Y = aX + b$ qui représente le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. L'IC₅₀ est exprimée en mg/ml et comparée à celle de l'allopurinol.

2.7.4. Mesure de l'activité Scavenger de l'Anion Superoxide (O₂⁻)

L'effet scavenger des extraits sur l'O₂⁻ produit par la XO est déterminé par spectrophotométrie selon la méthode décrite par Robak et Gryglewski (1988). Brièvement, 50 µl de concentrations variables des extraits à tester dissouts dans 50 m moles/l phosphate buffer (pH 7.4), 10 µl (1511 n moles d'urate/min/mg XO), 100 µl de xanthine de concentration 100 µ moles/l et 100 µl de cytochrome c dont la concentration est de 25µ moles/l sont additionnés au milieu réactionnel, le tout est mélangé vigoureusement et suivie par une lecture à 550 nm. L'évaluation de l'activité inhibitrice de la réduction de la ferricytochrome c par les extraits est exprimée par le pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = [(AC-AE)/AC] \times 100$$

AC : Absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

AE : Absorbance en présence de l'inhibiteur

L'IC₅₀ de chaque extrait (concentration inhibitrice de la réduction de 50% du cytochrome c) est calculée à partir de la droite $Y = aX + b$ qui représente le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. L'IC₅₀ est exprimée en mg/ml et comparée à celle de l'allopurinol.

La sensibilité de la réaction est déterminée en utilisant la SOD (bovine érythrocytes superoxide dismutase) (330 U/ml concentration finale).

2.7.5. Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode au thiocyanate ferrique (FTC)

L'activité antioxydante des extraits de la plante est mesurée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique, selon la méthode décrite par Takao et ses collaborateurs (1994). Le mélange réactionnel contenant respectivement 0,4 ml d'extraits (100 µg/ml), 0,4 ml d'acide linoléique (2,5 % dans l'éthanol absolu) et 0,8 ml de tampon phosphate (pH 7,4) est incubé dans un bain-marie pendant 1 heure à 40° C. Un aliquote (0,1 ml) de cette solution est alors ajouté au mélange constitué de 5 ml d'éthanol 70 % et 0,1 ml de thiocyanate d'ammonium (30 %). Après 3 minutes, 0,1 ml de FeCl₂ préparé dans 3,5 % de HCl (20 mM) est ajouté au milieu réactionnel. Un essai blanc est réalisé en remplaçant les extraits par de l'eau distillée. L'absorbance de la coloration rouge de la solution est lue pendant 7 jours à 500 nm au spectrophotomètre toutes les 24 heures jusqu'à ce que l'absorbance du contrôle négatif (eau distillée) atteigne son maximum. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est alors calculé selon l'équation suivante :

$$Inhibition (\%) = (1 - (DO_{essai} / DO_{blanc})) \times 100$$

2.7.6. Le test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur détermine la capacité des antioxydants présents dans les extraits de plante à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanide $-\text{Fe}^{3+}$ en fer ferreux $-\text{Fe}^{2+}$. Cette réduction se traduit par une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur. L'absorbance est lue à 700 nm.

La méthode utilisée est celle de Topçu et ses collaborateurs (2007), avec quelques modifications. Ainsi, 2,5 ml de l'extrait sont mélangés à 2,5 ml du tampon phosphate (0.2M, pH 6.6) et 2,5 ml de ferricyanide de potassium (10mg/ml). Le mélange est incubé au bain-marie à une température de 50°C pendant 20 min, ensuite 2,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction puis les tubes sont centrifugés à 2790 rpm pendant 10min. Un aliquote de 2,5 ml du surnageant est combiné à 2,5 ml d'eau distillée et 0.5 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700nm contre un blanc préparé en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique et le BHT. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à l'augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés. La concentration IC_{50} définit la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% le Fe^{3+} du thiocyanate ferrique et utilisée comme un indice pour comparer et exprimer la capacité réductrice des substances bioactives.

2.7.7. Chélation du fer ferreux

La chélation du fer ferreux par les extraits est évaluée par la méthode à la ferrozine, cette dernière forme un complexe avec les ions Fe^{2+} libres (Fe^{2+} -ferrozine), qui se manifeste par une diminution de l'absorbance traduisant ainsi le pouvoir chélateur des antioxydants présents (Le et al. 2007).

Les solutions d'extraits et de l'antioxydant de référence l'EDTA (500µl) sont initialement mélangés avec 100 µl de FeCl₂ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 µl de méthanol. Après 5 min, 100 µl de Ferrozine (5 mM dans le méthanol) sont additionnés au milieu réactionnel. Le mélange agité et incubé pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la combinaison du fer résiduel à la Ferrozine de couleur pourpre ayant un maximum d'absorption à 560nm.

Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol. Les lectures sont effectuées à 560 nm contre le méthanol. L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Chélation} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : Absorbance à 560 nm du contrôle.

At : Absorbance à 560 nm de l'extrait testé.

2.7.8. Évaluation biologique de l'activité antioxydante par le test KRL

Un test antioxydant biologique a été utilisé dans cette étude car celui-ci possède la particularité d'évaluer la capacité antioxydante d'un composé en mettant en évidence plusieurs mécanismes réactionnels mobilisant les défenses enzymatiques et chimiques à des niveaux intra et extracellulaires.

C'est un test biologique original basé sur la mise en contact, à 37°C, d'un générateur de radicaux libres peroxydes, le dichlorate de 2,2' azobis(2-amidinopropane) (AAPH) de concentration 300mM, avec du sang total. La décomposition thermique de ce composé génère des radicaux libres à vitesse constante qui attaquent la membrane des globules rouges (Lesgards et *al.*, 2005 ; Bauguil et *al.*, 2009). Lorsque les antioxydants endogènes sont consommés, la membrane des globules rouges éclate et l'hémoglobine se retrouve dans le surnageant. Le suivi de l'hémolyse se fait par spectrophotométrie à 630 nm, il permet de

mesurer la variation de la turbidité du milieu réactionnel au cours du temps. L'addition dans le milieu d'incubation de molécules ou d'extraits à activité antioxydante retarde l'apparition de l'hémolyse.

Du sang provenant de souris mâles est collecté dans un tube contenant 0.1% d'EDTA, il est centrifugé à 3000 t/min pendant 10 minutes, le culot de globules rouges résultant est lavé trois fois avec le tampon PBS (NaCl 125 mM, phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4). Pendant chaque lavage, la suspension est homogénéisée par un simple retournement du tube, le surnageant et la couche d'interface sont éliminés juste après la centrifugation. A partir du culot de globules rouges obtenu, un aliquote de 100 µl de sang total est transféré immédiatement vers un autre tube contenant 2,4 ml de tampon phosphate afin d'obtenir une dilution de $1/25^{\text{ème}}$. Brièvement, un aliquote de 80 µl de chacune des solutions sanguines obtenues précédemment, est déposé dans un puit de microplaque, et exposé au radical produit par la décomposition thermique à 37°C de 136 µl de AAPH (300mM) en solution. La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie par la mesure dynamique de la diminution de l'absorbance à 630 nm (par un lecteur de plaque 96 puits). La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (half-hemolysis Time : HT₅₀) (Girard et *al.*, 2006). L'analyse se fait en quadruplicata.

2.8. Etude, *in vivo*, de la capacité antioxydante (CAO) de l'extrait brut (EBr) des racines de *Tamus communis* L.

Des souris mâles, *Swiss albinos*, adultes, de poids variant entre 25 et 30 g, sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en trois lots expérimentaux de 6 à 7 animaux chacun. Durant trois semaines, une injection intra péritonéale quotidienne à une dose de 100 mg/kg de l'EBr est appliquée au premier groupe. 50 mg/ kg d'acide ascorbique sont injectés au deuxième groupe et représente le contrôle positif. Les souris du groupe contrôle (CTL) ont reçu le même volume d'une solution saline normale (9g/1000ml).

Les animaux sont maintenus à température ambiante avec accès libre en eau et en nourriture.

a. Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin est réalisé après trois semaines de traitement sur les souris anesthésiées par l'éther diéthylique, par ponction de l'aorte abdominale, environ un millilitre du sang est prélevé dans des tubes contenant 0.1% d'EDTA. La capacité antihémostatique est évaluée sur les 100 µl du sang récupéré (même protocole cité ci-dessus (*in vitro*)).

La quantité du sang restante est centrifugée à 1500 g pendant 5min à 4°C. Le plasma obtenu est aliquoté et conservé à une température de -20°C jusqu'à son utilisation.

b. Préparation de l'homogénat

Après dissection, le foie de chaque souris est rapidement prélevé et bien rincé à l'eau physiologique froide puis séché sur le papier filtre. Ensuite, l'organe est coupé en petits morceaux, pesé et enfin homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur de Daounce dans une solution de KCl 1.15% à raison de 10% p/v. L'homogénat obtenu est centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires. Ensuite, le surnageant est récupéré dans des tubes secs est stocké à -20°C jusqu'à leur utilisation notamment, pour les dosages tissulaires.

2.8..1. Evaluation de la capacité antioxydante (CAO) totale du sang

Le potentiel global de défense antioxydante est mesuré par le test KRL (même protocole décrit *in vitro*, cité ci- dessous). Avec quelques modifications en remplaçant le radical AAPH [2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl] par le *tert*-butyle hydroperoxyde (*t*-BHP) à une concentration de 166µM (Manna et *al.*, 2002).

2.8.2. Evaluation de la CAO plasmatique vis-à-vis du radical DPPH

La capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été évaluée selon la méthode de Hasani et ses collaborateurs (2007) avec quelques modifications, en se basant sur le même

principe que celui du test de DPPH effectué précédemment *in vitro*. Brièvement, un volume de 50 µL de plasma est additionné à 1250 µl de la solution méthanolique de DPPH (4 mg/100 ml de méthanol). Après 30 min d'incubation à l'obscurité suivie d'une centrifugation (Janaszewska et Bartosz, 2002), l'absorbance à 517 nm est mesurée. Le pouvoir antioxydant plasmatique est ensuite calculé selon l'équation (voir la partie 2.7.1.).

2.8.3. Evaluation de la CAO plasmatique vis-à-vis de la réduction du fer

Même protocole décrit dans le test *in vitro*, seulement les extraits sont remplacés par le plasma des souris traitées.

2.8.4. Analyse des paramètres tissulaires

2.8.4.1. Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)

La quantité des TBARS est exprimée en terme d'un équivalent biochimique qui est le Malonyl di aldéhyde « MDA», un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (PUFA) méditée par les radicaux libres. La mesure du MDA à l'aide du TBA selon la méthode de Okhawa et ses collaborateurs (1979) permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur majeur du stress oxydant.

A 0.5 ml de l'homogénat, nous avons ajouté 0.5ml de TCA 20% et 1ml de TBA 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation pendant 15 minutes à 3000 tours /minutes, la densité optique du surnageant est lu au spectrophotomètre à 530 nm. Le MDA est exprimé en nmol/g de tissu de l'organe étudié.

2.8.4.2. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité enzymatique de la catalase est déterminée dans le tissu hépatique selon la méthode de Clairborne (1985), dont le principe est basé sur la diminution de l'absorbance à

240 nm qui est due à la décomposition du superoxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de la catalase.

Dans une cuvette en quartz, 50µl de l'homogénat sont mélangés avec 2.95 ml d'une solution de H₂O₂ à 19 mmoles/ml préparée dans le tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M). La diminution de l'absorbance est suivie pendant deux minutes. L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en constante de vitesse de la réaction d'ordre 0 par gramme de tissu.

L'activité enzymatique de la catalase est calculée selon la formule suivante :

$$K=2.303 \times \log (A1/A2)/T$$

K : Constante de vitesse de la réaction d'ordre 1.

T : Intervalle de temps en minute.

A1 : Absorbance à t0

A2 : Absorbance à t1

$$L'activité\ enzymatique\ de\ la\ catalase = K/n\ (K/g)$$

n représente la quantité de tissu en gramme dans le volume utilisé de l'échantillon testé.

2.8.4.3. Dosage du glutathion tissulaire

Le dosage de glutathion réduit est effectué selon la méthode de Ellman (1959) au niveau du foie. C'est une méthode basée sur l'évaluation de la réduction du réactif d'Ellman DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)) par les groupes (SH) en formant l'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque, ce dernier est caractérisé par une coloration jaune intense, ce qui permet sa quantification spectrophotométrique à 412 nm.

Ainsi, 0.5 ml de TCA à 10% sont mélangés avec 0.5 ml d'échantillon. Le mélange est agité de temps à autre pendant 15 minutes ensuite, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 2000 tours/mn. Entre temps d'autres tubes sont préparés pour le mélange réactionnel, dans lesquels sont ajoutés 100µl de réactif d'Ellman et 1.7 ml de tampon, aux quels 200 µl de surnageant

sont additionnés et la lecture se fait après 5 minutes d'incubation à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

Les concentrations du glutathion réduit sont exprimées en μmoles par gramme de tissu.

3. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne $\pm$ SD (déviation standard) et en moyenne $\pm$ SEM (erreur standard de la moyenne) respectivement. Les valeurs d' IC_{50} (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)].

Les sigmoïdes de la cinétique d'hémolyse et la détermination de l' HT_{50} sont effectués par le logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples ou ANOVA univariée (one-way ANOVA) suivie du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de p est ≤ 0.05 sont considérées statistiquement significatives.

Partie III

Résultats et Discussion

1. Extraction des polyphénols

De nombreux travaux issus de la littérature traitant des conditions expérimentales optimales lors de l'extraction de polyphénols optent pour une utilisation de solvants mixtes acétone/eau ou méthanol/eau, une absence de délipidation et d'acidification (Kim et *al.*, 2006; Gonzalez-Montelongo et *al.*, 2010). Toutefois l'eau et le méthanol restent les meilleurs solvants d'extraction (Jokić et *al.*, 2010 ; Bonnaillie et *al.*, 2012). La présence d'eau dans ces derniers augmenterait la perméabilité des tissus végétaux et favoriserait le phénomène de diffusion de masse dans l'étape d'extraction (Moure et *al.*, 2000; Arimboor et Arumugan, 2011).

Les polyphénols, classe de molécules plutôt hydrosolubles, sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne ou forte. Ainsi, les solvants qui ont été retenus pour notre étude sont le méthanol qui présente une polarité moyenne et l'eau dont la polarité est la plus élevée. Un mélange de méthanol/eau (85/25 v/v) dont la polarité est qualifiée d'intermédiaire a été utilisé.

Le calcul des rendements par rapport au poids de la poudre végétale a montré que l'EBr représente un rendement de $8,5 \pm 0,75\%$.

2. Purification de la xanthine oxydase

Le rendement de la purification obtenu est de 23.21 mg d'enzyme purifiée /litre de lait bovin frais. Cette valeur est identique à celle obtenue par Baghiani et ses collaborateurs (2002; 2003). L'activité totale et l'activité de la forme oxydase de l'enzyme purifiée du lait bovin a été estimée en présence de la xanthine comme substrat réducteur et en présence de NAD^+ et d' O_2 comme substrat oxydant, le pourcentage de la forme oxydase a été par la suite calculé. L'enzyme pure a présenté une activité totale de 1511.5 nmoles / min / mg protéine et le pourcentage de la forme oxydase (XO) de l'enzyme a été de 91.89 % (**Tableau4**). Ces résultats

corroboient avec ceux issus des travaux menés par Baghiani et ses collaborateurs (2003) et qui indiquent que l'activité de la XOR du lait des différentes espèces de mammifères est liée à la forme inactive démoxybdo de l'enzyme.

Tableau 4. L'activité totale et oxydase de la XOR purifiée à partir du lait bovin frais.

Activité (nmol /min / mg protéine)*		Pourcentage de la forme oxydase (XO)	Rapport protéine/flavine (PFR)
Totale	Forme oxydase (XO)	(XO)	(PFR)
1511.5	1271.57	91.89	5.078

* 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 Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3).

Le spectre d'absorption caractéristique de la XO déterminé par un balayage spectrophotométrique (UV-Vis) a présenté trois pics majeurs à 280, 325 et 450 nm (**Figure 22 A**) résultats semblables à ceux obtenus par les travaux de Abadeh et ses collaborateurs (1992), Sanders et ses collaborateurs (1997), Baghiani et ses collaborateurs (2002; 2003), Atmani et ses collaborateurs (2004) et Benboubetra et ses collaborateurs (2004). La XOR ainsi purifiée a montré un degré de pureté élevé relevant d'un PFR égal à 5.078, une telle valeur proche de 5 est considérée comme critère de grande pureté (Bray, 1975). La pureté de l'enzyme a été confirmée par une électrophorèse (SDS-PAGE). La migration électrophorétique a présenté une bande majeure approximative de 150 KDa (**Figure 22 B**) identique aux résultats obtenus par les études effectués par Baghiani et ses collaborateurs en 2003 et par Atmani et ses collaborateurs en 2004.

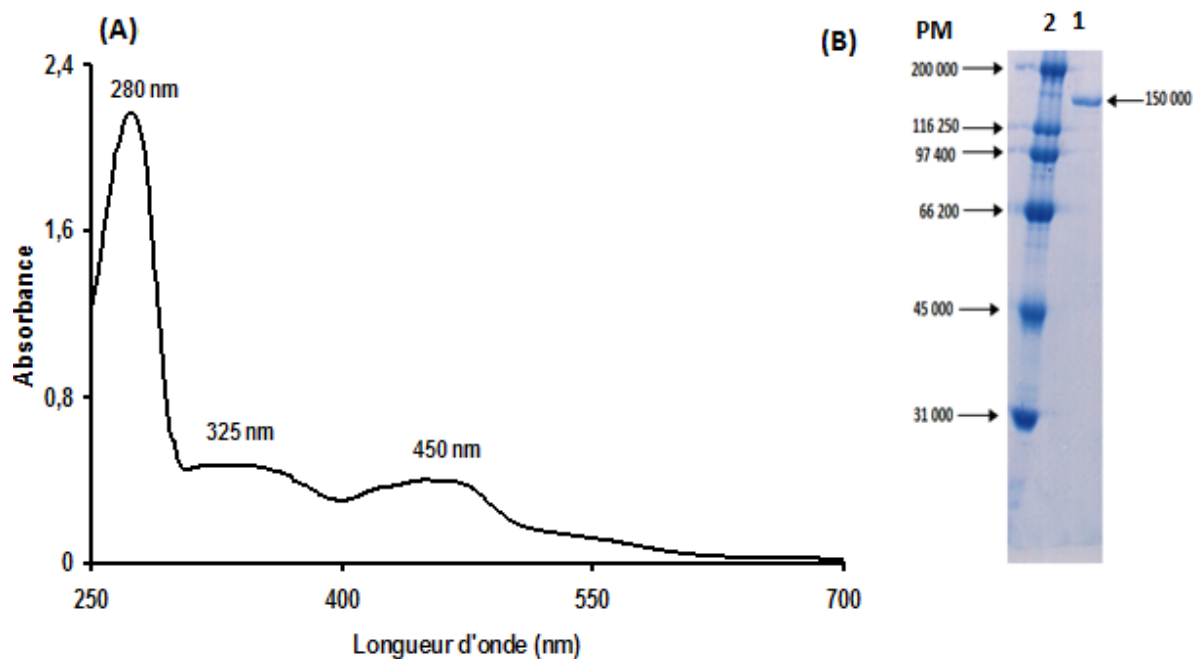


Figure 22. Spectre d'absorption UV-Vis (A) et électrophorèse (SDS-PAGE) (B) de la XO purifiée. **B1:** XO pure (150 000 Da), **B2:** Les standards (Myosin 200 000, β -galactosidase 116 250, Phosphorylase b 97 400, Serum albumin 66 200, Ovalbumin 45 000, Carbonic anhydrase 31 000 Da).

3. Test partiel phytochimique

Les tests phytochimiques réalisés sur l'E.Br de T. communis révèlent la présence de polyphénols, flavonoïdes, saponines et des tannins catéchiques, les tannins galliques n'ont pas été mis en évidence (**Tableau 5**).

Tableau 5. Différents groupes de composés mis en évidence dans l'EBr des racines de Tc

Polyphénols	Flavonoïdes	Tanins		Saponines
		Cat	Gal	
+	+	+	-	+
+ Présence du métabolite, - Absence du métabolite				

4. Fractionnement

Notre approche repose sur un fractionnement « bio-guide ». IL convient donc en premier lieu de séparer la fraction insoluble dans le méthanol de la fraction soluble afin de réaliser un fractionnement de ce dernier.

Il s'agit d'appliquer une technique chromatographique classique en utilisant une colonne sur gel de silice qui permet de réaliser une séparation de l'échantillon basé sur sa polarité. Nous avons choisi comme mode d'élution chloroforme puis un mélange chloroforme/méthanol de polarité croissante (1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30% et 50% v/v méthanol / chloroforme). Au total, 52 fractions (400 ml chacune) sont collectées et rassemblées selon leur profil sur CCM en six sous fractions différentes (FI-FVI), elles sont ensuite séchées et lyophilisées. Les différentes fractions obtenues sont suivies par la méthode CCM. L'analyse par CCM de chacune de ces fractions révèle qu'elles sont toutes constituées de plusieurs composés (**Figure 23**).

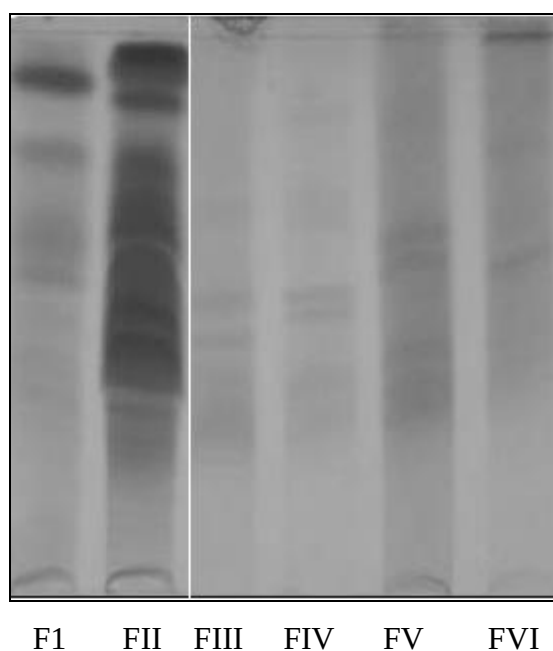


Figure 23. CCM des fractions. (les plaques sont observées sous lampe UV à 254 et 366 nm.)

a. Fractionnement de la FIV

Par lavage au méthanol, la fraction FIV (**Figure 24**) a permis l'obtention d'un composé pur sous l'aspect d'une poudre blanche sale, soit le composé C1.

b. Fractionnement de la FV

La fraction FV est séparé par chromatographie sur colonne de gel de silice avec l'éluant acétate d'éthyle /benzène de polarité croissante (1%, 2%, 3%, 5%, 10% and 20% v/v acétate d'éthyle /benzène) 20 fractions sont obtenues (100 ml chacune) qui sont combinées en 5 sous fractions (V-1-5). La sous fraction V-3 traitée avec du méthanol engendre un produit solide pur sous l'aspect d'une poudre jaune pâle, soit le composé C2.



Figure 24. CCM des deux composés C1 et C2.

4.1. Identification du composé C1

4.1.1. Spectrométrie de masse

L'analyse du composé C1 (**Figure 25**) par impact électronique en spectrométrie de masse (SM-IE) montre un ion moléculaire ayant un m/z de 269.0423, ce qui est compatible avec la formule brut $C_{13}H_{10}O_5$.

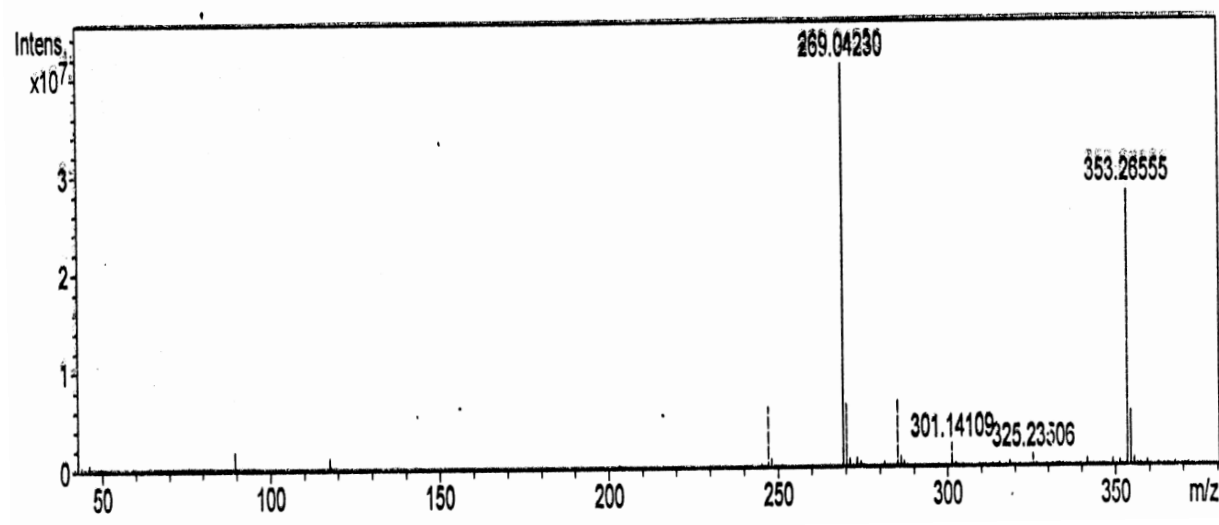


Figure 25 Spectre de masse du composé C1

4.1. 2. RMN

La résonance magnétique nucléaire permet de déterminer l'environnement chimique et la connectivité des différents atomes (carbone, proton, etc.) d'un composé (Agrawal, 1992). Ces informations structurales sont indispensables à l'élucidation de la structure chimique d'un composé.

4.1.2.1. RMN ¹H

L'interprétation du spectre proton 1D a montré une intégration des différents signaux qui indique que les deux signaux vers 4.12 et 4.21 ppm comptent pour 3 protons chacun (**Tableau 6**). Il s'agit des protons 8-OCH₃ et 5-OCH₃. Les autres intégrales comptent pour un seul proton. Leur déplacement chimique croissant est en relation au déblindage (**Figure 26**).

Tableau 6. RMN du RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz)

Déplacement chimique ^1H (ppm)	Intégrale (nombre de protons)	Attribution
4.12	3H	8-OCH ₃
4.21	3H	5-OCH ₃
6.13	1H	H-3
7.02	1H	H-3'
7.64	1H	H-2'
8.14	1H	H-4

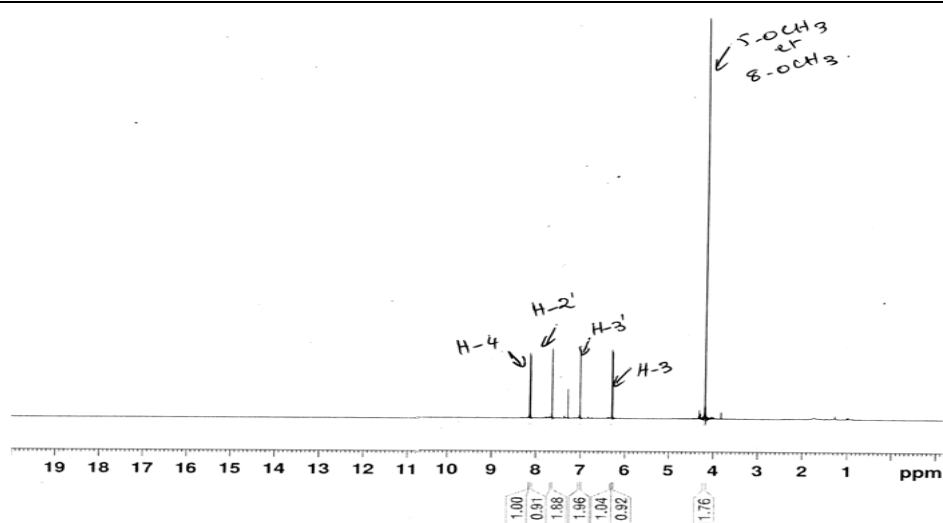


Figure 26. Spectre RMN ^1H du composé C1

Les analyses par RMN ^1H du composé C1 indiquent la présence de 10 protons.

4.1.2.2. RMN- ^{13}C

Analyse des spectres de RMN 1D carbone 13 et DEPT du composé C1

Les déplacements chimiques des carbones varient entre 0 et 200ppm. On peut noter quelques différences entre l'analyse des spectres de carbone et ceux du proton.

Du fait de la très faible abondance naturelle du carbone 13 (1,1 %), les couplages ^{13}C - ^{13}C ne sont pas observés. Il n'y a ainsi pas de multiplicité et donc que des singulets.

Tableau 7. RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz)

Déplacement chimique ^{13}C (ppm)	Attribution
105.1	C-3'
107.6	C-4a
112.8	C-3
114.8	C-6
128.3	C-8
139.4	C-4
143.7	C-8a
144.3	C-5
145.1	C-2'
150.0	C-7
160.5	C-2
61.4	5-OCH ₃
60.8	8-OCH ₃

L'attribution des carbones est résumée dans le tableau ci-dessous (**Tableau 7**).

Les analyses par RMN du ^{13}C détermine la présence de 13 atomes de carbones (**Figure 27**).

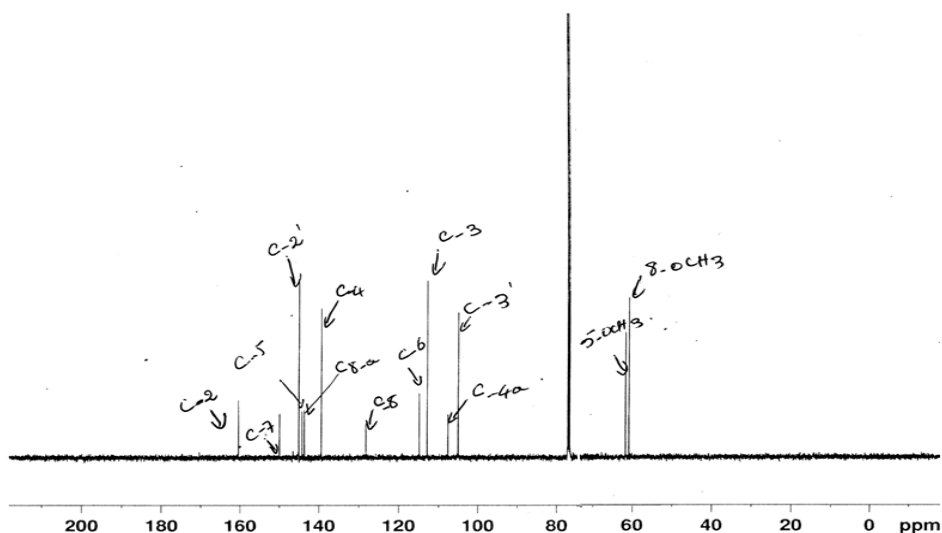


Figure 27. Spectre RMN- ^{13}C du composé C1

Les spectres DEPT

Les spectres DEPT nous donnent une indication sur la nature des carbones, que l'ont regroupent en quatre catégories : primaire, secondaire, tertiaires et quaternaire. Sur le spectre DEPT, leurs signaux n'apparaissent pas de la même façon.

Les carbones primaires "-CH₃-" et tertiaires "-CH-" sont positifs (en intensité).

Les carbones secondaires "-CH₂-" sont négatifs (en intensité).

Les carbones quaternaires "-C-" n'apparaissent pas sur le spectre. Sur ce, les 7 carbones étant quaternaires C2, C4a, C5, C6, C7, C8, C8a n'apparaissent pas sur le spectre DEPT (**Figure 28**).

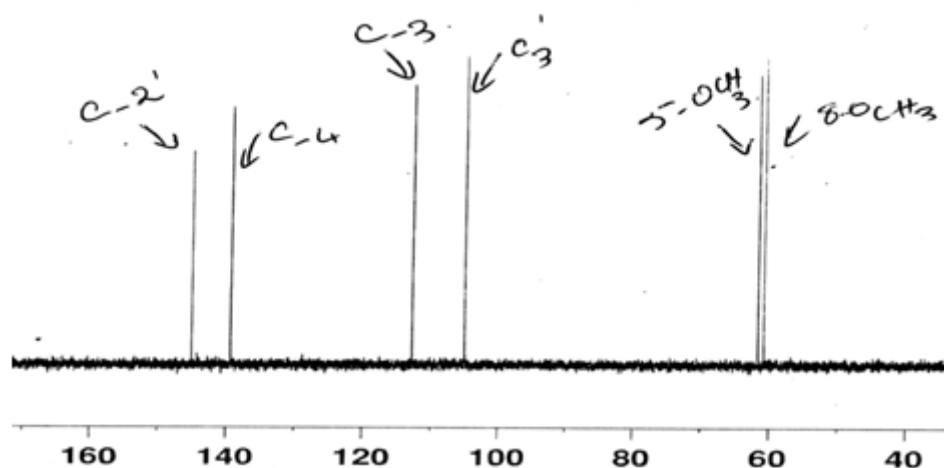


Figure 28. Spectre DEPT du composé C1

4.1.2.3. Les spectres en 2D : COSY, HSQC et HMBC

Les spectres RMN 2D nous permettent de déduire les corrélations entre les différents atomes de la molécule. On distingue les spectres RMN 2D homonucléaires (corrélations proton-proton) des spectres hétéronucléaires (corrélations proton-carbone).

- **Spectres homonucléaires : COSY**

Les spectres "COSY" nous permettent de déceler les corrélations entre protons séparés de 2 ou 3 liaisons. Le spectre proton est observé à la fois dans la dimension verticale et horizontale. Le croisement d'interaction entre deux protons nous donne une tache de corrélation. Sur la **figure 29A**, on observe une corrélation entre les protons 2x(O-CH₃) et une corrélation entre H-2' et H-3', mais nous pouvons déduire leur emplacement grâce aux autres spectres. On observe également une autre corrélation entre H-3 et H-4 (**Figure 29B**).

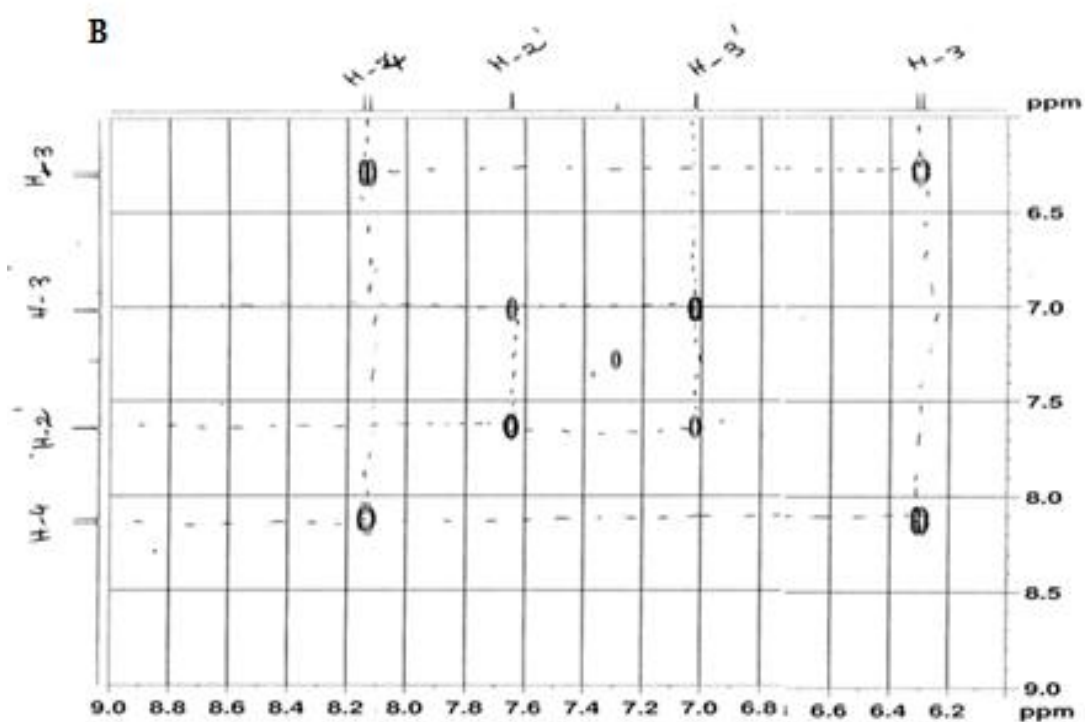
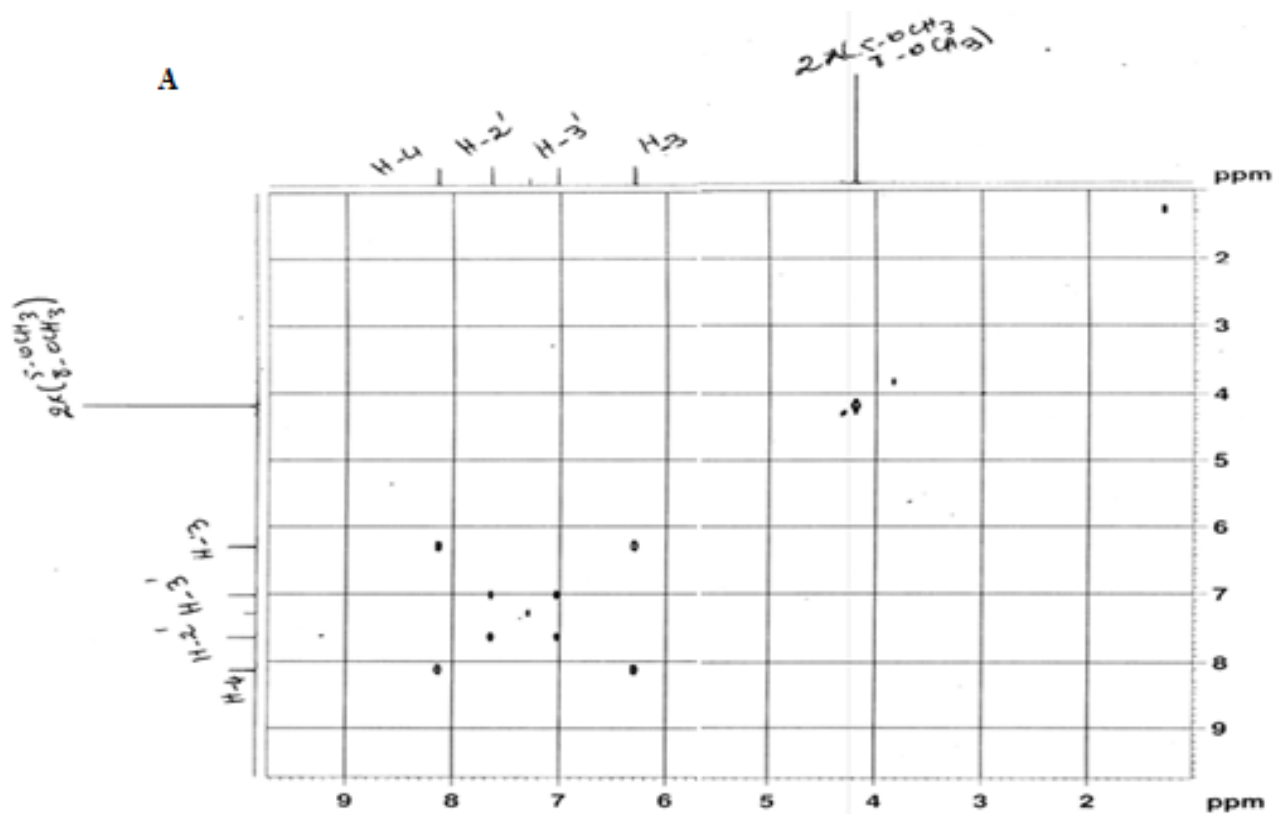
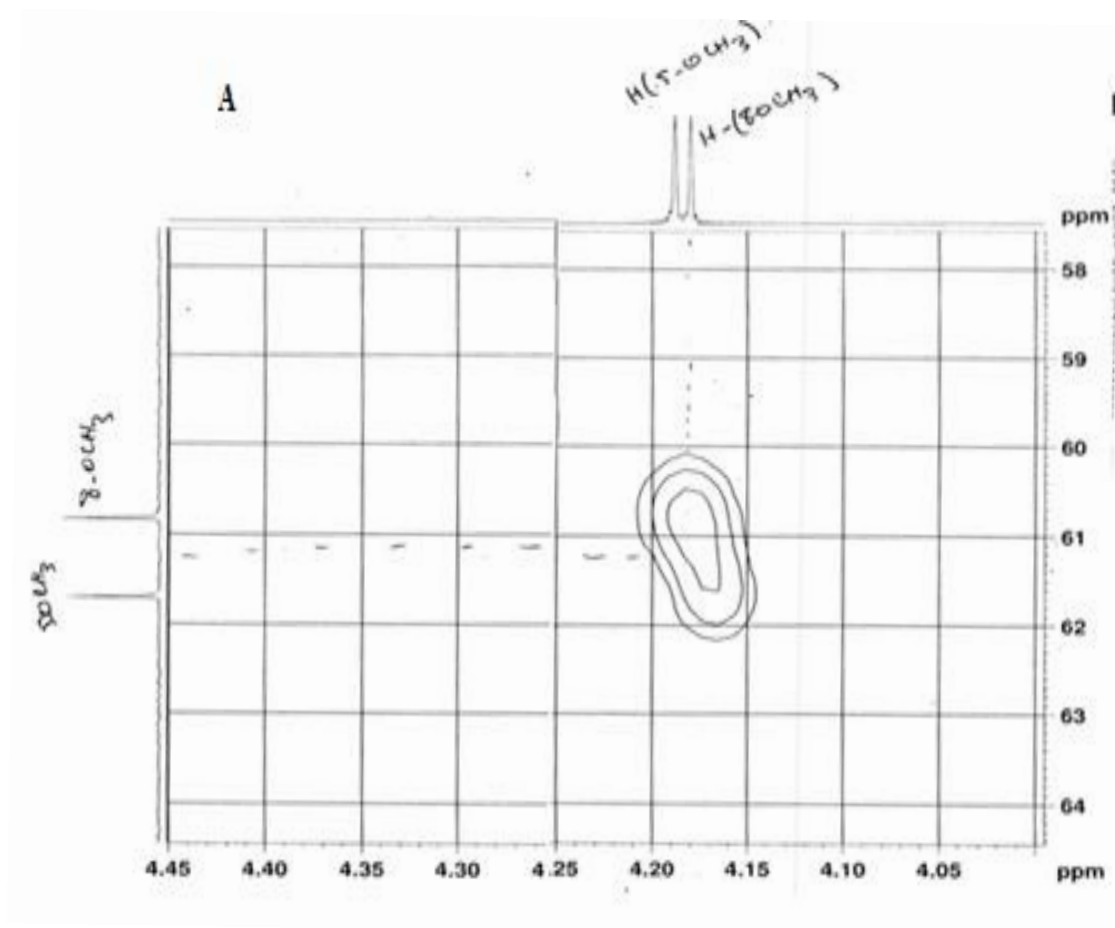


Figure 29. **A** Spectre COSY du composé C1, **B** spectre étalé

- **Spectres hétéronucléaires : HSQC et HMBC**

* Pour les spectres "HSQC", le proton est observé dans la dimension horizontale et le carbone 13 est observé dans la dimension verticale. Seules les interactions directes (carbone-proton situés à une liaison maximum) sont observées.

Les protons ayant été identifiés précédemment, il sera alors facile de déterminer quels carbones interagissent avec. Sur le spectre 2D nous observons une corrélation entre les protons 8-OCH₃ et 5-OCH₃ et les carbones que nous identifions donc comme C8 et C5 respectivement.(Figure 30A). Le procédé sera identique pour les carbones C2', C3, C3', et C4 (Figure 30B).



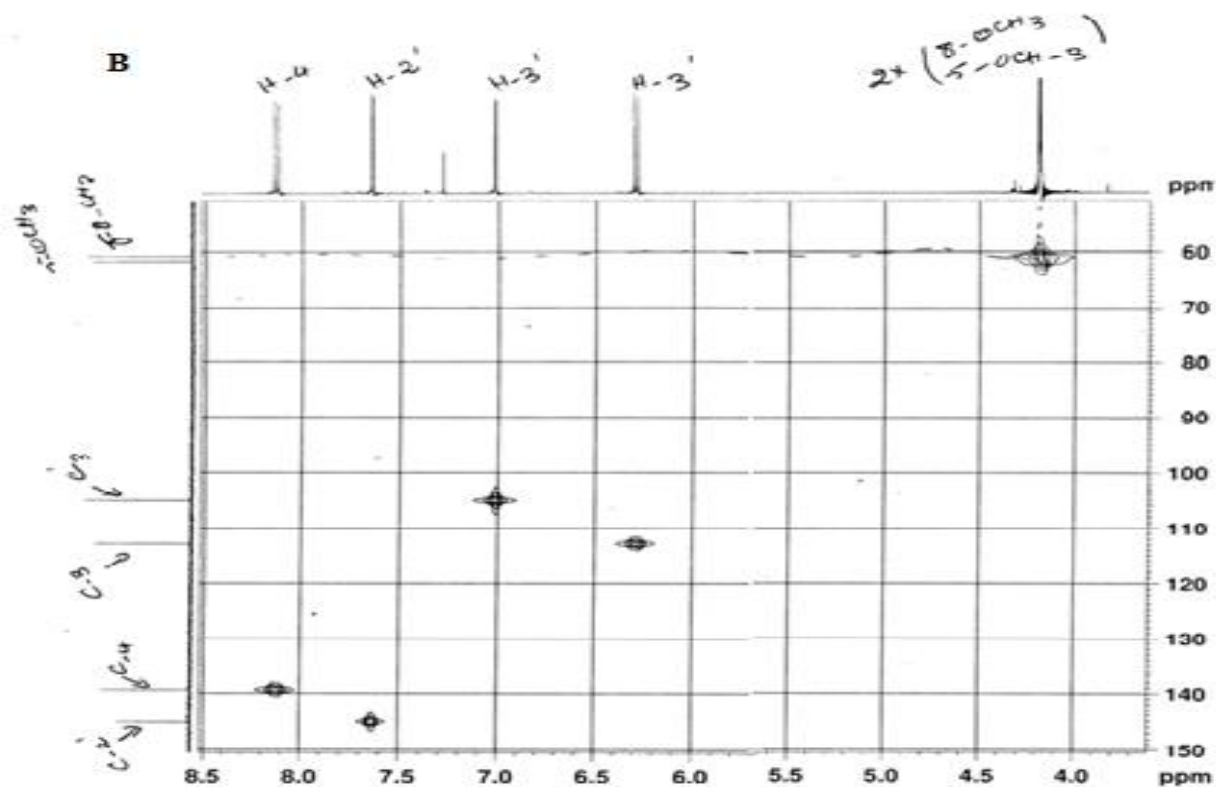


Figure 30. Spectre HSQC du C1

* La fin du raisonnement se fera grâce au spectre HMBC, Nous pouvons observer que C7 et C6 corréleront tout les deux indirectement avec H2' et H3' de plus C2 corréle avec H3 et H4 (Figure 31).

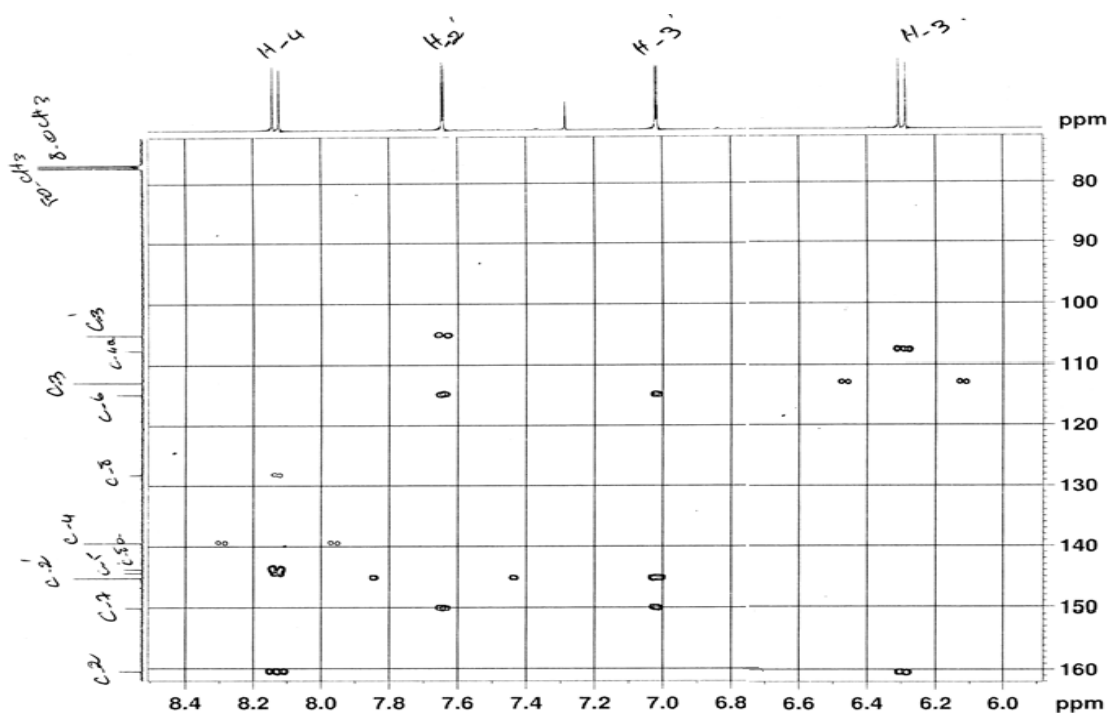


Figure 31. Spectre HMBC du composé C1

En conclusion, les analyses par RMN du ^{13}C et du ^1H du composé C1 indiquent respectivement la présence de 13 carbones et de 10 protons (**Figure 32**).

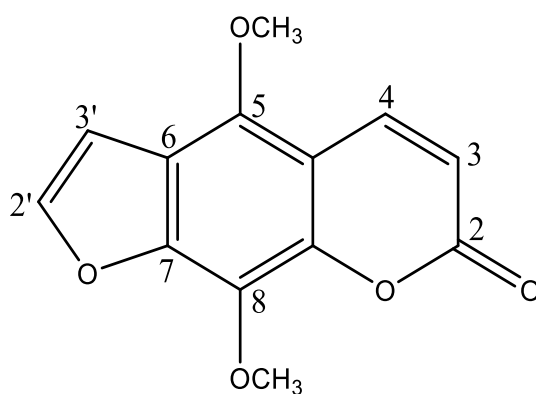


Figure 32. Structure de la molécule du composé C1 : 5, 8- Diméthoxypsoralène

Ce composé identifié pour la première fois dans la plante *T. communis*, il a été identifié dans de nombreuses plantes et récemment a été isolé à partir de la plante *Heracleum platytaenium* (Dincel et al., 2013).

4.2. Identification du composé C2

4.2.1. Spectrométrie de masse

L'analyse du composé C2 (**Figure 33**) par impact électronique en spectrométrie de masse (SM-IE) montre un ion moléculaire ayant un m/z de 309.07335, ce qui est compatible avec la formule brut $C_{16}H_{14}O_5$.

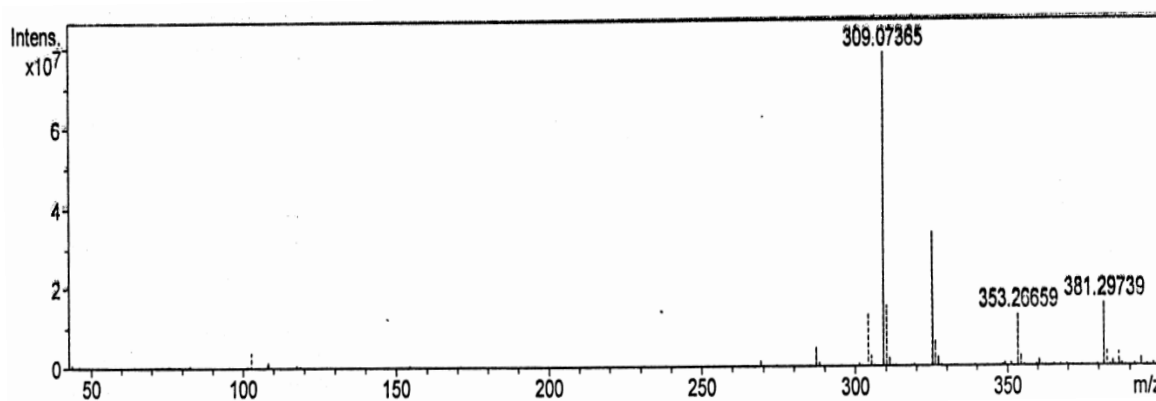


Figure 33. Spectre de masse du composé C2

4.2.2. RMN

4.2.2.1. RMN 1H

En se basant sur le même principe cité dans le premier cas (concernant le C1). L'interprétation du spectre proton 1D a montré une intégration des différents signaux qui indique que les deux signaux résonnant vers δ 1.35 et δ 1.30 ppm comptent pour 3 protons chacun, c'est le cas des deux groupements méthyles $2 \times 3''\text{-CH}_3$ (**Figure 34**), un signal vers δ 4.60 ppm compte pour 2 protons et c'est le cas de $H-1''$. Les autres intégrales comptent pour un seul proton. Leur déplacement chimique est croissant en relation au déblindage (**Tableau 8**).

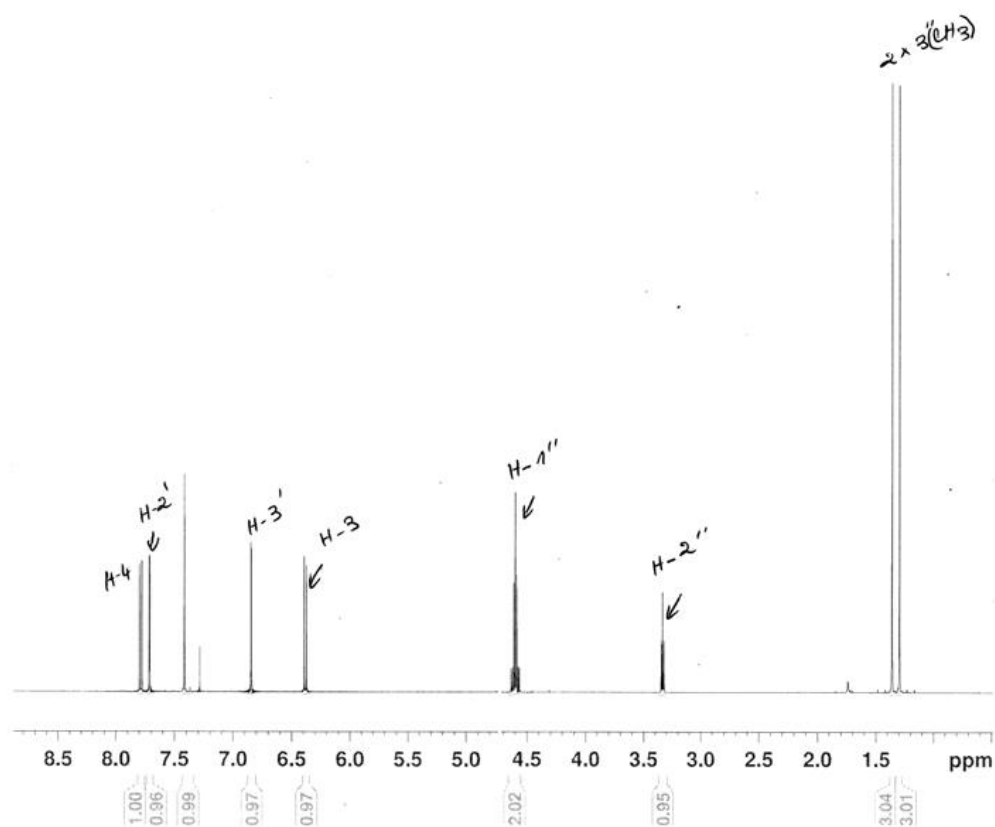


Figure 34. Spectre du RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz)

Tableau 8. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz)

Déplacement chimique ^1H ppm	Intégrale(nombre de protons)	Attribution
1.35	3H	3''-CH ₃
1.30	3H	3''-CH ₃
3.34	1H	H-2''
4.60	2H	H-1''
6.40	1H	H-3
6.85	1H	H-3'
7.72	1H	H-2'
7.79	1H	H-4

4.2.2.2. RMN- ^{13}C

Les analyses par RMN du ^{13}C déterminent la présence de 16 carbones (**Figure 35**).

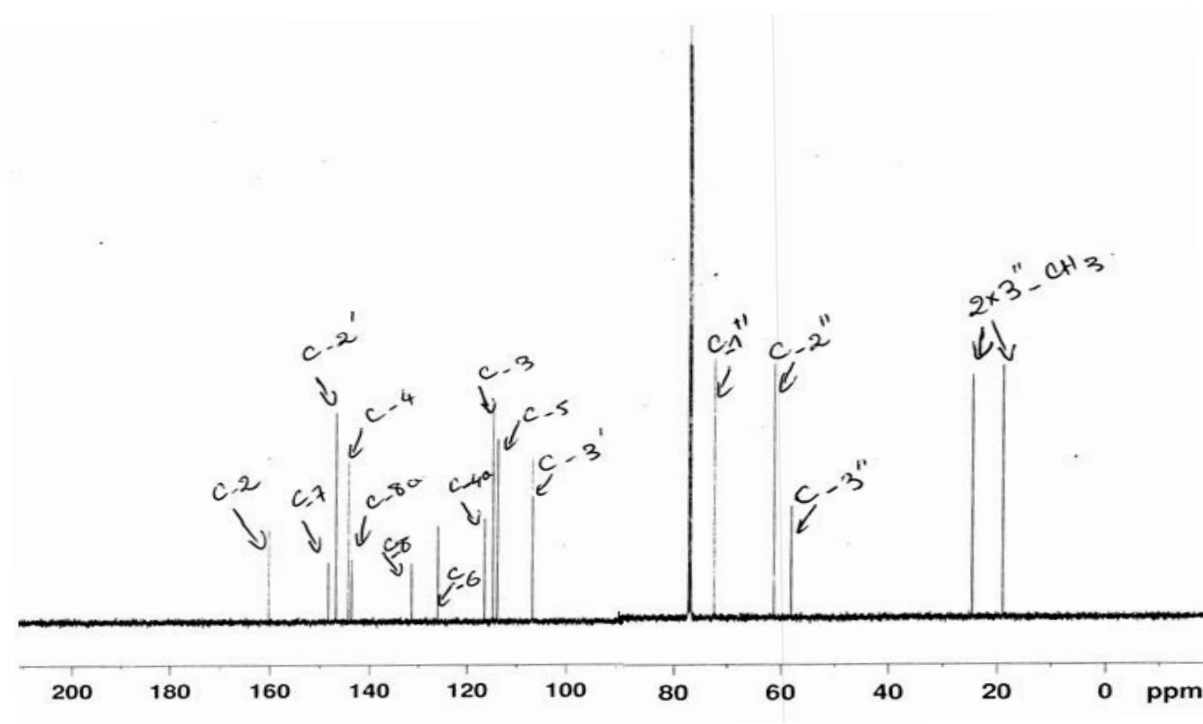


Figure 35. Spectre- RMN- ^{13}C (CDCl₃, 125 MHz)

DEPT : Les spectres DEPT donnent une indication sur la nature des carbones, comme ça été expliqué ci-dessous. Ainsi, les 7 carbones quaternaires C2, C3'', C4a, C6, C7, C8 et C8a n'apparaissent pas sur le spectre DEPT (**Figure 36**) et le carbone secondaire C1'' est négatif en intensité.

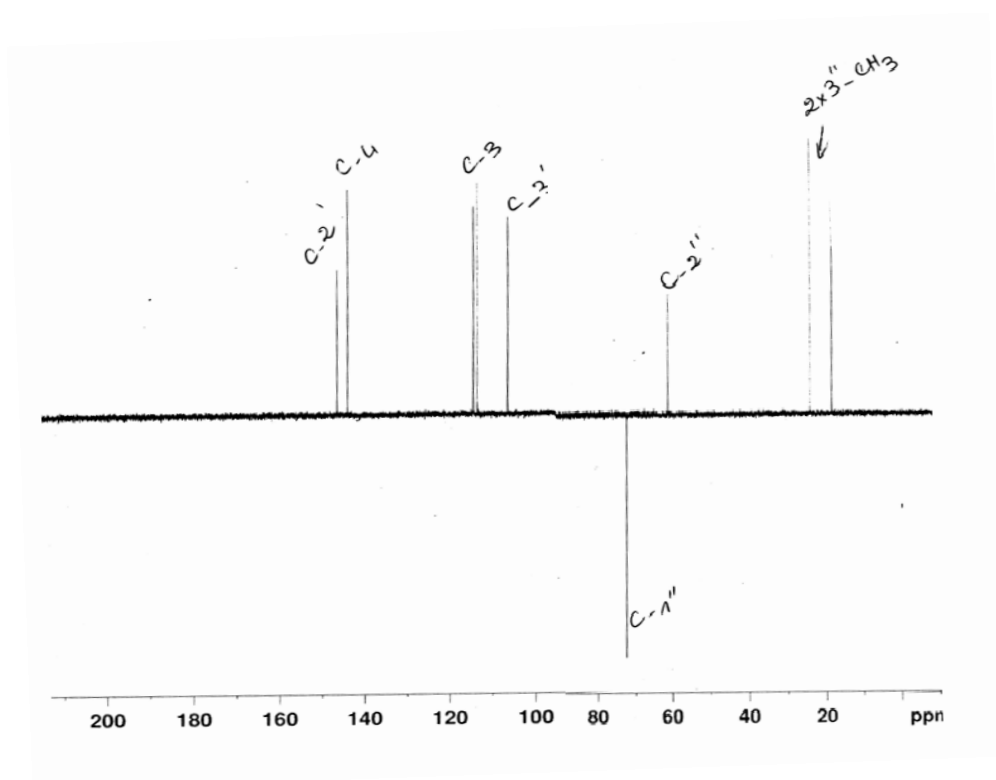


Figure 36. Spectre DEPT du composé C2

4.2.2.3. Spectre 2D

- **Spectre homonucléaire COSY** : sur ce *spectre* on peut observer une corrélation entre H-2'' et H-1'' (**Figure 37A**), mais nous ne pouvons déduire leur emplacement que grâce aux autres spectres. Sur le même spectre étalé, on observe une autre corrélation , entre H-3 et H-4 et entre H3' et H 2' (**Figure 37B**).

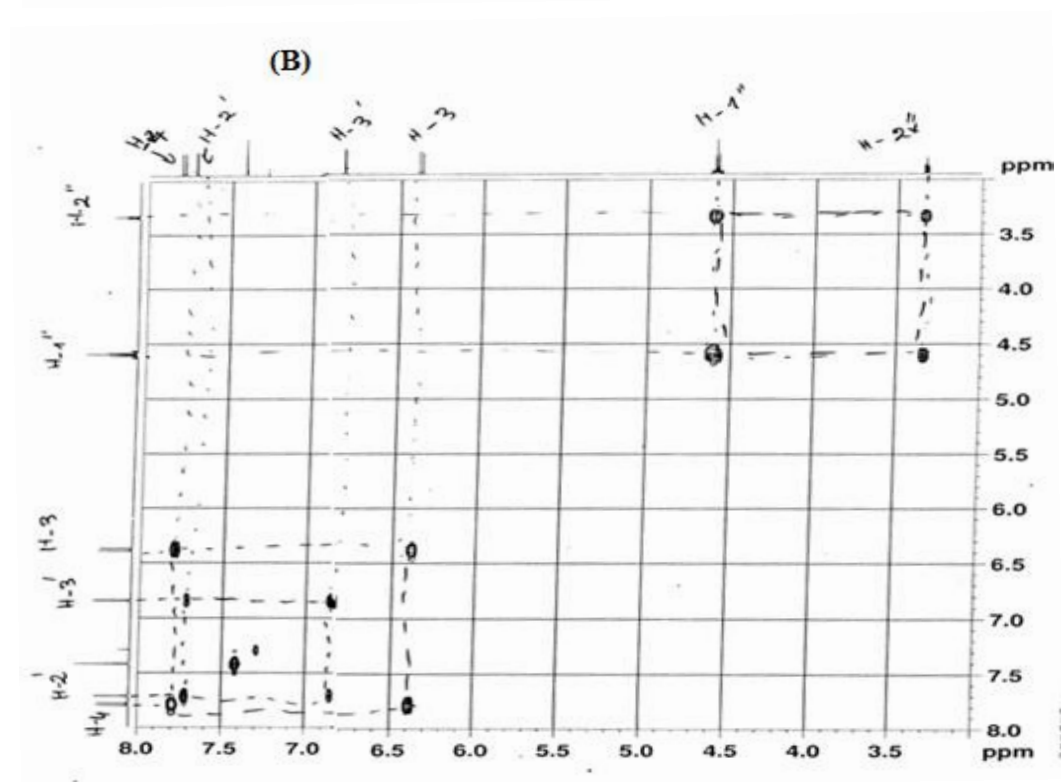
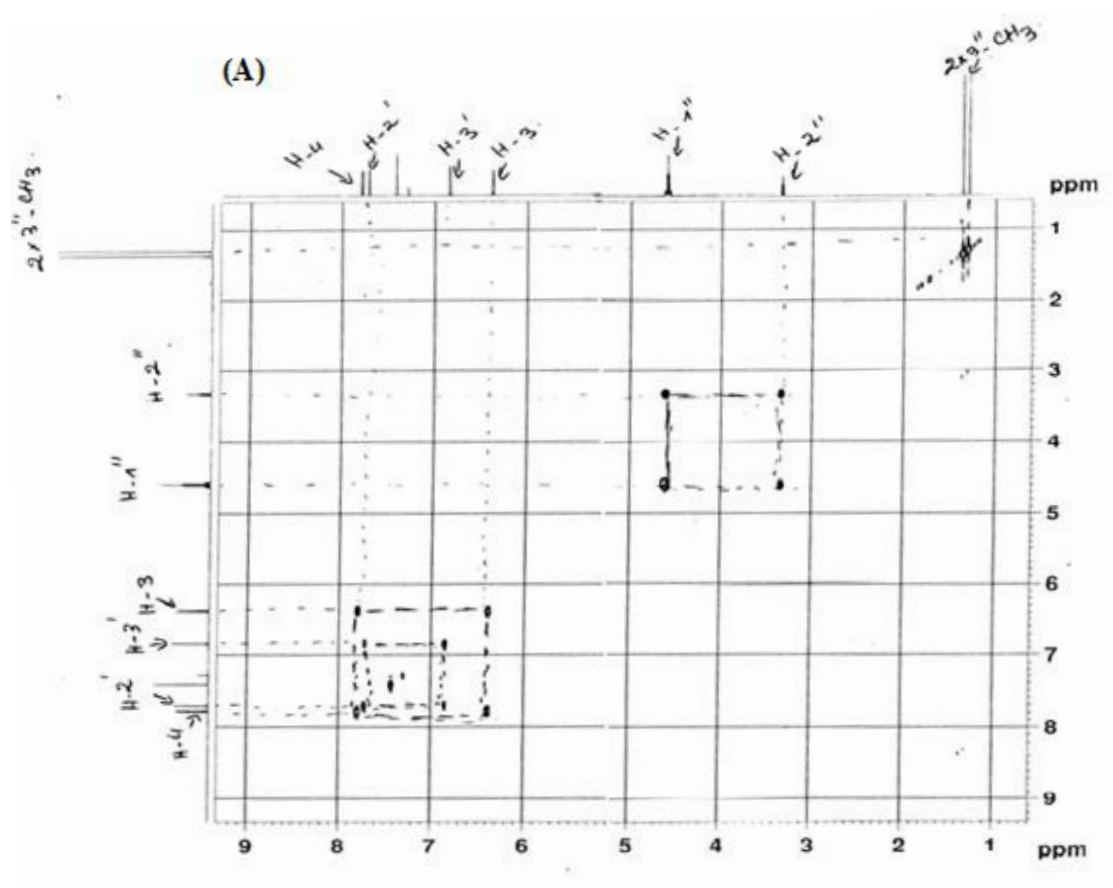


Figure 37. Spectre 2D COSY

Spectre 2D HSQC : Sur le spectre 2D nous observons une corrélation entre les protons $2 \times 3''\text{-CH}_3$ et le carbone que l'on identifie donc comme $C3''$. Le procédé sera identique pour les carbones $C2''$, $C1''$, $C3'$, $C5$, $C3$, $C2'$ et $C4$ (**Figure 38**).

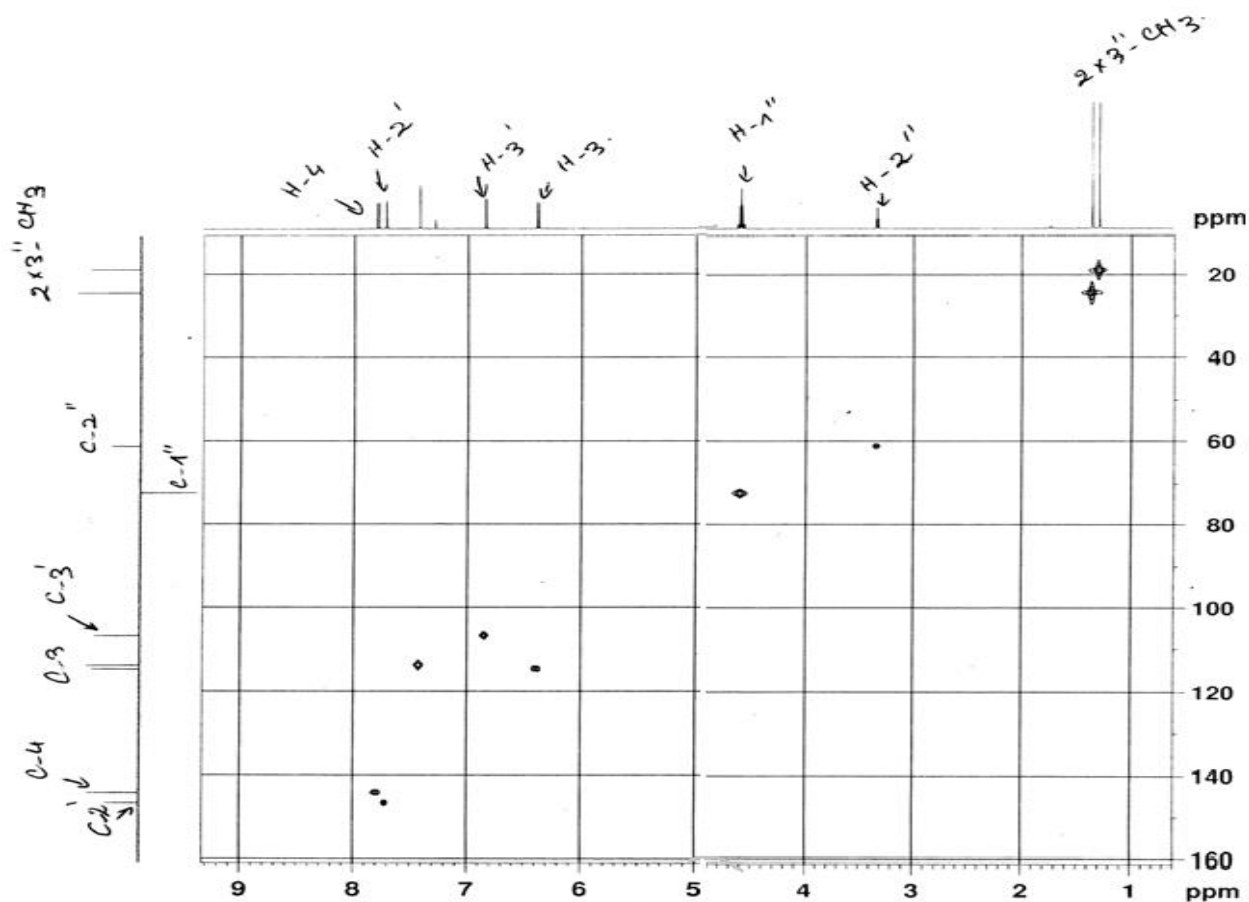


Figure 38. Spectre 2D HSQC du composé C2

Spectre 2D HMBC : La fin du raisonnement se fera grâce au spectre HMBC, Nous pouvons observer que $C2$ corrèle avec $H4$ et $H2$ et encore $C8$ corrèle avec $H1''$ et $C7$ avec $H2'$ et $H3'$, $C6$ avec $H2'$ et $H3'$, $C8a$ avec $H4$, $C4a$ avec $H3$ et $H4$ (**Figure 39**).

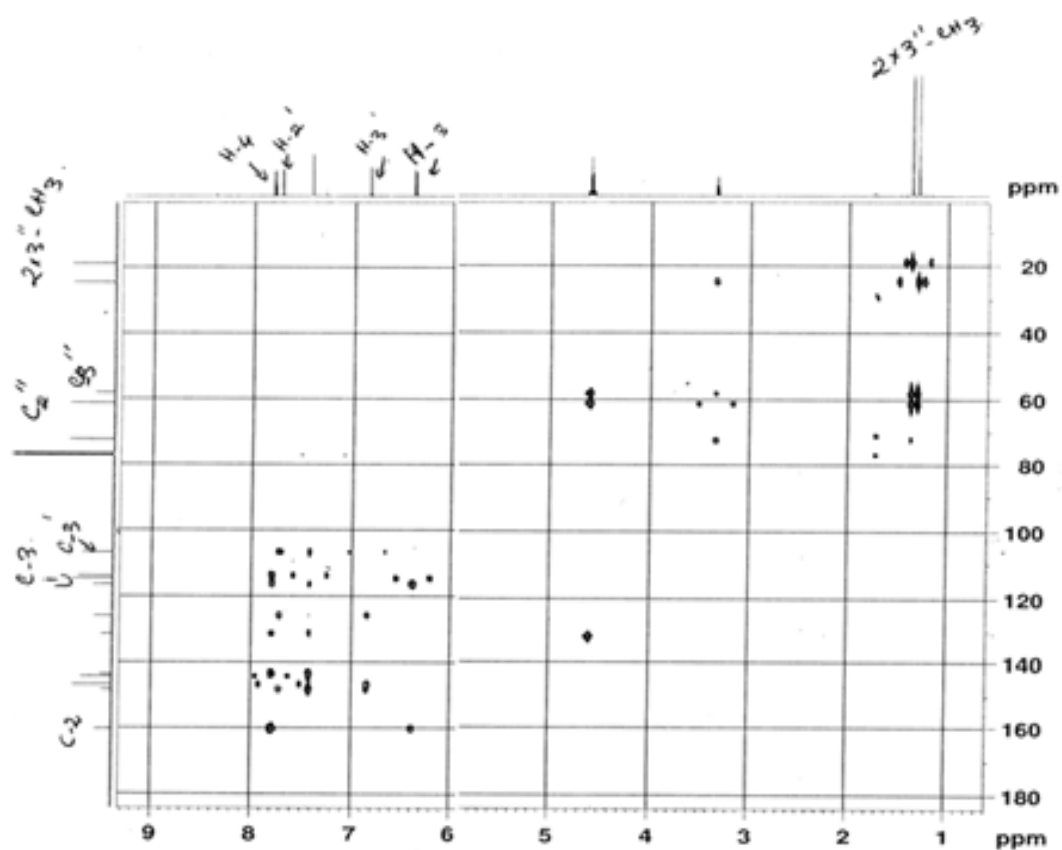


Figure 39. Spectre 2D HMBC du composé C2

L'attribution des carbones est résumée dans le tableau ci-dessous (**Tableau 9**).

Tableau 9. RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz)

Déplacement chimique ^{13}C (ppm)	Attribution
18.9	3''-CH ₃
24.6	3''-CH ₃
58.2	C-3''
61.3	C-2''
72.5	C-1''
106.8	C-3'
113.9	C-5'
114.8	C-3
116.5	C-4a
126.0	C-6
131.5	C-8
143.6	C-8a
146.8	C-2'
144.3	C-4
148.3	C-7
160.3	C-2

En conclusion, les analyses par RMN du ^{13}C et du ^1H du composé 2 indiquent respectivement la présence de 16 carbones et de 14 protons (**Figure 40**).

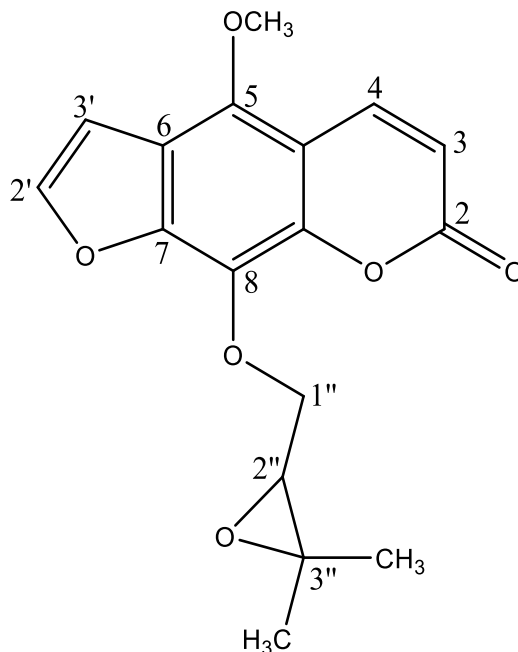


Figure 40. Molécule du composé C2 : héraclénine

Ce composé est identifié pour la première fois dans la plante *T. communis*, il a été identifié dans de nombreuses plantes et récemment a été isolé à partir de *Semenovia transiliensis* (Sondhia et al., 2012).

5. Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des racines de *T. communis*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale du choix de ces composés réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués.

La détermination des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes présents dans les extraits de racines et les fractions obtenues par chromatographie sur colonne de *T. communis*, a

été réalisée en utilisant la méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu (Li et *al*, 2007) et la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Bahorun et *al*, 1996) respectivement.

La méthode de Folin-Ciocalteu est considérée comme la meilleure pour la détermination du taux des polyphénols totaux des extraits de plantes (Djeridane et *al.*, 2010). Cette méthode est avantageuse pour les raisons suivantes ; **(I)** c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, **(II)** la disponibilité du réactif de Folin et la méthode qui est bien standardisée, **(III)** la grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, **(IV)** c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants alimentaires à travers le monde (Huang et Prior, 2005).

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que la fractions FII est la plus riche en composés polyphénols (**Figure 41**) ($73,143 \pm 0.09$ mg EAG/g E) suivie par l'EMeOH ($69,786 \pm 0.10$ mg EAG/g E), le reste des fractions et l'EBr présentent une teneur plus faible (**Tableau 10**).

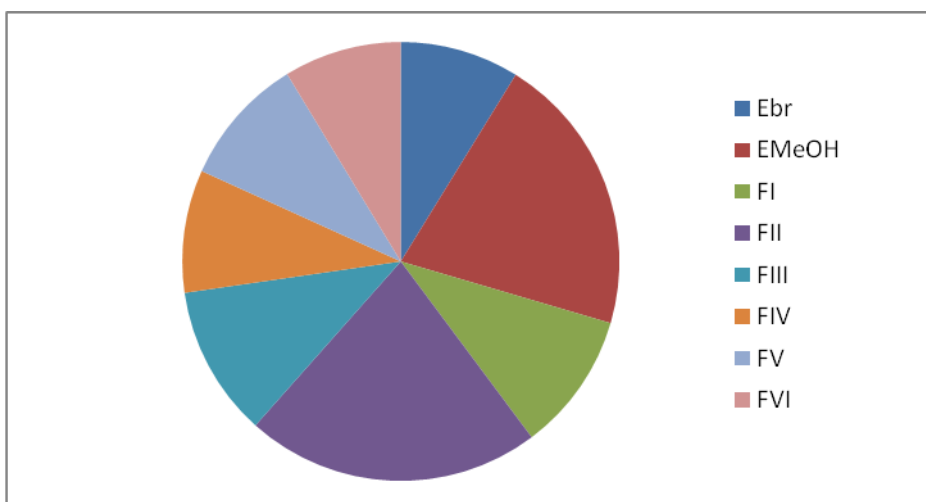


Figure 41. La teneur en polyphénols totaux estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu

Les flavonoïdes comme composés les plus intéressants des polyphénols sont aussi déterminés dans ce travail par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et montre que l'extrait EMeOH est le plus riche ($8,080 \pm 0.07$ mg EQ/g E, $19,387 \pm 0.011$ mg ER/g E) suivie par l'extrait EBr ($2,091 \pm 0.05$ mg EQ/ g E, $3,404 \pm 0.030$ mg ER/g E) alors que les fractions obtenues par chromatographie en sont très pauvres, dont la teneur varie entre $0,141 \pm 0.09$ E Q /mg E, $0,487 \pm 0.07$ E R /mg E pour la fraction FIV et $0,621 \pm 0.04$ mg E Q / g E, $1,479 \pm 0.03$ mg ER/ g E pour la FIII , à l'exception de la fraction FII qui renferme une teneur plus ou moins élevée que les autres fractions.

Tableau 10. Teneur des Polyphénols totaux et des flavonoïdes des extraits/fractions des racines de Tc.

Extraits	Polyphénols Totaux (mgEAG/g d'extrait)	Flavonoïdes	
		mg EQ/g d'extrait	mg ER/g d'extrait
EBr	$29,571 \pm 0.11^a$	$2,091 \pm 0.05^{a'}$	$3,404 \pm 0.030^{a''}$
EMeOH	$69,786 \pm 0.10^b$	$8,080 \pm 0.07^c$	$19,387 \pm 0.11^{b''}$
FI	$34,500 \pm 0.03^a$	$0,321 \pm 0.07^{b'}$	$0,962 \pm 0.02^{a''}$
FII	$73,143 \pm 0.09^b$	$0,755 \pm 0.04^{b'}$	$2,092 \pm 0.007^{a''}$
FIII	$37,500 \pm 0.06^a$	$0,621 \pm 0.04^{b'}$	$1,479 \pm 0.03^{a''}$
FIV	$30,5 \pm 0.06^a$	$0,141 \pm 0.09^{b'}$	$0,487 \pm 0.07^{c'}$
FV	$32,071 \pm 0.03^a$	$0,394 \pm 0.07^{b'}$	$1,070 \pm 0.26^{a''}$
FVI	$29,214 \pm 0.03^a$	$0,359 \pm 0.02^{b'}$	$0,954 \pm 0.06^{a''}$

La teneur en composés phénoliques est exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique (mg AG); celle des flavonoïdes en mg équivalent de Quercétine (mg EQ) et en mg équivalent de rutine (mg ER). Ces résultats se rapportent à un gramme d'extrait. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures $\pm$ SD. Les valeurs d'une même colonne affectées de mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $P > 0,05$ celles dont les valeurs sont différentes $p < 0.05$.

On s'aperçoit (**Tableau 10**) que la teneur en rutine pour tout les extraits étudiés est largement élevée par rapport à celle de la teneur en Quercétine ($p < 0.05$). L'EMeOH est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait brut ne l'est, sachant que l'extrait EMeOH étant soluble dans le méthanol, est séparé de la fraction non soluble, de ce fait il se montre plus concentré que l'EBr.

Les résultats du dosage montrent aussi que la proportion en polyphénols est nettement supérieure à celle des flavonoïdes, ceci suggère que les polyphénols présents ne sont pas tous des flavonoïdes, il peut y avoir présence d'autres polyphénols tels que les tanins catéchiques ainsi que les coumarines qui ont été mis en évidence dans nos travaux. D'autres classes de polyphénols peuvent être présents tels que les phénanthrènes isolés par des travaux ultérieurs (Al-Khateeb et *al.*, 2012).

Ces rapports permettent de conclure que la variation des flavonoïdes n'est pas relative à celles des polyphénols, cela peut être expliqué par la prépondérance des polyphénols non flavonoïdes.

Les résultats du dosage des polyphénols signalent aussi que les extraits/fractions et en particulier l'EMeOH sont riches en polyphénols, cela pourrait être relié aux conditions climatiques dures des endroits où elles poussent (température élevée, grande exposition au soleil, la sécheresse et la salinité qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires, notamment les polyphénols (Falleh et *al.*, 2008).

En fait, la solubilité des polyphénols est gouvernée par le type de solvant utilisé, leur degré de polymérisation, de leur interaction avec d'autres constituants et la formation de complexes insolubles. Pour une récupération importante de polyphénols, le méthanol est le solvant approprié (Falleh et *al.*, 2008). Selon Seidel (2005), l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires qui extraient particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins. Tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool (Marston et Hostettmann, 2006). Néanmoins, ceci n'est pas toujours le cas, car Ozen et ses collaborateurs (2011) ont trouvé que l'extrait aqueux de *Thymus praecox* était plus riche en polyphénols que l'extrait méthanolique. Cela est expliqué par la présence d'un grand nombre de molécules solubles dans l'eau et non solubles dans l'alcool.

6. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

6.1. Effet capteur du radical DPPH

A température ambiante, le radical DPPH présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance capable de saturer sa couche électronique. Cette réduction de la couleur rend compte du pouvoir piègeur des molécules testées. Ainsi toute substance capable d'induire un changement de couleur du DPPH du violet au jaune est considérée comme un piègeur du radical DPPH et par conséquent comme antioxydant (Nabavi et *al.*, 2012).

La méthode DPPH a reçu la plus grande attention en raison de sa rapidité, sensibilité, commodité et de sa reproductibilité (Nur Alam et *al.*, 2013).

L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée par la méthode de Cuendet et ses collaborateurs (1997) ; Burits et Bucar (2000). Les résultats montrent que l'effet scavenger des fractions sur le radical DPPH est très significatif ($p < 0.001$, en les comparant avec le contrôle) et d'une manière dose-dépendante. L' IC_{50} expriment la concentration capable de piéger 50% du radical DPPH dans le milieu, paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est élevé (Brand-Williams et *al.*, 1995; Atoui et *al.*, 2005). Ainsi on note que l'EMeOH ($0,1187 \pm 0,025 \text{ mg/ml}$) et EBr ($0,2363 \pm 0,019 \text{ mg/ml}$) possèdent l'activité antioxydante la plus efficace comparés aux fractions étudiées qui présentent une activité notable. L'ordre d'efficacité des fractions est le suivant FII ($1.040 \pm 0,070 \text{ mg/l}$) > FVI > ($1,14 \pm 0.12 \text{ mg/ml}$) > FV ($1,210 \pm 0,087 \text{ mg/ml}$) > FIII ($1.23 \pm 0.09 \text{ mg/ml}$) et enfin la FI, étant la fraction la plus faible (**Figure 42**). L'effet antiradicalaire des composés purs C1 et C2 a été également élucidé par la méthode de DPPH et les résultats indiquent que le composé C2 : l'héraclinine est plus actif ($p < 0.01$) ($IC_{50} = 1,25 \pm 0,021 \text{ mg/ml}$) que le composé C1: le 5,8 diméthoxypsoralène ($IC_{50} = 1,67 \pm 0,086 \text{ mg/ml}$). Par comparaison avec les fractions dont ils dérivent, il s'avère que les deux composé C1 et C2

présentent une activité légèrement plus faible que FIV et FV, seulement cette différence est non significative ($p > 0.05$) (**Figure 42**).

Une différence d'activité significative observée ($P < 0,05$) entre la IC_{50} de EBr initial, l'EMeOH et toutes les fractions isolées à partir de ce dernier, est peut être associée à des flavonoïdes et le contenu phénolique (Nabavi et al., 2012). L'activité antioxydante ne peut être attribuée seulement aux polyphénols mais à d'autres composés présents (tanins, saponines, phénanthrènes) dont leur teneur et leur activité antioxydante au niveau des végétaux est non négligeable (Mota, 1985).

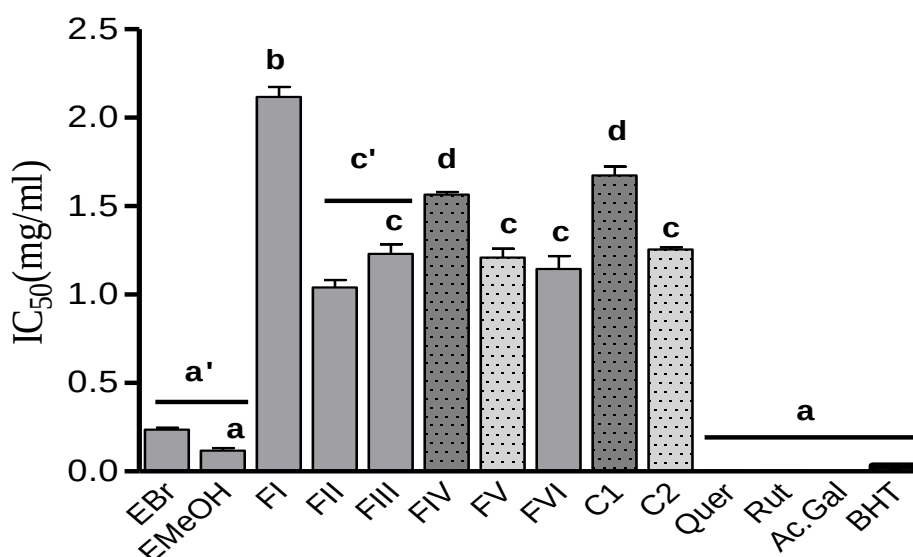


Figure 42. IC_{50} des différents extraits/ fractions des racines de *T.communis*, des deux composés purs C1,C2 et des composés phénoliques (Rutine, Quercétine, Acide gallique) avec un standard (BHT). Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD ($n = 3$). a, b, c, c', d: représentent l'aspect significatif ($p < 0.05$). Le test de la comparaison des variances est non significatif pour les histogrammes surmontés de la même lettre.

6.2. Test de β -carotène / acide linoléique

Le test au β -carotène est largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des composés bioactifs du fait que le β -carotène est extrêmement susceptible aux radicaux libres, dérivés hydro peroxydes résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Kumazawa et al.,

2002). Ces derniers attaquent le chromophore du β -carotène, résultant en une décoloration de l'émulsion réactionnelle qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 470 nm (Barros *et al.*, 2007). Un extrait capable de retarder / inhiber l'oxydation du β -carotène peut être décrit comme un capteur de radicaux libres et antioxydant primaire (Liyana-Pathirana et Shahidi, 2006).

Le blanchissement du β -carotène suivi pendant 24 heures, est ralenti fortement durant toute cette période en présence de tous les extraits et particulièrement les deux extraits EBr et EMeOH (**Figure 43**). L'évaluation de l'activité des extraits /fractions est comparée à celle du BHT dont le pourcentage d'inhibition est de $95,53 \pm 1,57$ % à la même concentration (2mg/ml) (**Figure 44**). Le pourcentage d'inhibition le plus élevé est celui de l'EMeOH ($91,47 \pm 1,48\%$), presque semblable à celui du BHT ($P > 0.05$), suivi de l'EBr ($79,31 \pm 0,75\%$) ($p < 0.01$), ensuite les fractions, dont les moins actives sont la FIV ($45,07 \pm 1,97\%$) et la FVI ($47,25 \pm 0,25$) ($P > 0.05$), la plus active des fractions est la FII ($67,60 \pm 0,2$). Il n'existe pas de différence significative entre l'activité du reste des fractions FI ($52,16 \pm 2,75\%$), FIII ($52,68 \pm 1,38$) et FV ($51,23 \pm 0,08$) ($P > 0.05$). Les deux composés C1 et C2 isolés de la FIV et FV respectivement inhibent considérablement l'oxydation du β -carotène ($66,03 \pm 0,64\%$, $72,69 \pm 1,87\%$ respectivement).

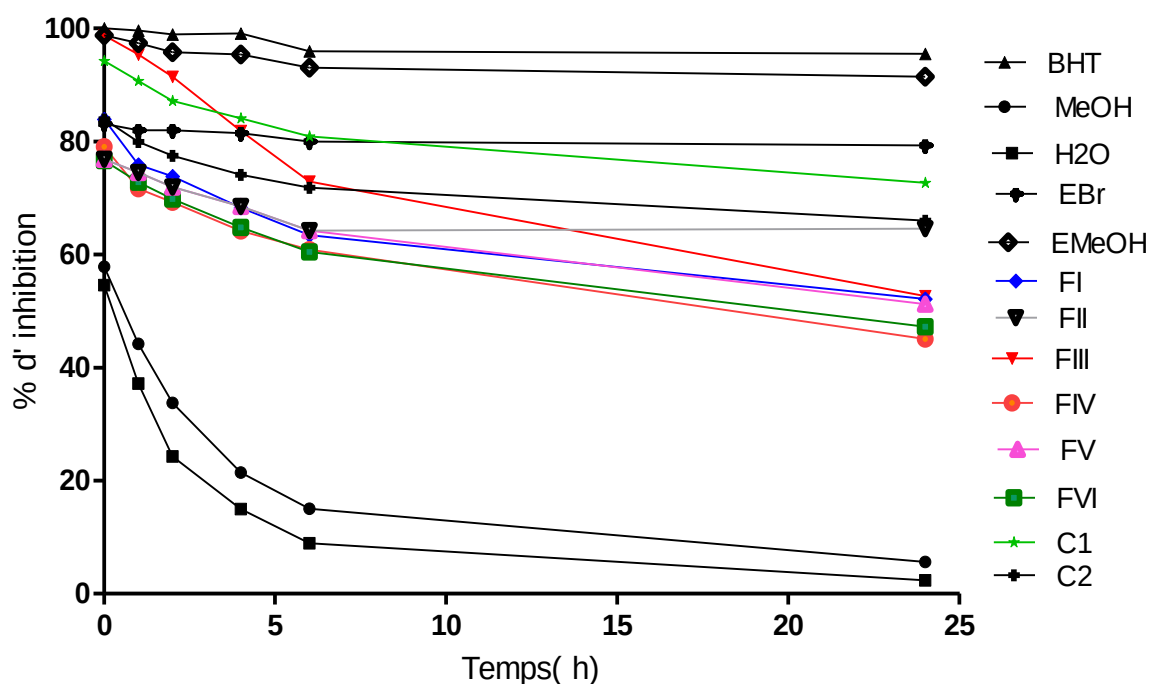


Figure 43. Activité antioxydante des extraits des racines de *T.communis* et des composés purs C1,C2 par rapport au BHT, MeOH et H₂O par le test de β -carotène / acide linoléique. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3).

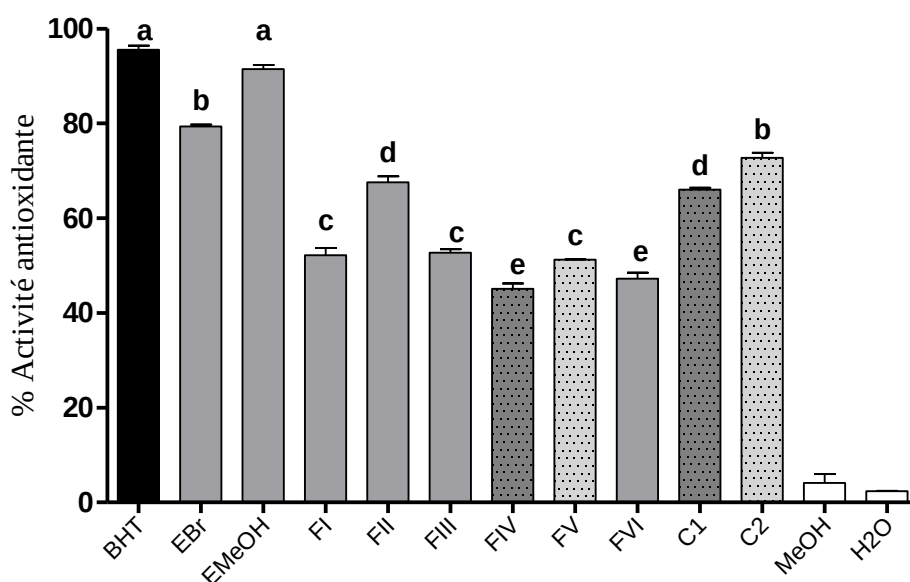


Figure 44. Activité antioxydante des extraits/fractions des racines de *T.communis*, C1,C2, BHT, MeOH et H₂O (après 24 h) par le test de β -carotène / acide linoléique. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3). Les différentes lettres indiquent des activités significativement différentes (p < 0,05).

Cet effet est dû soit à l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique ou au piégeage des radicaux hydroperoxydes issus de la peroxydation de l'acide linoléique (effet scavenger) (Tepe et *al.*, 2005; Aslan et *al.*, 2006). Les résultats suggèrent que les extraits/fractions des racines de *T.communis* ont une capacité considérable de réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires. La forte activité de l'EMeOH est fort probablement attribuée à leur contenu phénolique et flavonoïde, l'activité des autres fractions telle que la fraction FIV (la plus faible), s'explique probablement par une faible polarité (dans l'émulsion) attribuée à cette dernière. Les valeurs du pourcentage de l'activité antioxydante après 24 h (AA %) des deux composés sont plus élevées que les deux fractions FIV et FV dont ils sont extraits. Les deux composés C1 : 5, 8 dimethoxypsoralène et C2 : l'héraclénine sont des coumarines dont la structure se présente comme molécule apolaire qui leur affecte cette haute activité, contrairement aux fractions FIV et FV qui sont composées d'un mélange de produits qui peuvent être polaires ou apolaires Frankel et Meyer (2000). De Plus, des études ont montré que l'effet antioxydant des sources naturels est dû à leurs composés phénoliques (Yang et *al.*, 2002; Nagai et *al.*, 2003) et notre étude le confirme étant donné que les deux Composés purs, C1 et C2 sont des coumarines faisant partie des polyphénols (Macheix et *al.*, 2006).

Les deux auteurs, Frankel et Meyer (2000) ont suggéré que la solubilité d'un extrait dans l'émulsion est importante, les extraits apolaires présentent des propriétés antioxydantes plus importants car ils sont concentrés au sein de l'interface eau-lipide, aidant ainsi à prévenir la formation de radicaux libres et parallèlement l'oxydation des lipides et que les extraits polaires se trouvent dilués dans la phase aqueuse et sont donc moins efficaces.

6.3. Pouvoir réducteur

Les composés qui sont doués d'une capacité réductrice indiquent qu'ils sont des donneurs d'électron et peuvent réduire les intermédiaires oxydées des processus de peroxydation de lipide, de sorte qu'ils puissent agir en tant qu'antioxydant (Chanda et Dave, 2009). Les réducteurs présents induisent la réduction du complexe Fe^{3+} /ferricyanide en Fe^{2+} .

La capacité réductrice de l'EMeOH, de l'EBr et FII est montrée dans la **Figure 45**. Les résultats ainsi représentés montrent que la capacité réductrice est proportionnelle à la concentration de nos échantillons.

Les concentrations effectrices (CE_{50}) des extraits, rapportés sur la **Figure 46** montrent que l'EMeOH, l'EBr et la fraction FII présentent un potentiel réducteur avec des CE_{50} de 0.609 mg/ml, 1,014 mg/ml et 1,104 mg/ml respectivement. Ce pouvoir réducteur reste inférieur à celui du BHT et de la Vit C ($p < 0.001$) dont les CE_{50} sont de 7.977 μg /ml et 7.033 μg /ml respectivement.

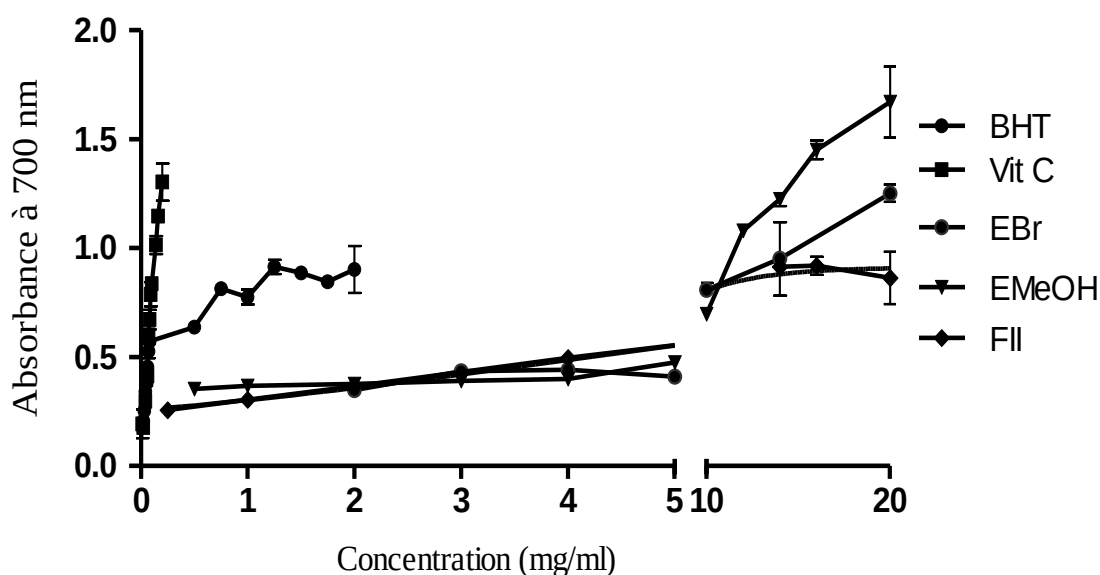


Figure 45. Pouvoir réducteur des EBr, EMeOH et FII des racines de *T. communis*, du BHT et de la Vit C à 700 nm. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=3).

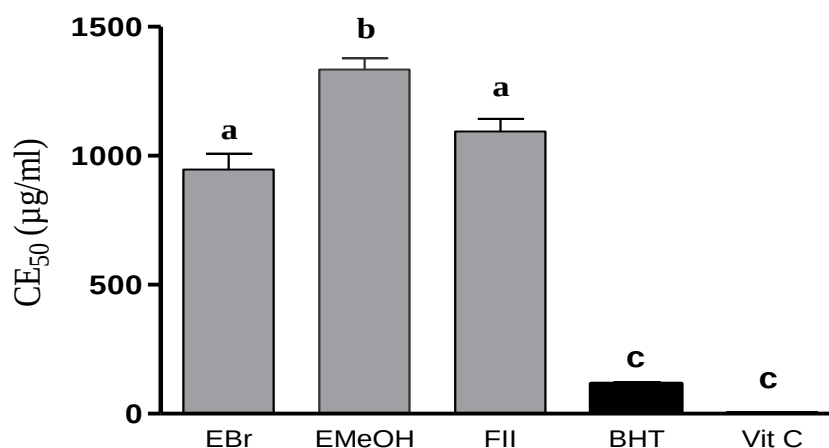


Figure 46. Histogrammes exprimant la concentration efficace (µg/ml) permettant la réduction de 50 % du fer. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=3). Les bars avec les différentes lettres indiquent des activités significativement différentes ($p < 0,05$).

IL existe une bonne corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en polyphénols et flavonoïdes des deux extraits notamment l'EMeOH et l'EBr et une corrélation négative avec la teneur en polyphénols pour la fraction FII (**Tableau 10**). Cette différence de corrélation peut être attribuée à la nature des composés polyphénols qui sont responsables de l'activité antioxydante. Il est important, par ailleurs de signaler que Chimi et ses collaborateurs (1991) ont démontré que les composés polyphénols se dégradent avec le temps qui a pour conséquence une diminution de leur activité antioxydante est que leur vitesse de dégradation à été positivement corrélée à leur efficacité antioxydante négative. Ozen, (2009) a trouvé que l'extrait méthanolique de *Thymus praecox* étant le plus pauvre en composés polyphénols mais possède le pouvoir réducteur du fer le plus important que tous les autres extraits testés à savoir les extraits aqueux, éthanolique, acétonique et hexanique.

En revanche, les composés purs qui sont des coumarines faisant partie des polyphénols ne présentent aucune activité cela s'explique par le fait que les extraits EBr, EMeOH et la FII contiennent en plus des polyphénols, des flavonoïdes qui sont considérés les principaux donneurs d'électrons (Le et *al.*, 2007).

6.4. Chélation du fer ferreux

Parmi les espèces d'ions métalliques, les ions Fe^{2+} sont les pro-oxydants les plus puissants à cause de leur réactivité élevée (Gulcin et *al.*, 2010). Ils catalysent la décomposition des hydroperoxydes en radicaux alkoxy et peroxy, amplifiant la peroxydation des lipides (Pincemail et *al.*, 2002). La chélation des ions métalliques mènent à bloquer la réaction de type Fenton génératrices de radicaux $\text{OH}\cdot$. De plus, les extraits ou les composés ayant l'activité de chélation sont censés pour empêcher la peroxydation de lipide en stabilisant les métaux de transition (Wu et Ng, 2008). La ferrozine peut quantitativement former des complexes avec les ions Fe^{2+} libres. En présence d'autres agents de chélation, la formation du complexe Fe^{2+} -ferrozine est perturbée. Il a été montré que les agents chélateurs sont efficaces en tant qu'antioxydants secondaires, parce qu'ils réduisent le potentiel redox stabilisant de ce fait la forme oxydée de l'ion métallique (Suresh-Kumar et *al.*, 2008). C'est la raison pour laquelle une diminution de l'absorbance du complexe Fe^{2+} -ferrozine indique la présence d'antioxydants chélateurs (Le et *al.*, 2007).

Les résultats obtenus montrent que les extraits de *T.communis* exercent un effet chélateur dose dépendante (**Figure 47**). Toutefois, l'effet chélateur maximal de 77.878% et 77.274% par l'EBr et l'EMeOH est atteint à des concentrations élevées (5,625mg/ml et 3,125mg/ml respectivement). L'EDTA exerce un effet chélateur de 73.143% à une concentration de 14,687µg/ml. La différence entre l'activité de ces deux extraits EBr et EMeOH et l'EDTA utilisé comme standard est statistiquement très significatives ($p < 0,001$).

À partir des profils de chélation obtenus (**Figure 48**), il semble que la linéarité des tracés avant la saturation est plus importante dans le cas de l'EDTA, cependant pour les extraits cette linéarité est moins importante. Cela reflète simplement la nature complexe des extraits contenant un ou plusieurs chélateurs ayant des affinités différentes pour le fer, en concurrence avec la Ferrozine (Kolayli et *al.*, 2004).

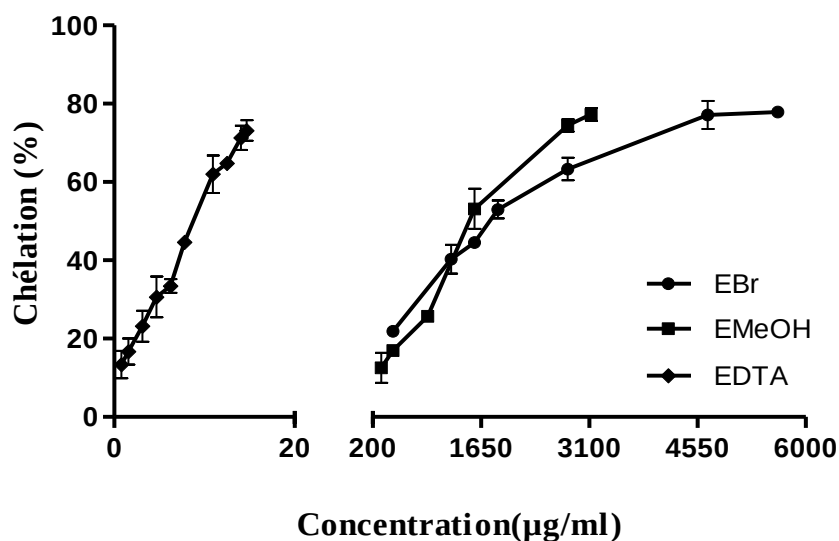


Figure 47. Activité chélatrice de l'EMeOH, l'EBr des extraits de racines de *T.communis* et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux, exprimé en pourcentage de chélation. Les valeurs représentent les moyennes $\pm$ SD (n=3).

La concentration inhibitrice IC_{50} de l'EBr ($2,158 \pm 0,298$ mg/ml) n'est pas très différente que celle de l'EMeOH ($1,774 \pm 0,110$ mg/ml) ($p > 0.05$) (**Figure 48**), pourtant la différence au niveau de la composition en polyphénols et flavonoïdes des ces deux extraits est nette ($p < 0.001$), rappelant que l'EBr est moins riches (**Tableau 10**).

Ce résultat est expliqué par les travaux de Sahreen et ses collaborateurs (2010) qui montrent que les extraits de plante induisent des effets chélateurs directement proportionnels à la polarité de leurs solvants. Aussi les travaux menés par Watanabe, 2008 expliquent que, les mucilages sont des polysaccharides solubles dans l'eau et insolubles dans l'alcool et sont caractérisés par leurs propriétés chélatrices. On estime alors que l'EBr contient des composés autres que les polyphénols mais doués de capacité chélatrice. D'ailleurs, des travaux montrent que les composés phénoliques ne pourraient pas chélater des métaux de transition si ces derniers ne possèdent pas les groupes fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice (Wong et al., 2006).

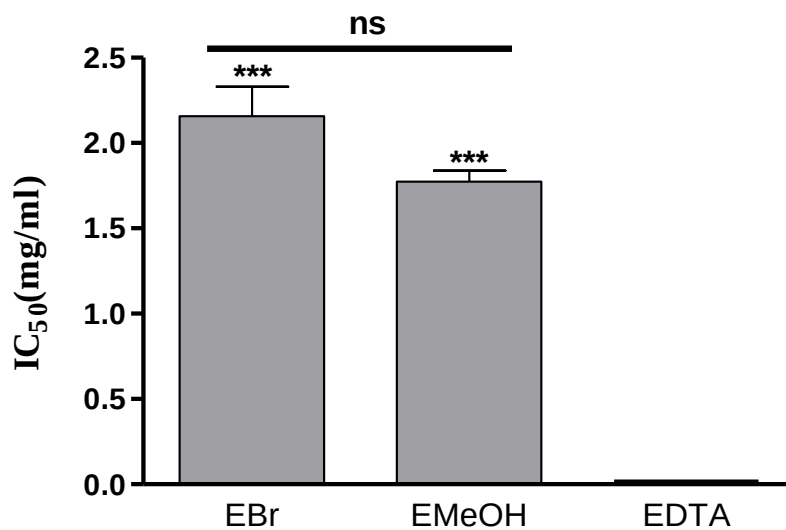


Figure 48. Histogramme exprimant les concentrations nécessaires pour la chélation de 50 % du fer des différents extraits en mg/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais $\pm$ SD ; *** : $p < 0.001$.

De nombreuses études ont évalué l'effet chélateur des ions ferreux par les extraits de diverses plantes. L'étude menée par Le et ses collaborateurs (2007) montre que la concentration effectrice de l'extrait éthanolique des fruit de *Lycium barbarum* est de l'ordre de 10 mg/ml. De plus l'activité chélatrice de la plante *Nigella sativa* investiguée par Bourgou et son équipe (2008), ont obtenu des valeurs de 7,5 mg /ml et 3,8 mg/ml pour les racines et les tiges de *Nigella sativa* respectivement. Ces valeurs comparées à celles obtenues dans notre étude, reflète l'importante activité chélatrice révélée par les deux extraits EMeOH et EBr des racines de *T.communis*.

Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme de bons chélateurs des ions métalliques (Morris *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1998). La FII ayant une teneur en polyphénols supérieure à celle de l'EMeOH, ne présente aucune activité chélatrice, même cas pour le reste des fractions. La présente étude montre une corrélation faible et non significative ($r^2 = 0.15$, $p > 0.05$) entre le pouvoir chélateur des extraits des racines de *T.communis* et leurs teneurs en composés phénoliques. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux récents, à titre d'exemple, dans une étude menée sur des extraits de quatorze variétés

d'orge (Zhao *et al.*, 2008). La capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés (Van Acker *et al.*, 1996). Donc un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas chélater les métaux de transition si ses polyphénols ne disposent pas des groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice. Les ligands bidentates sont des chélateurs plus puissants que les monodentates, par exemple un groupement catéchol se lie fortement au fer contrairement à un groupement phénol, de même la conjugaison d'un composé phénolique avec une partie glucidique entraîne la perte de l'activité chélatrice (Wong *et al.*, 2006).

Les autres fractions (FI, FIII, FIV, FV, FVI) et les composés purs (C1 et C2) se sont montrées inactifs vis-à-vis de la réduction et la chélation du Fer évalués par les deux méthodes citées ci-dessus. Ces constatations pourraient indiquer que les composés phénoliques ne sont pas les principaux chélateurs et réducteurs présents dans les extraits qui sont en fait un mélange complexe d'acides organiques, d'acides aminés et de sucres qui peuvent contribuer également à la séquestration des métaux de transition (Wong *et al.*, 2006 ; Chan *et al.*, 2007).

6.5. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique

Dans la suite de ce chapitre, nous avons souhaité évaluer la contribution de l'effet inhibiteur de la peroxydation des lipides à l'activité antioxydante selon la méthode au thiocyanate ferrique (FTC) (Takao *et al.*, 1994). Les deux composés purs C1 et C2 ont été testés en priorité en comparaison avec l'extrait EBr initial, l'EMeOH, la FIV et la FV d'où ils ont été isolés.

Les résultats indiquent que le taux d'inhibition de l'EBr ($86,23 \pm 0,057$), de l'EMeOH ($87,56 \pm 1,13$) et du C1 ($89,9 \pm 0,1$) est très élevé et similaire à celui du BHT ($86,03 \pm 0,45$) ($p > 0.05$) (**Figure 49**). Aussi, FIV ($73,53 \pm 4,08$), FV ($71,6 \pm 3,48$) et C2 ($74,63 \pm 3,67$) inhibent la peroxydation lipidique à des taux inférieurs à celui du BHT ($P < 0.001$), cependant ces taux d'inhibition sont largement supérieurs à celui de la Vit C ($54,7 \pm 1,56$) ($P < 0.001$). Selon la

littérature, la vitamine C est un fort réducteur de la peroxydation et peut protéger la membrane de la cellule et le composant cytosolique de cellules contre les dommages induits par les oxydants (Coppen *et al.*, 1983). Cela prouve que ces extraits sont doués d'une bonne activité inhibitrice vis à vis de la peroxydation lipidique du moment qu'ils se montrent plus actifs.

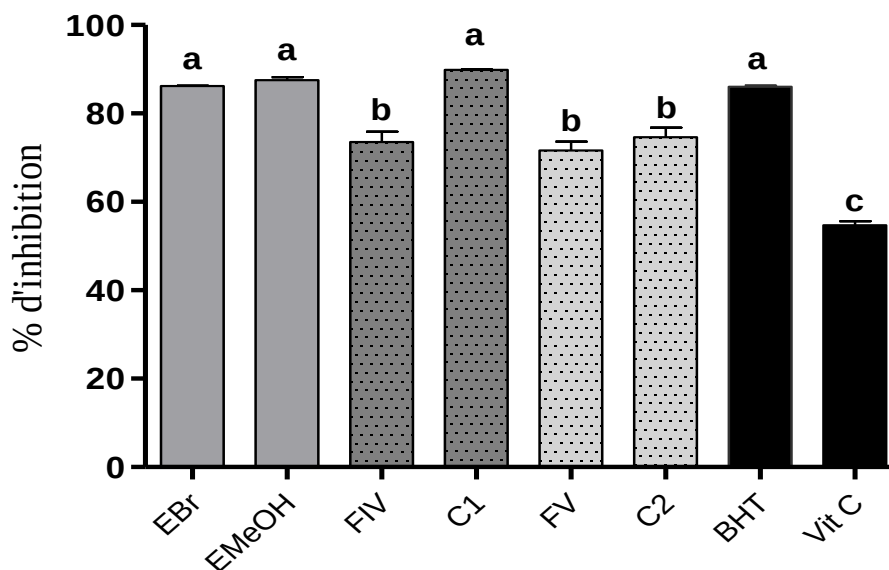


Figure 49. Evaluation du taux d'inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode de FTC. a, b, c: représentent l'aspect non significatif du test statistique de Tukey. n = nombre des expérimentations réalisées pour l'étude (n = 3).

La cinétique d'inhibition de la peroxydation des lipides suivie durant 98heures (**Figure 50**), montre l'effet important de tout les extraits et surtout l'EBr et l'EMeOH qui demeure constant pendant toute cette période, ce phénomène pourrait être du à la présence abondante de composés antioxydants actifs (Yildirim *et al.*, 2000). L'étude phytochimique de l'EBr des racines de *T.communis* a montré la présence de polyphénols, des flavonoïdes, des saponines et des tanins catéchiques. Cela est une preuve susceptible de ces propriétés inhibitrices (Meite *et al.*, 2014). Le composé pur C1 isolé de la FIV et le C2 isolé de la fraction FV (qui elles-mêmes sont isolées de l'EMeOH), sont des coumarines et qui présentent tout les deux une activité assez importante envers la peroxydation des lipides (Rajarajeswari and Pari, 2011).14-+41+9*-

Les extraits étudiés ont exercé un effet inhibiteur de la peroxydation lipidique statistiquement très significatifs par rapport ($p < 0.001$) au contrôle négatif (H_2O). Cette capacité de modifier la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres est reliée non seulement aux caractéristiques structurales des agents antioxydants mais aussi à leur capacité de pénétrer dans les bicouches lipidiques et d'interagir avec. Il a été montré que la structure et la lipophilie des polyphénols sont des facteurs importantes dont découle la propriété antioxydante, probablement affectant la profondeur de l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane (Djeridane et *al.*, 2010).

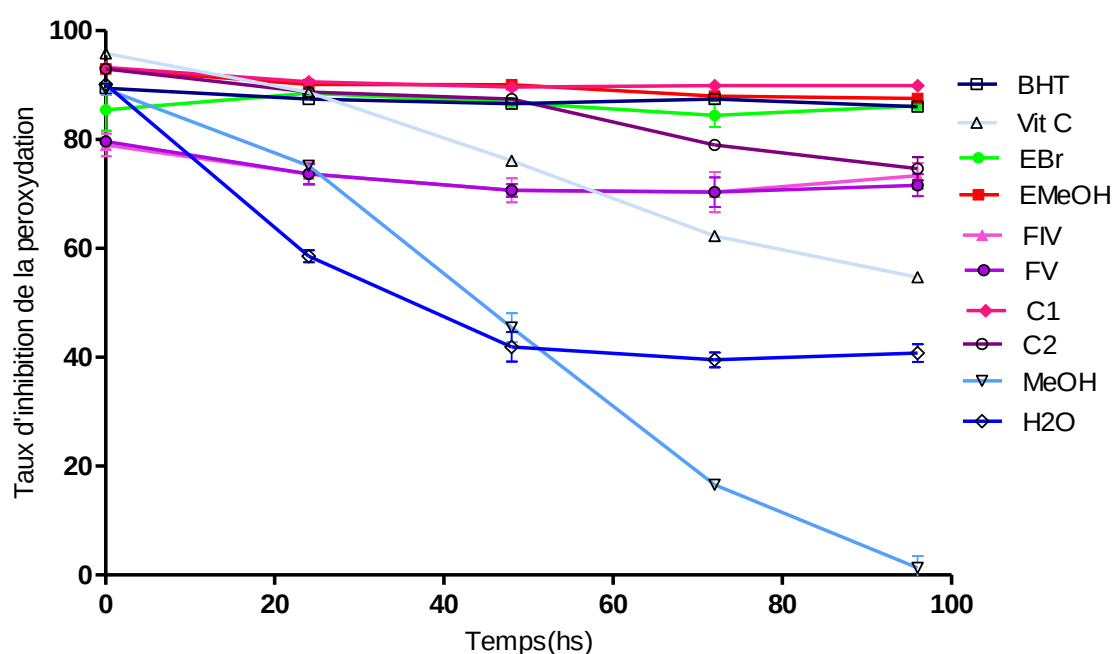


Figure 50. Cinétique représentant le taux d'inhibition de la peroxydation lipidique en fonction du temps (98h) de l'EBr, l'EMeOH, FIV, FV, C1 et C2. n = nombre des expérimentations réalisées pour l'étude ($n = 3$).

6.6. Evaluation de l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis la xanthine en acide urique dont l'accumulation cause de nombreux problèmes de santé tel que la goutte (Nile and Khobragade, 2012). Pour évaluer l'inhibition de l'enzyme en question la méthode de Ferraz et ses collaborateurs (2006) a été utilisée.

L'activité antioxydante est relayée par une multitude de voies d'action parmi lesquelles figure l'inhibition d'enzymes pro-oxydantes telle que la xanthine oxydase, dont elle a fait l'objet de notre travail. Son rôle dans la génération des ERO dans plusieurs pathologies a été largement étudié. L'allopurinol est le seul inhibiteur de la XO utilisé en clinique jusqu'à ce jour pour contrôler la production de l'acide urique dans la maladie de la goutte et l'hyperuricémie (Klinenberg et *al.*, 1965; Rundles, 1966). Cependant, la toxicité sévère de l'allopurinol a été rapportée par certains auteurs (Young et *al.*, 1974). Pour cela, la recherche de nouveaux inhibiteurs naturels dépourvus d'effets indésirables est d'actualité (Nile et *al.*, 2012).

Nous avons utilisé un système enzymatique pour évaluer la capacité de nos extraits à inhiber la génération des radicaux libres, c'est le système xanthine/ xanthine oxydase. Il s'agit alors soit, d'une séquestration des radicaux libres générés, soit d'une inhibition de l'enzyme responsable (Cos et *al.*, 1998; Boumerdes et *al.*, 2009). Un inhibiteur de la xanthine oxydase dans le milieu réactionnel se traduit par la réduction de la production de l'acide urique. L'enzyme, xanthine oxydase, utilisée dans ce test est isolée du lait bovin. L'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase (XO) est évaluée à l'aide de la concentration de l'échantillon testé entraînant une diminution de 50% de la production de l'acide urique par rapport à la réaction en absence de l'échantillon qui se traduit par 100% d'acide urique produit.

Rappelant que l'activité inhibitrice de la XO est inversement proportionnelle à l'IC₅₀, les résultats (**Figure 51**) obtenus montrent que la FIII est la plus active dont l'IC₅₀ est la plus faible (0,029±0,01 mg/ml) suivie par l'E.MeOH (0.030±0,02) mg/ml et FII (0,031±0,01 mg/ml) ensuite FVI (0,0395±0,02 mg/ml), FV (0,04±0,02 mg/ml), FI (0,044±0,02 mg/ml), FIV (0,045±0,02 mg/ml) et enfin EBr dont l'IC₅₀ est la plus élevée (0.23±0.006 mg/ml). L'activité présentée par ces extraits reste inférieure ($p < 0.001$) à celle de l'allopurinol (0.0082 ± 0.00015 mg/ml) utilisé comme standard. L'activité inhibitrice de l'allopurinol est presque 3 fois et demie supérieure à celle de la fraction la plus active. L'activité inhibitrice de l'EMeOH et FII

est en corrélation positive avec la teneur en polyphénols, cependant, le pouvoir inhibiteur de la XO de la FIII est inversement proportionnel à la teneur en polyphénols. L'EBr s'avère être le moins actif bien qu'il contient une proportion plus ou moins importante de polyphénols, cela peut être expliqué par le fait que l'extrait brut comporte toutes sortes de polyphénols qui peuvent être actifs ou non, en plus de la présence des composés non phénoliques, un mélange d'acides organiques, d'acides aminés et de sucres solubles dans l'eau dont l'activité est peut être nulle (Wong et *al.*, 2006). L'effet inhibiteur de la XO des composés purs C1 et C2 s'avère intéressant dont les valeurs des IC_{50} sont respectivement de 0.074 ± 0.003 mg/ml et 0.099 ± 0.002 mg/ml. Une activité considérée comme importante si on se réfère aux résultats obtenus à travers les travaux menés par Lin et *al.*, (2008) sur des coumarines.

En ce qui concerne les flavonoïdes, l'activité se présente différemment. Les résultats indiqués dans le tableau 10, montrent que, la teneur en flavonoïdes de la fraction FII n'est pas aussi élevée que celle de l'EMeOH pourtant leur activité est identique ($p > 0.05$). Ces résultats peuvent être expliqués par les travaux de Cos et ses collaborateurs (1998) qui montrent que les flavones présentent une activité inhibitrice plus élevée que les flavonols. Il est montré aussi qu'il existent actuellement environ 4000 flavonoïdes connus, dont beaucoup ont un potentiel élevé vis-à-vis de l'inhibition de la xanthine oxydase(XO) (Van Hoorn et *al.*, 2002).

De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différentes plantes sur l'activité de la XO (Ferraz Filha et *al.*, 2006; Nile and khobragade, 2012 ; Masuoka et *al.*, 2012), d'autres ont aussi montrés que cette activité inhibitrice est attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les polyphénols (Costantino et *al.*, 1992; Chiang et *al.*, 1994 ; Chatterjee and Sivashanmugam, 2012), les flavonoïdes (Hajdú et *al.*, 2014) et les tannins (Schmeda-Hirschmann et *al.*, 1996).

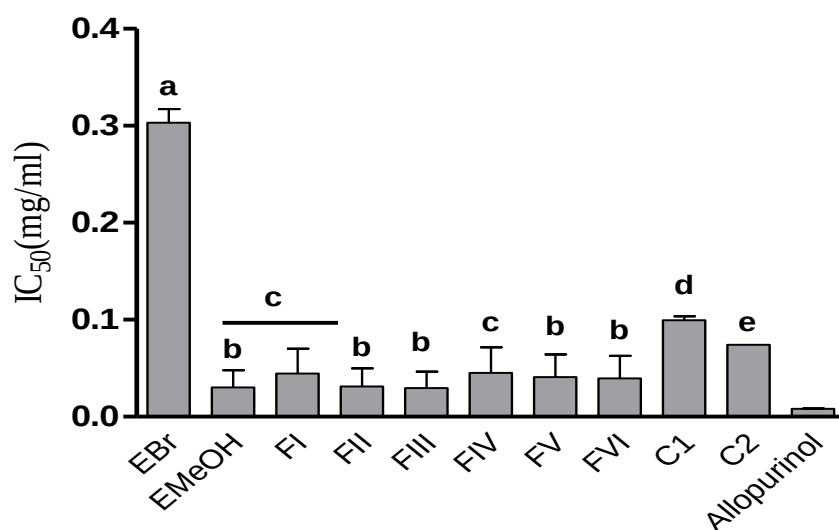


Figure 51. IC₅₀ des extraits/fractions des racines de *T.communis*, C1, C2 et l'allopurinol. Chaque point représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3). les différentes lettres a, b, c, d, e indiquent des activités significativement différentes ($p \leq 0,05$).

6.7. Effet scavenger de l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ généré par la XO

Pour déterminer l'effet scavenger des différents extraits/fractions étudiés sur l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ produit par le système xanthine /xanthine oxydase, la méthode décrite par Robak and Gryglewski (1988) est utilisée. Le principe de la méthode est basé sur le piégeage des superoxydes $O_2^{\bullet-}$ responsables de la réduction du Cyt c^{+3} (Mc Cord and Fridovich, 1968).

Les résultats de cette étude révélés sur la **figure 52**, montrent que l'EMeOH et la FV possèdent l'effet inhibiteur de la réduction du Cyt C^{3+} le plus puissant (IC₅₀ = 0.038 $\pm$ 0.024 mg/ml et 0.039 $\pm$ 0.02 mg/ml respectivement) suivi par la FIII (IC₅₀ = 0,04 $\pm$ 0,02 mg/ml), la FIV (IC₅₀ = 0,055 $\pm$ 0,03 mg/ml), ensuite la FVI et la FI qui présentent presque le même effet (IC 50 = 0,073 $\pm$ 0,04 mg/ml) et (IC₅₀ = 0,077 $\pm$ 0,04 mg/ml) respectivement suivie par EBr (IC₅₀ = 0,081 $\pm$ 0.0003 mg/ml) et enfin la FII (0,141 $\pm$ 0.08 mg/ml) la moins active. L'effet inhibiteur de la réduction du Cyt-c $^{+3}$ le plus élevé est observé pour le C1 dont l'IC₅₀ est de 0.0411 $\pm$ 0,00095 mg/ml suivi par le C2 (IC₅₀= 0,3291 $\pm$ 0, 00162 mg/ml). Le pouvoir inhibiteur

de C1 presque identique à celui de la fraction FIV ($p>0.05$), cependant, le composé C2 est beaucoup moins efficace que le C1 et la FV ($p<0.001$).

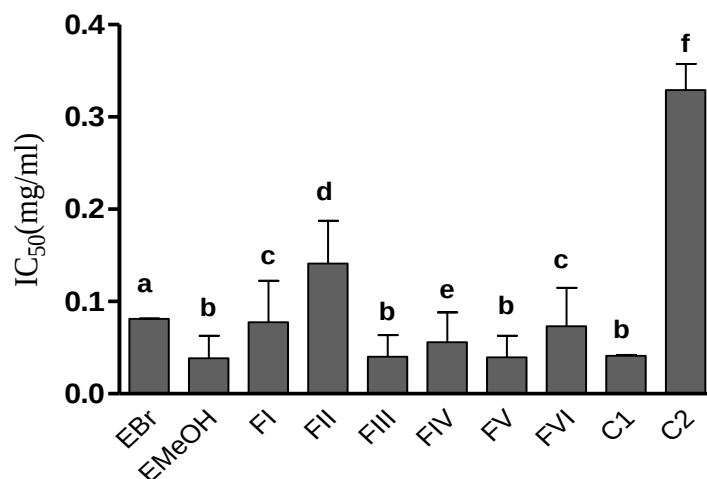


Figure 52. Les concentrations des extraits/fractions des racines de *T.communis* et C1, C2 qui inhibent la réduction de 50 % du Cyt c³⁺. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD ($n = 3$). les différentes lettres a, b, c, d, e, f indiquent des activités significativement différentes ($p \leq 0,05$).

Les résultats montrés sur la **figure 53** expriment la différence des deux activités inhibitrice de la XO et scavenger de l'ion superoxyde et révèlent que, tous les extrait ont un effet sur la réduction du Cyt-c⁺³ plus faible que celui de l'effet inhibiteur de la XO à l'exception de l'E.Br qui présente un effet inverse, effet scavenger important comparé à l'effet inhibiteur. La fraction FV a presque la même IC₅₀ de la réduction du Cyt-c⁺³ et l'inhibition de la XO, la fraction FII a un effet inhibiteur de l'activité de XO presque 5 fois supérieur à l'effet scavenger, les autres fractions ont un effet inhibiteur supérieur que celui de la réduction du Cyt-c⁺³. Il en découle de ces résultats que l'effet inhibiteur de la majorité l'emporte sur l'effet scavenger.

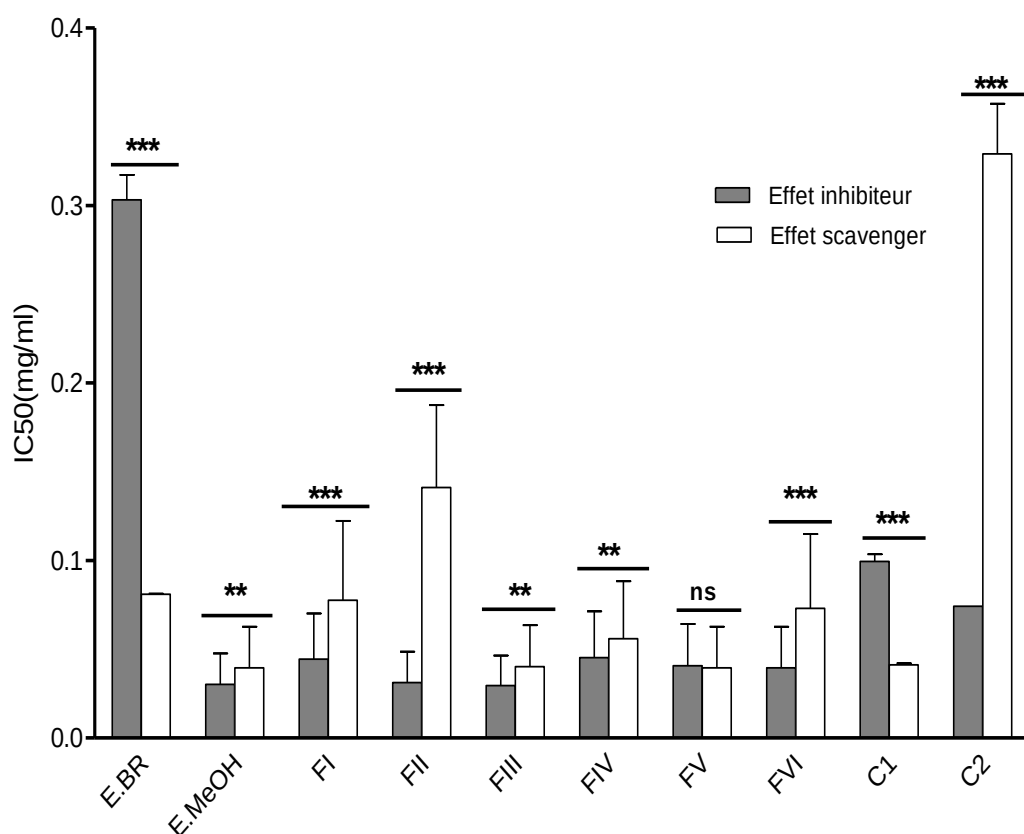


Figure 53. Les concentrations des extraits/fractions des racines de *T.communis* et C1, C2 qui inhibent 50 % de l'activité de la XO en comparaison avec celles qui inhibent la réduction de 50 % du Cyt-c⁺³ par l'O⁻² généré par la XO. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n = 3). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ns : non significatif.

A travers cette étude, les différents extraits/fractions ainsi que les composés purs se sont montrés inhibiteurs de la XO et balayeurs de l'ion superoxyde, ce qui rend difficile de savoir, dans le test, si ces extraits ont un effet scavenger sur l'O⁻² ou un effet inhibiteur sur l'enzyme. Seulement si on se base sur la théorie avancée par Cos et ses collaborateurs (1998) qui démontent que si les valeurs d'IC₅₀ pour le scavenger de l'O⁻² sont supérieures à celles de l'inhibition de la production de l'acide urique, les extraits en question ont un effet double, inhibiteur et piègeur de l'O⁻². Les résultats obtenus révèlent que les extraits testés sont beaucoup plus inhibiteurs de la XO que balayeurs de l'ion superoxyde. On peut conclure alors que ces extraits étudiés des racines de *T.communis* sont plus tôt des inhibiteurs de la XO et en parallèle ils piègent l'O⁻². Une exception concernant le cas de l'EBr et le composé C1 qui présentent l'effet inverse, où l'effet scavenger est très significativement supérieur à la capacité

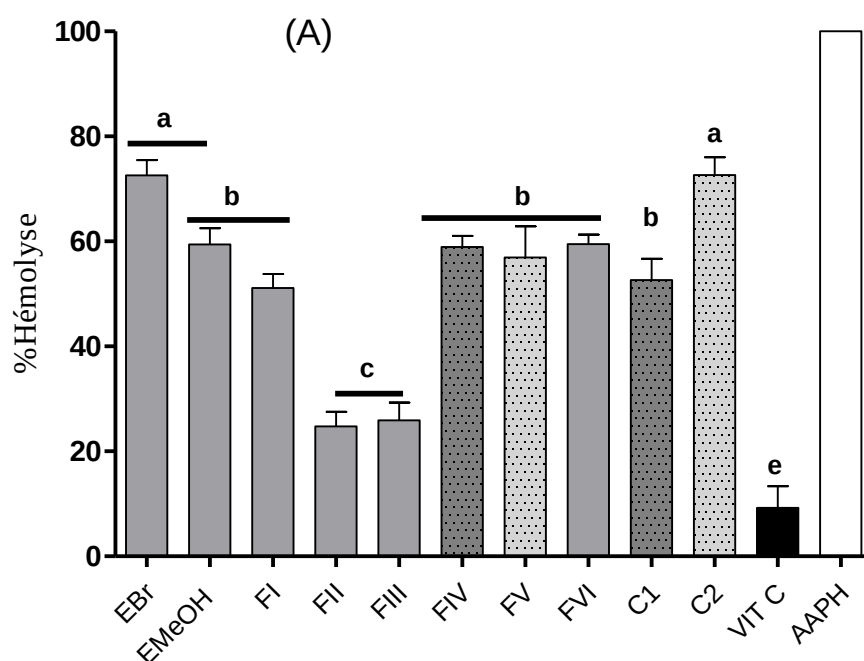
inhibitrice. Des travaux sur l'inhibition de la XO par les flavonoïdes ont montré théoriquement l'existence de similarités structurales entre le cycle A des flavonoïdes et le noyau purique de l'hypoxanthine et de la xanthine (Rastelli et *al.*, 1997). De même d'autres études évoqués ont montré que les flavonoïdes inhibent la XOR de manière compétitive (Lin et *al.*, 2002; Da Silva et *al.*, 2004).

6.8. Évaluation de l'activité antioxydante par le test biologique KRL

Contrairement à la plupart des autres tests, le test KRL est un test dynamique dont la durée est suffisamment longue pour que l'ensemble des mécanismes chimiques et enzymatiques de défenses puissent agir. A l'aide de ce test, nous pouvons également déterminer en *ex vivo*, dans des conditions biologiques, la capacité "antioxydante" de différents composés. La résistance globale du sang à l'attaque radicalaire en présence ou non du produit est exprimée par le temps au bout duquel 50% des cellules sanguines sont lysées (T1/2 en minutes).

Des conditions opératoires standardisées de préparation des échantillons pour le test KRL ont été mises au point. Un test de validation est vérifié, cas de l'osmolarité due au pH, Absence d'effet hémolytique intrinsèque de l'échantillon (Absence d'interférence du blanc), les échantillons ne présentent aucune action cytolytique en l'absence d'attaque radicalaire dans la zone de concentrations étudiées. Chaque extrait (0.1mg/ml) a été dissout dans le tampon PBS isotonique avant l'essai. Les résultats obtenus des extraits sélectionnés sont présentés sur la **Figure 54A et B**. Nous observons que tout les extraits/fractions présentent une activité antihémolytique importante ($p < 0.001$). Les résultats obtenus ont révélé une extension du temps de demi-hémolyse (HT_{50}) (**Figure 55**) qui varie de 70.34 ± 2.15 min pour C- (AAPH) à $207 \pm 5,657$ mn pour FI, mais le % de l'hémolyse du FII et FIII est seulement de 24,73% et 25,92% respectivement à 208 min au même titre que la Vit C dont l'hémolyse à 50% n'a pas

été atteinte même après 208 min. Cela signifie que ces deux fractions ont plus de capacité à protéger les cellules sanguines d'un stress oxydant que le reste des extraits dont le potentiel antioxydant est au même niveau que la Vit C. Niki et ses collaborateurs (1988) ont étudié les phénomènes d'oxydation des érythrocytes et ont mis en évidence que lors de l'attaque radicalaire causée par la décomposition thermique de l'AAPH, l'acide ascorbique et l'acide urique présents dans la phase aqueuse (le plasma) jouaient le rôle de piègeurs de radicaux, puis l' α - tocophérol positionné au niveau de la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire agissait majoritairement sur ces molécules réactives. Plus précisément, ces extraits devraient donc avoir une plus grande faculté à franchir la membrane plasmique des cellules afin de réduire les dommages causés par l'attaque radicalaire sur les érythrocytes (Jensen *et al.*, 2008). Ces extraits étant constitués de composés polyphénoliques, les résultats décrits précédemment pourraient suggérer que l'activité antihémolytique des erythrocytes est partiellement due aux propriétés de ces derniers (Sasikumar *et al.*, 2012).



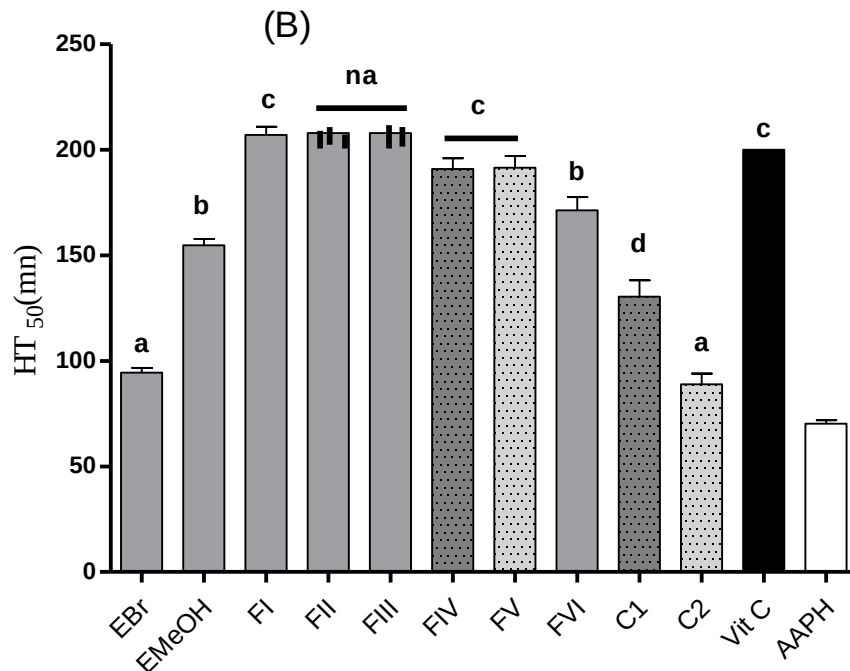


Figure 54. A. % d'hémolyse, **B.** HT₅₀ (mn) des extraits/fractions des racines de *T.communis*, C1,C2, Vit C et C⁻. Le test de la comparaison des variances est non significatif pour les histogrammes surmontés de la même lettre. les différentes lettres a, b, c, d indiquent des activités significativement différentes ($p \leq 0,05$). na : Non atteinte n = nombre des expérimentations réalisées (n = 4).

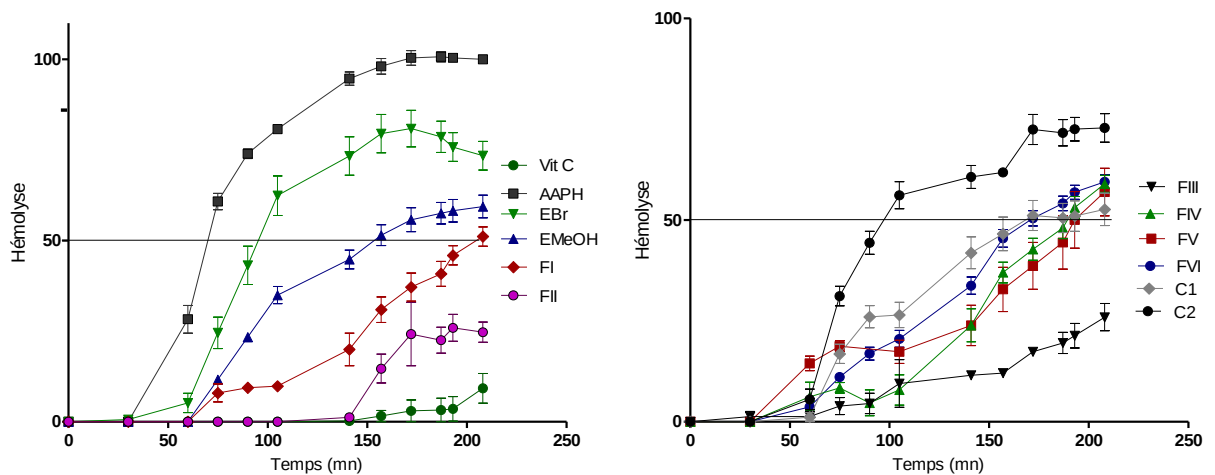


Figure 55. Cinétique d'hémolyse des extraits/fractions des racines de *T.communis*, C1, C2, Vit C et C⁻ (AAPH) pendant 208mn. n = nombre des expérimentations réalisées pour l'étude (n = 4).

L'hémolyse est le meilleur modèle utilisé pour évaluer au mieux l'étude des dommages oxydatives des membranes induit par les radicaux libres générés et déterminer l'activité antioxydante des extraits (Niki *et al.*, 1988; Deng *et al.*, 2006 ; Chwalek *et al.*, 2006 ; Kunwar *et al.*, 2007), ce qui nous a incité à tester les composés purs C1 et C2 et à les comparer avec les fractions précurseurs.

L'effet antihémolytique des deux composés purs a révélé une activité considérable exprimé par une importante extension de la HT₅₀ comparée au control négatif (C⁻) ($p < 0.001$). L'activité antihémolytique de ces deux composés C1 et C2 (**Figure 55**) est comparée à celle de la fraction FIV par rapport à C1 et la fraction FV à C2, il a été constaté que l'HT₅₀ des deux composés C1 (HT₅₀ = 130,485 ± 7,77 mn) et C2 (HT₅₀ = 88,86 ± 5,10 mn) est significativement inférieure ($p < 0.001$) à celle des deux fractions à partir desquelles ils sont isolés, cependant le pouvoir antihémolytique de C1 et C2 est important par comparaison avec le C⁻ ($p < 0.001$) et surtout en ce qui concerne le C1 par rapport à C2 ($p < 0.01$). Des études précédentes de la partition de molécules relativement petites dans les GR en particulier les molécules organiques cationiques, anioniques et non-électrolytiques ont montré que la lipophilicité, la taille moléculaire et les caractéristiques chirales de molécules influencent leur pénétration dans les globules rouges (Sha'afi *et al.* 1971). Ainsi, les composés lipophiles pénètrent dans les GR en se dissolvant dans les bicouches lipidiques membranaires tandis que les composés de petite taille hydrophiles entrent dans les globules rouges par des canaux aqueux. Les composés purs C1 et C2 étant des coumarines et qui présente un pôle lipophile devraient agir de cette manière en se dissolvant dans les bicouches phospholipidiques membranaires.

7. Evaluation du potentiel antioxydant *in vivo*

Il est largement admis que les suppléments alimentaires riches en fruits, en légumes et en huiles végétales permettent l'augmentation du potentiel antioxydant qui se traduit par plusieurs effets bénéfiques sur la santé de l'individu (Mete, 1999 ; Chu *et al.*, 2002). Sur ce,

un supplément d'EBr de *T.communis* est administré à des souris, afin d'appuyer les résultats importants de l'activité antioxydante décelés *in vitro*.

Une approche *in vivo* a donc été réalisée sur des souris supplémentées d'une dose de 100 mg/Kg/j d'EBr des racines de la plante *Tamus communis* L. administrés par voie intrapéritonéale.

Certains antioxydants, autres les composés phénoliques, sont probablement présents dans les extraits / fractions et qui apportent une contribution importante à la bioactivité. En fait, il est très difficile d'attribuer l'effet antioxydant sur un extrait total, à un ou plusieurs principes actifs, car les extraits contiennent toujours un mélange de différents composés chimiques doués d'activité antioxydante. Outre les principaux constituants, des composants mineurs peuvent également apporter une contribution significative à l'activité antioxydante des extraits (Rajbir et *al.*, 2007). La raison pour laquelle, on a choisi l'EBr initial des racines dans l'étude *in vivo* et non pas les extraits qui en dérivent notamment l'EMeOH, les fractions ou encore les deux composés purs (coumarines), composés isolés et purifiés des racines de cette plante.

Malgré les différentes études menées *in vitro* dont les résultats obtenus sont prometteurs, les antioxydants peuvent présenter des effets secondaires. En effet, s'ils sont administrés en grande quantité, ils peuvent devenir toxiques, de plus, en cas d'excès, les antioxydants peuvent inhiber la production d'ERO qui initialement ont un rôle physiologique, d'où les effets toxiques d'une forte supplémentation en antioxydant (Bjelakovic et *al.*, 2004 ; Bjelakovic et *al.*, 2008). La raison pour laquelle on a tenté juste une dose de 100 mg/kg/j d'EBr et non pas une dose plus importante.

Analyse des paramètres du potentiel antioxydant

7.1. Au niveau tissulaire (foie)

Il est admis que le règne végétal constitue une source importante d'antioxydants naturels, pour cela, une recherche d'éventuel effet antioxydant des plantes médicinales constitue un facteur crucial pour l'évaluation de leurs effets phytosanitaires et pour la compréhension de leurs mécanismes d'action. L'EBr des racines de *Tamus communis* L. a été évalué pour son effet sur les paramètres du potentiel antioxydant au niveau du tissu hépatique, ce dernier constitue un site favorable à cette étude.

Le foie étant un organe très sensible qui joue un rôle majeur dans la maintenance et la performance de l'homéostasie dans notre corps. C'est le principal organe où les processus importants comme le métabolisme et la désintoxication ont lieu. Ainsi, le foie est l'organe le plus exposé aux dommages en raison de l'exposition chronique à la drogue, les toxiques environnementaux et autres xénobiotiques (Zimmerman and Ishak, 1994 ; Lewis, 2004). Les troubles hépatiques sont l'un des problèmes de santé les plus graves, la raison pour laquelle il a été choisi pour ce travail.

7.1.1. Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Un des biomarqueurs le plus souvent utilisé pour étudier les dommages oxydatifs sur les lipides est les TBARS (Thiobarbiturics acid-reactive substances) (Lefevre et *al.*, 1998). C'est un produit majeur de la peroxydation lipidique.

Selon les résultats déterminés (**Figure 56**), une diminution significative de la teneur des MDA dans le foie a été observée chez le groupe traité par l'EBr (100 mg / ml) de *T. communis* ($35,04 \pm 6.73$ moles / g de tissu) et le groupe traité par 50mg/ml/j de Vit C ($17,63 \pm 6,07$ moles /g de tissu, par rapport au groupe représentant le contrôle (CTL) qui a reçu juste le NaCl (9g/1000ml) ($64,78 \pm 7,14$ moles/ g de tissu). Ces résultats laissent suggérer que la

réduction des MDA est peut être du à l'augmentation du statut antioxydant, car l'EBr de *T. communis* représente un important potentiel antioxydant déterminé *in vitro*.

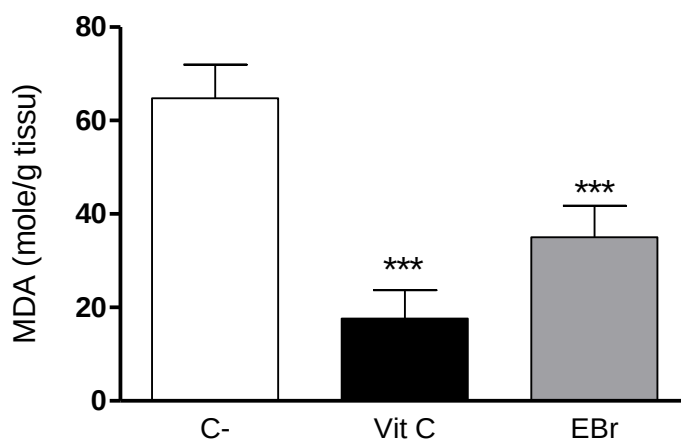


Figure 56. Comparaison de la concentration des MDA au niveau du tissu hépatique, traité par l'EBr de *T.communis* (100mg/ml) et la Vit C (50mg/ml). Les valeurs sont les moyennes $\pm$ SEM (n = 6).

Les MDA sont des sous-produits de la peroxydation des phospholipides de la membrane et sont principalement des peroxydes instables et leur concentration accrue est donc indicative de la peroxydation lipidique (Zhang *et al.*, 2003) et de l'échec mécanisme de défense de l'antioxydant, qui est sensé inhiber la production de radicaux libres. Ces produits d'oxydation lipidiques peuvent être utilisés comme marqueur dans le suivi de pathologie (Signorini *et al.* 2013) ou de traitement (Hockenberry *et al.* 2013).

Au niveau cellulaire, les MDA peuvent réagir avec le groupe amino libre des protéines, les phospholipides et les acides nucléiques menant à la modification de la structure, se traduisant par la mort cellulaire (Pandey and Rizvi, 2010). Suite aux résultats obtenus, on en déduit que, les racines de *T.communis* possèdent certainement le potentiel nécessaire et responsable pour inhiber ce processus (Devaki *et al.*, 2004). Cette constatation est soutenue par les travaux entrepris dans la littérature qui montrent que la vitamine C est un fort réducteur de la teneur de MDA se traduisant par une protection de la membrane cellulaire et les composant cytosoliques des cellules contre les dommages des oxydants (Aydemir *et al.*, 2000).

7.1.2. Catalase et GSH

Le GSH est l'un des tripeptides les plus abondants, il est largement distribué au niveau des hépatocytes. Ses fonctions sont principalement concernées par la neutralisation de radicaux libres tels que H_2O_2 et radicaux superoxyde (Fang et *al.*, 2003 ; Ogeturka et *al.*, 2005). Le glutathion constitue la première ligne de défense contre les ERO (Valenzuela et *al.*, 1989 ; Ogeturka et *al.*, 2005) cependant, ces processus de défense ne sont pas complètement efficaces s'ils ne sont pas supplémentés par le pouvoir antioxydant des principes actifs des plantes. Une bonne partie des ERO et des radicaux libres est donc neutralisée par des antioxydants exogènes présents dans les organismes des végétaux autotrophes (plantes). Hypothèses avancées et prouvées dans les travaux de Chandan et ses collaborateurs (2007) et Raja et ses collaborateurs (2007) obtenus à partir de *Aloe barbadensis* et *Cytisus scorpariu* respectivement.

Pour cette raison notre étude sur la capacité antioxydante des racines de *Tamus communis* L. s'est étalée à l'étude de l'évaluation des taux des enzymes antioxydants notamment la catalase et le glutathion (GSH) hépatique.

Le taux de GSH déterminé chez les trois différents groupes de souris mis à l'épreuve, a montré que la teneur de GSH des souris non traitées égal à $3,34 \pm 1,12 \mu\text{moles /g}$ de tissus, a augmenté, chez le groupe de souris traitées par la Vit C ($4,79 \pm 1,84$) et de façon significative chez celles qui ont été traitées par l'EBr des racines de *T. communis* ($7,06 \pm 0,30$) (**Figure 57**).

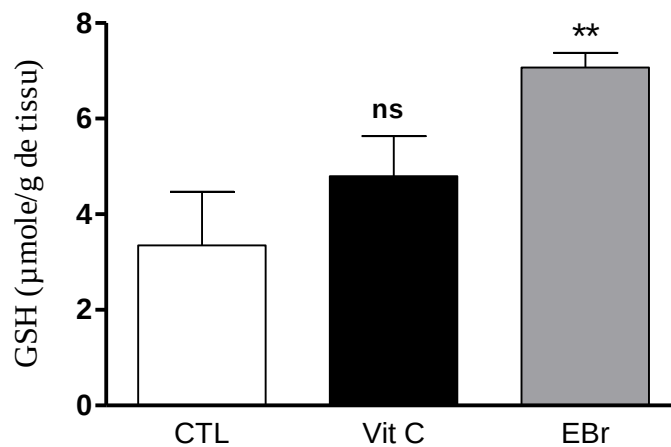


Figure 57. Taux du GSH dans l'hépatocyte. Les valeurs sont les moyennes $\pm$ SEM (n = 6).

Des résultats similaires sont observés à propos de la teneur de la catalase où cette dernière a augmenté chez les souris traitées par l'EBr. Elle est passée de $0,15 \pm 0,03$ U/mg de protéines pour le groupe CTL à $0,32 \pm 0,14$ U/mg de protéines pour le groupe traité par l'EBr ($p < 0.001$) et $0,18 \pm 0,01$ U/mg de protéines pour le groupe traité par la Vit C (**Figure 58**).

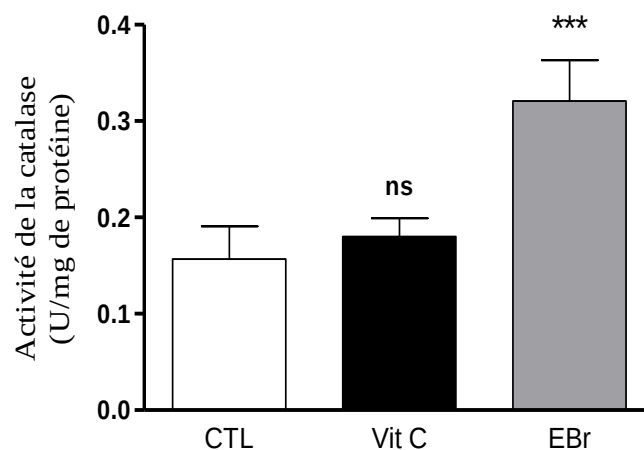


Figure 58. Activité de la catalase. valeurs sont les moyennes $\pm$ SEM (n = 6).

On s'aperçoit alors que, dans les deux cas, le supplément en EBr a mieux amélioré le potentiel antioxydant que la Vit C.

Nos résultats corroborent avec ceux de beaucoup de travaux réalisés sur des variétés de plantes. Il a été signalé que l'administration de l'extrait de feuilles d'*Aloès vera* provoque

l'augmentation des enzymes antioxydants du foie chez les souris (Singh et *al.*, 2000). Dans le même contexte, Ozsoy et ses collaborateurs (2009) ont prouvé que les extraits de l'*Aloe vera* peut activer les systèmes d'enzymes antioxydants endogènes qui jouent un rôle vital comme améliorateurs du système immunitaire et dans la gestion du stress oxydatif.

Des travaux entrepris sur la même plante par Nada et ses collaborateurs (2013), ont montré que l'extrait d'*Aloe vera*, lorsqu'il est administré avant et après irradiation améliore avec succès l'effet du stress oxydatif induit par rayonnement dans le tissu hépatique en minimisant le processus de peroxydation lipidique et l'amélioration de la teneur en GSH. De même Chiang et ses collaborateurs (2006) ont montré dans leurs études que le potentiel antioxydant est amélioré chez des souris male (C57BL/6 mice) après leur avoir administré un supplément de riz noir, traduit par une augmentation importante de la teneur en CAT et SOD.

7.2. Capacité antioxydante du plasma

La capacité antioxydante plasmatique (CAP) est l'un des paramètres les plus utilisés pour évaluer l'efficacité d'une supplémentation alimentaire ou d'un traitement antioxydant. En raison du grand nombre d'antioxydants présents dans le plasma, plusieurs méthodes ont été développées (Janaszewska and Bartosz, 2002 ; Huang et *al.*, 2005), dont deux d'entre elles ont été entrepris dans cette étude; le pouvoir antioxydant de réduction ferrique et l'effet scavenger du radical du DPPH. Cette dernière méthode est largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes et des aliments, elle est également utilisée pour évaluer la capacité antioxydante plasmatique qui est exprimée en pourcentage d'inhibition de décoloration du mélange réactionnel en présence du plasma par rapport à la solution méthanolique contenant uniquement le DPPH.

La réduction de l'ion ferreux (Fe^{2+}) en ion ferrique (Fe^{3+}) est mesurée par l'intensité de la solution bleue produite qui absorbe à 700 nm. Les résultats du pouvoir réducteur de

l'extrait EBr de *T.communis*, la Vit C et le contrôle (CTL) sont représentés par la **Figure 59**. Il en découle que la capacité réductrice de l'EBr se traduit par une valeur de DO = 1.031 ± 0.253 significative ($p < 0,05$) comparée à la valeur de DO du C⁻ = 0.655 ± 0.33 , cependant, il n'y a pas de différence significative entre pouvoir réducteur de la vitamine C (DO= 0.795 ± 0.165) et celui du contrôle CTL.

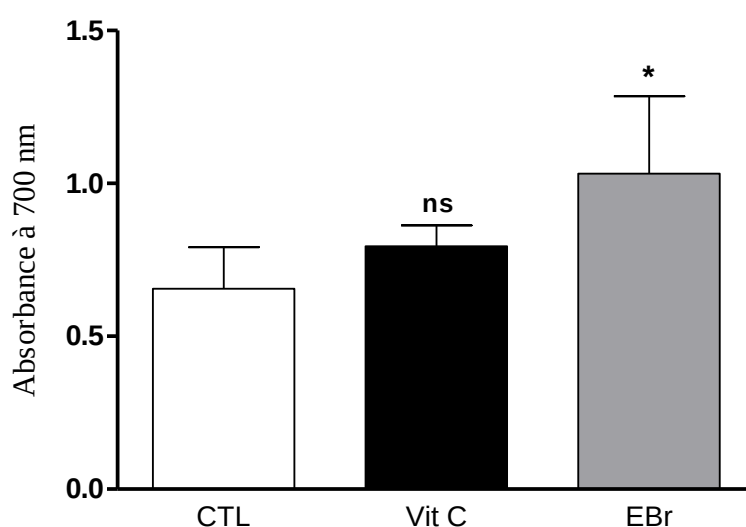


Figure 59. Capacité antioxydante réductrice des groupes traités par EBr de *T.communis* et la Vit C comparés au groupe CTL. Les valeurs sont les moyennes $\pm$ SEM (n = 6).

Déterminé par le test de DPPH, il s'avère que, le potentiel antioxydant du plasma n'a pas été amélioré significativement suite à une administration de l'EBr de *T.communis* à une dose de 100 mg/kg. Les résultats ainsi exprimés par le pourcentage d'inhibition (**Figure 60**) montrent que le groupe de souris traité par l'EBr (% I = $33,20 \pm 4.77$ mg / ml) et celui de la Vit C ((% I = $33,55 \pm 5.96$ mg / ml) ne sont pas significativement différents par rapport au groupe non traité CTL ($32,11 \pm 4.032$ mg / l).

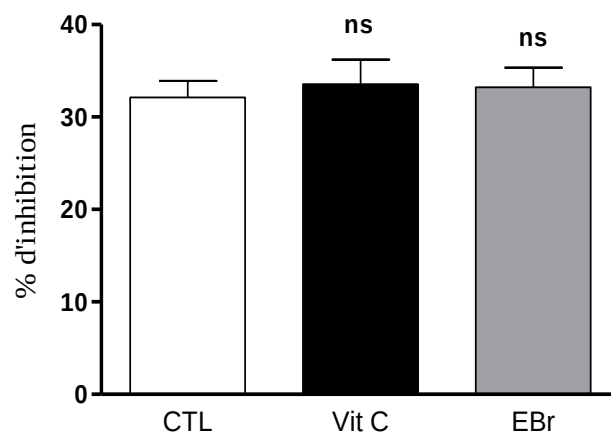


Figure 60. Capacité anti-oxydante représentée par le pourcentage d'inhibition du radical DPPH des groupes traités par EBr de *T.communis* et la Vit C comparés au groupe normal CTL . Les valeurs sont les moyennes $\pm$ SEM (n = 6).

En tenant compte de ces résultats, il paraît que la capacité antioxydante plasmatique est légèrement améliorée, cela laisse prétendre que la dose de 100mg/ml n'est pas suffisante, une dose supérieure aurait été plus significative. Cependant une faible amélioration de l'activité antiradicalaire à côté de l'augmentation non négligeable de la capacité réductrice suite à l'administration d'une dose de 100mg/ml, représente un résultat important comparé à ceux obtenus par certains travaux. En effet, ce même test a été utilisé par Hasani et son équipe (2007) pour évaluer l'effet du traitement par l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* sur la CAP chez le rat, où ils ont montré que l'administration orale de cet extrait (50, 100 et 200 mg/kg) pendant deux semaines conduit à une augmentation pas très importante de la CAP ($p \leq 0,05$) par rapport au groupe contrôle. Aussi, une méthode dont le principe est le même, réalisée par Meziti et ses collaborateurs (2012), ont montré que l'augmentation significative de la CAP est observée avec les doses les plus élevées (500 et 800mg/kg) des extraits méthanoliques des graines de *Nigella sativa* et la dose de 300mg/kg du même extrait n'a pas donné d'effet significatif.

En effet, le plasma contient un réseau d'antioxydants endogènes comme (l'albumine, la bilirubine, glutathion réduit et l'acide urique), ainsi que des antioxydants issus d'un apport exogène. Ces antioxydants peuvent agir de manière complémentaire et synergique pour fournir

une meilleure protection contre les ROS (Fang et *al.*, 2002). Ainsi l'augmentation de la capacité antioxydante du plasma observée, est sans doute attribuable à des niveaux élevés d'antioxydants exogènes acquise suite à une supplémentation de l'EBr de *T.communis*. Cet effet est probablement dû aux flavonoïdes et les composés phénoliques contenus dans l'EBr des racines dont les propriétés antioxydantes ont été déjà démontrées par l'étude *in vitro*.

7. 3. Capacité antioxydante du Sang total

La production excessive, dans les érythrocytes, d'anions superoxyde et de radicaux hydroxyl, résultant de l'instabilité de l'hémoglobine, est considérée comme le facteur initiateur de l'hémolyse qui libère dans le plasma du fer ionisé et de l'hème qui engendrent à leur tour des radicaux libres (Schachter, 1986 ; Schuwart et *al.*, 1987 ; Hebbel et *al.*, 1989).

Alors, on a jugé d'envisager l'usage des matières extraites des plantes comme des outils pour le ménagement de la génération des ROS et ses complications.

Les antioxydants sont mobilisés lors d'une attaque, par les ROS, induite en *ex vivo* par le t-BHP (*tert*-butyl hydroperoxide), pour protéger l'intégrité des érythrocytes et retarder leur hémolyse. A partir des courbes d'hémolyse sigmoïde obtenues (**Figure 61**), il semble que le traitement avec l'EBr de *T.communis* et de la Vit C provoque un retard de l'hémolyse qui est évident dans un déplacement des courbes vers la droite. Les valeurs de HT₅₀ (**Figure 62**) révèlent une extension de la mi-temps d'hémolyse dans les groupes traités par rapport aux témoins (CTL). L'augmentation de la HT₅₀ (78,46± 4,45471 mn et 80,43 ± 6,52mn) des deux groupes de souris traitées avec l'EBr (100 mg / kg) et de la vitamine C (50 mg / kg) respectivement, n'est pas statistiquement significative par rapport au groupe représentant le contrôle (65,66 ± 6,08mn). Ces résultats indiquent que la dose de 100 mg / kg de l'EBr de *T.communis* n'est pas suffisante pour accroître la capacité antioxydante totale, contrairement à l'importance activité antihémolytique des extraits déterminé *in vitro*.

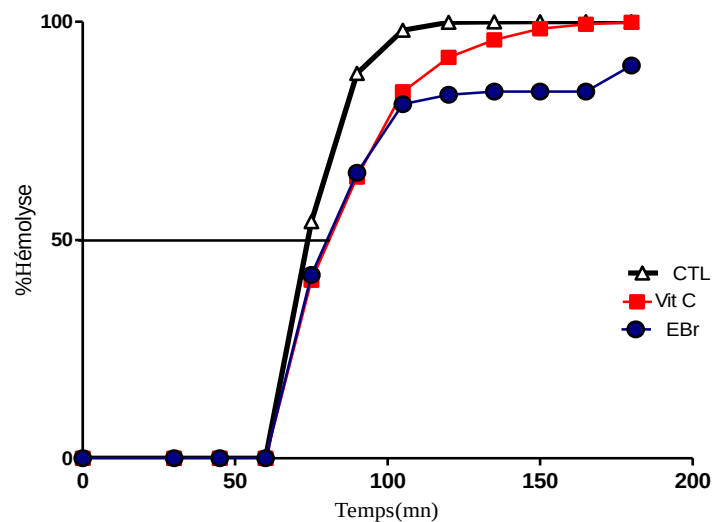


Figure 61. Temps de demi-hémolyse (HT_{50}) des groupes traités par l'EBr, la Vit C comparés au groupe non traité. les valeurs sont des moyennes $\pm$ SEM ($n = 6$).

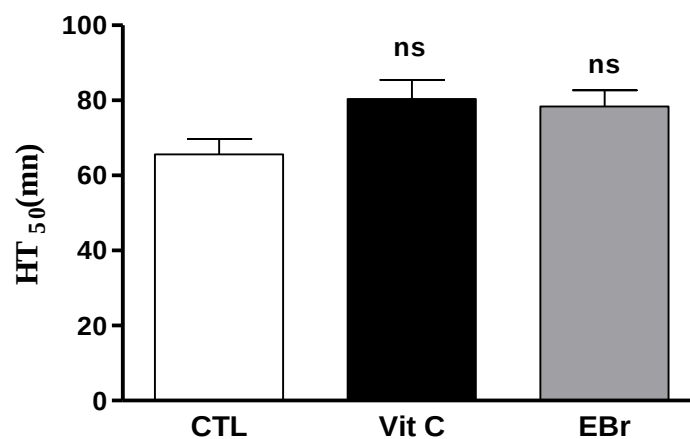


Figure 62. Cinétique de la lyse érythrocytaire en présence de t-BHP pour les différents groupes. valeurs sont les moyennes $\pm$ SEM ($n = 6$).

En effet, le comportement des extraits contre l'attaque radicalaire est toujours difficile à expliquer car un milieu biologique, tel que le sang, est une matrice complexe dans laquelle les suppléments pourraient être impliqués dans de nombreuses réactions au niveau du cytoplasme, la membrane cellulaire et/ou au niveau extracellulaire (plasma) (Stocker et *al.*, 2003 ; Djeridane et *al.*, 2007). Toutefois, ce test biologique est cliniquement plus approprié que d'autres essais communs parce qu'il peut détecter plusieurs classes d'antioxydants (Stocker et *al.*, 2003).

DISCUSSION GENERALE

Les composés phénoliques sont principalement reconnus pour leur importante activité antioxydante. Les extraire des végétaux dans des conditions douces et efficaces et mieux comprendre leurs mécanismes d'activité antioxydante constituent des enjeux scientifiques importants qui sont à la base de notre étude.

Dans la première partie, le travail a porté sur l'extraction des polyphénols dont le rendement par rapport au poids de la poudre végétale s'est montré plus ou moins important. Les rendements d'extraction varient en fonction du végétal étudié, de la nature et des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés et notamment leur polarité. Le criblage phytochimique de l'extrait brut (EBr) a montré la présence des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins catéchiques et des saponines dont le dosage des polyphénols et des flavonoïdes s'est montré presque identique à celui déterminé par Boumerfeg et ses collaborateurs (2009).

Six différentes fractions (FI-FVI) ont été obtenues par chromatographie sur gel de silice à partir de l'extrait méthanolique (EMeOH) et deux composés ont été isolés et purifiés à partir des deux fractions FIV et FV. Les deux composés ont été identifiés en utilisant des techniques spectrales de pointe, telles que la spectrométrie de masse (SM), RMN-1H et RMN-13, il s'agit de furanocoumarines isolés pour la première fois dans la plante *Tamus communis* L., C1 : le 2,5 diméthoxypsoralène et C2 : l'héraclénine.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il a fallu combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester. Pour cette raison plusieurs méthodes in vitro ont été effectuées.

Le criblage préliminaire in vitro a concerné les extraits/fractions et les deux composés purs isolés C1 et C2.

Le test au DPPH révèle que les deux extraits EBr et EMeOH sont les plus actifs comme piègeurs du radical DPPH qui sont effectivement, les plus riches en composés phénoliques comparés aux fractions, C1 et C2 présentent une activité modérée. Le blanchissement du β -carotène est ralenti fortement durant les 24 heures en présence de tous les extraits/fractions, C1 et particulièrement C2 dont le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du β -carotène est très important (72,69%) et plus élevé même de celui de la fraction FV. Cela reflète la solubilité des composés antioxydants dans l'émulsion, dont la présence limite l'oxydation du β -carotène qui garde sa couleur (Frankel and Meyer, 2000 ; Tepe et *al.*, 2005).

L'EBr et l'EMeOH ont révélé un pouvoir chélateur des ions ferreux et réducteur du fer contrairement aux fractions, C1 et C2 qui se sont montrés inactifs, à l'exception de la fraction FII qui possède un pouvoir réducteur intéressant mais un pouvoir chélateur nul. Cela indique que ces derniers ne présentent pas la structure convenable pour chélater les ions métalliques. De plus le pouvoir réducteur de l'EBr ($CE_{50}=0.609$ mg/ml) est supérieur à celui de l'EMeOH ($CE_{50}=1,014$ mg/ml) et de la FII (1,104 mg/ml) cela peut s'expliquer par la présence des molécules responsables de l'effet réducteur au niveau de l'EBr et leur absence dans l'EMeOH et la FII. Toutefois, l'EBr a exhibé une activité chélatrice inférieure à celle de l'EMeOH, on peut supposer que cet effet est dû aux composés solubles dans le méthanol (EMeOH) et non pas dans l'eau (EBr). On peut supposer également que les polyphénols présents au niveau des fractions et les furanocoumarines C1 et C2 ne possèdent pas les fonctions nécessaires pour la réduction et la chélation du métal, une autre hypothèse envisageable est que les molécules présentes à l'état pure ou sous forme de mélange ne se comportent pas de la même manière. Cet argument permet de justifier des bénéfices et de l'efficacité des polyphénols lorsque ceux-ci sont présents dans un mélange plutôt qu'isolés.

Un système enzymatique plus complet que les systèmes étudiés dans les tests purement chimiques a fait l'objet de ce travail. Il s'agit de l'activité inhibitrice de la XO, Ce dernier a signalé une activité importante de la XO des différents extraits /fractions ainsi que les composés C1 et C2 à l'exception de l'EBr. L'effet de balayage contre les ions superoxydes générés par la XO s'est montré moins important que le pouvoir inhibiteur et particulièrement le composé C2 dont le pourcentage d'inhibition est nettement supérieur. L'EBr fait exception aux restes des extraits, qui a exprimé un effet scavenger beaucoup plus élevé que l'effet inhibiteur de la XO, ce résultat peut s'expliquer par la présence des composés responsables du piégeage des ions superoxydes dans l'EBr. De nombreuses études ont rapporté que les polyphénols montrent une nette inhibition des enzymes responsables de la production des ROS tels que l'oxyde nitrique synthase (Wang and Mazza, 2002), la tyrosine kinase (Traxler et *al.*, 1999) et la XO (Boumerfeg et *al.*, 2009 ; Baghiani et *al.*, 2010). Cela peut montrer que les extraits/fractions et les deux furanocoumarines C1 et C2 possèdent la possibilité d'inhiber la génération des ions superoxydes soit par inhibition de la XO ou par piégeage de ces derniers.

Deux tests complémentaires, le test biologique KRL (Kit Radicaux Libres) (Girard et *al.*, 2006) qui reflète au mieux les mécanismes d'action des biomolécules au niveau du système complexe de défenses antioxydantes d'un milieu physiologique comme le sang et l'inhibition de la peroxydation lipidique ont été également envisagés. Les résultats obtenus ont montré que les extraits/fractions ainsi que les deux composés purs C1 et C2 se sont révélés très actifs. L'activité antihémolytique des deux composés purs C1 ($HT_{50} = 130,485 \pm 7,77$ mn) et C2 ($HT_{50}=88,86 \pm 5,10$ mn) est importante par comparaison avec le control négatif C⁻ ($p < 0.001$).

En parallèle, tous les extraits étudiés ont exhibé un potentiel inhibiteur de la peroxydation lipidique statistiquement très significatifs par rapport ($p < 0.001$) au contrôle négatif (H₂O) et spécialement le composé pur C1 dont le pourcentage d'inhibition ($89,9 \pm 0,1\%$) est très élevé. Selon Djeridane et ses collaborateurs (2010) la structure et la lipophilie des

polyphénols sont des facteurs importants dont découle la propriété antioxydante, probablement affectant la profondeur de l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane.

Ces deux dernières méthodes prouvent l'activité protectrice de la membrane cellulaire, notamment la membrane des érythrocytes qui représente un enjeu médical important notamment dans la lutte contre certaines maladies génétiques (Moreira et *al.*, 2011).

Une approche *in vivo* a été réalisée en tentant de faire administrer aux souris mâles de l'EBr (100mg/kg). L'analyse des paramètres du potentiel antioxydant a révélé au niveau hépatocytaire une diminution significative (50.35%) de la teneur d'un produit majeur de la peroxydation lipidique (MDA) chez le groupe de souris traitées par rapport au groupe non traité. Le taux de GSH et la teneur de la catalase ont augmenté, on s'aperçoit que, dans les deux cas, le supplément en EBr a mieux amélioré le potentiel antioxydant que la Vit C. Ces systèmes d'enzymes antioxydants endogènes jouent un rôle vital comme améliorateurs du système immunitaire et dans la gestion du stress oxydatif (Ozsoy et *al.*, 2009). Le statut antioxydant plasmatique et le pouvoir antihémolytique s'est amélioré légèrement par suite à une supplémentation de l'EBr. Cependant, l'interprétation des résultats est encore difficile car chaque méthode a ses spécificités et ses limites et les valeurs de référence pour chacun des paramètres restent souvent mal définies (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2008)

En conclusion, ce travail a permis en général de mettre en évidence une corrélation entre les polyphénols présents dans les racines de *T. communis* et l'activité antioxydante.

Une corrélation non significative entre les différents tests utilisés dans ce travail.

A travers le fractionnement, on a pu constater que le potentiel antioxydant des molécules est modifié une fois séparées de leur milieu initial. Les deux composés purs C1 et C2 isolés se sont avérés très actifs dont l'activité la plus importante concerne le blanchissement

du β -carotène, la peroxydation lipidique et l'activité antihémolytique, résultats traduisant la protection membranaire.

Cette étude révèle également que l'EBr des racines de *T. communis* administré aux souris a agit favorablement sur le potentiel antioxydant tissulaire.

Le présent travail rapporte donc une contribution à la connaissance de l'espèce *Tamus communis* L. à travers l'étude du potentiel antioxydant et il ouvre de nombreuses perspectives.

Cette étude se place dans une problématique de recherche pluridisciplinaire, associant des techniques caractéristiques de la chimie et de la biologie.

- Pour la poursuite de nos investigations, nous pensons nous consacrer d'avantage sur la même plante qui jusqu'à présent, n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études phytochimiques et pharmacologiques. Cela nous permettra peut-être d'isoler d'autres métabolites secondaires participant à l'activité de cette plante, notamment l'identification et la purification d'autres molécules qui n'ont pas été à ce jour isolées et à notre connaissance, n'ont jamais été caractérisées quant à leurs activités biologiques et comparer éventuellement leurs activités par rapport aux composés C1 et C2.

- Vu l'intérêt des résultats obtenus *in vitro* en présence des deux composés purs isolés, il est important de compléter ce travail par une étude plus accentuée dans le but rechercher le mode d'action de ces molécules.

- Pour mieux évaluer le pouvoir antioxydant des extraits, Il faut adopter une approche *in vivo* plus approfondie par l'intermédiaire de différentes stratégies de mesure afin de déceler et comprendre comment un composé se manifeste à l'intérieur de l'organisme. Il serait intéressant de tester plusieurs doses et comparer éventuellement leurs activités et voir si cette activité est plus faible ou plus élevée. Une étude sur la toxicité, notamment la détermination de la DL_{50} est souhaitable avant d'entamer l'étude *in vivo*. De même, des études

visant la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de ces extraits seraient utiles avant d'envisager des investigations plus poussées quant à leur utilisation à des fins thérapeutiques.

Les résultats obtenus au cours de ce travail complètent et confortent une démarche scientifique de plus en plus fréquente à savoir, l'établissement de relations entre l'utilisation empirique de la plante par les populations et la connaissance scientifique.

Références

REFERENCES

- Abadeh S., Killacky J., Benboubetra M. And Harrison R. (1992) Purification and partial characterisation of xanthineoxidase from human milk. *Biochemistry and Biophysics*, **1117**, 25-32.
- Abreu I.A. and Cabelli D.E. (2010) Superoxide dismutases-a review of the etalassociated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804**, 263-274.
- Agrawal P.K. (1992) NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, **31(10)**, 3307-30.
- Al-Khateeb E., Ohan A.A. and Al-Ani H. (2012) Cytotoxicity studies of *Tamus communis* root and berries HEp-2 and AMN-3 carcinoma cell. *Hygei: Journal for drugs and medicines*, **4 (2)**, 1-5.
- Ames B.N., Shigenaga M.K. and Hagen T.M. (1993) Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**, 7915–22.
- Anderson C.M., Hallberg A. and Hogberg T. (1996) Advances in the developpement of pharmaceutical antioxidant drug. *Food Chemistry*, **28**, 65-180.
- Annadurai R.S. , Jayakumar V., Mugasimangalam R.C., Katta M.A. et al., (2012) Next generation sequencing and *de novo* transcriptome analysis of *Costus pictus* D. Don, a non-model plant with potent anti-diabetic properties. *Genomics*, **13**, 663.
- Ansari K.N. (1997) The free radicals-the hidden culprits-an update. *Indian Journal of Medical Sciences*, **51**, 319-336.
- Aslan A., Güllüce M., Sökmen M., Adigüzel A., Sahin F. and Özkan H. (2006) Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella*. *Journal of Pharmaceutical Biology*, **44**, 247-252.
- Aquino R., Behar I., de Simone F., Pizza C. and Senatoe, F. (1985) Phenanthrene derivatives from *Tamus communis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **13**, 251–252.
- Arimboor R. and Arumughan C. (2011) Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) proanthocyanidins inhibit in vitro enzymatic hydrolysis of protein. *Journal of Food Science*, **76(6)**, 130-7.

- Atmani D., Benboubetra M. and Harrison H. (2004) Goat's milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum. *Journal of Dairy Research*, **71**, 7-13.
- Atoui A. K., Mansouri A., Boskou G. and Kefalas, P. (2005) Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, **89**, 27-36.
- Avis P.G., Bergel F. and Bray R.C. (1956) Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. Part III. Estimations of the cofactors and the catalytic activities of enzyme fractions from cow's milk. *Journal of the Chemistry Society*, 1219-1226.
- Aydemir T., Ozturk R., Bozkaya L.A. and Tarhan L. (2000) Effects of antioxidant vitamins A, C, E and trace elements Cu, Se on Cu Zn SOD, GSH-Px, CAT and LPO levels in chicken erythrocytes. *Cell Biochemistry and Clinical Function*, **18**, 109-115.
- Baghiani A., Arrar L. and 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". *Agency for Scientific Publications*, Berlin. pp: 837-844.
- Baghiani A., Harrison R. and Benboubetra M. (2003) Purification and partial characterization of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry*, **111**, 407-414.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C. et al., (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel-Forschung / Drug Research*, 1-6.
- Bajerova P., Adam M., Bajer T., Ventura K. (2014) Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants. *Journal of Separation Science*. **37**, 835–844.
- Barouki R. (2006) Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences*, **22**, 266-72.
- Barros L, Ferreira M.J, Queiros B., Ferreira I.C.F.R. and Baptista P. (2007) Total phenols, ascorbic acid, b-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **103**, 413-419.
- Bartosz G. (2003) Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, **9**, 5-21.
- Baudin B. (2006) Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*, **2 (1)**, 43-52

- Bauguil N., Maestre N., Segafredo C., Galinier A., Garcia J., Prost M. et al., (2009) Evaluation of whole antioxidant defenses of human mononuclear cells by a new in vitro biological test: lack of correlation between erythrocyte and mononuclear cell resistance to oxidative stress. *Clinical Biochemistry*, **42**, 510-514.
- Baur A.K., Dwyer-Nield L.D., Hankin J.A., Murphy R.C. and Malkinson A.M. (2001) The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. *Toxicology*, **169**(1), 1-15.
- Behl C. (2001) Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature Reviews Neuroscience*, **3**, 433-442.
- Békro Y.A., Békro J.A.M., Boua B.B., Tra B.F.H. and Ehilé E.E. (2007) Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.)(Caesalpiniaceae). *Reviews science Nature*, **4**, 217-225.
- BellevilleBenavente-Garcia O., Castillo J., Marin F.R., Ortuno A. and Del Rio J.A. (1997) Uses and properties of Citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 4505-4515.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E. and Sapirstein H.D. (2005) Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chemistry*. **82**, 390-393.
- Bjelakovic G., Nikolova D., Simonetti R. G. and Gluud C. (2004) Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, **364**(9441), 1219-1228.
- Bjelakovic G., Nikolova D., Simonetti R. G. and Gluud C. (2008) Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **28**(6), 689-703.
- Blanc M., Moinard C. and Cynober L. (2005) "Monoxyde d'azote." Radicaux libres et stress oxydant. *Paris, Lavoisier*, pp: 25-43.
- Blois M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, **181**, 1199 – 1200.
- Boldyrev A. A. (1993) Does carnosine possess direct antioxidant activity? *International Journal of Biochemistry*, **25**, 1101-1107.

- Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E. and Saykova I. (2012) Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, **7**, 35-45.
- Bonnefont-Rousselot D., Bittar R., Atassi M., Bruckert E. and Chapman M. J. (2008) Contribution of NMR to the assessment of dyslipidemia-related cardiovascular risk. *Annales pharmaceutiques françaises*, **66** (3), 123-8.
- Boulard B. (2003) *Plants Médicinales Du Monde :Réalités et Croyances*. Paris. pp : 1092-1107
- Boumerfeg S., Baghiani A., Messaoudi D., Khennouf S. and Arrar L. (2009) Antioxidant Properties and Xanthine Oxidase Inhibitory Effects of *Tamus communis* L. Root Extracts. *Phytotherapy Research*, **23**, 283 - 288.
- Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S. and Matern U. (2006) Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unraveled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, **5**, 293-308.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und - Technology*, **28**, 25–30.
- Bray R.C. Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. In " Boyer P.D (Eds.), The enzymes" 3rd Ed. *Academic Press*, New York. pp: 299-419.
- Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C. (1998) Structural dependence of flavonoïdes interactions with Cu²⁺ ions : implication for their antioxidant properties. *The Biochemical journal*, **330**, 1173-1178.
- Burits M. and Bucar F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, **14**, 323-328.
- Caddick L.R., Wilkin P., Rudall P.J., Hedderson T.A.J. and Chase M.W. (2002) Phylogenetics of Dioscoreales based on combined analyses of morphological and molecular data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **138** (2), 123-144
- Caddick L.R., Wilkin P., Rudall P.J., Hedderson T.A.J. and Chase M.W. (2002) Yams reclassified: a recircumscription of Dioscoreaceae and Dioscoreales. *Taxon*, **51**(1) 103–114.ds le text
- Cadenas E. and Davies J.A. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **29**, 222-230.

- Cairo G., Tacchini L., Pogliaghi G., Anzon E., Tomasi A. and Bernelli-Zazzera A. (1995) Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 700-703.
- Capasso F., De Simone F. and Senatore F.S. (1983) Sterol constituents of *Tamus communis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, **8(3)**, 327-329.
- Chan E W C, Lim Y Y and Chew Y L (2007) Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*, **102**, 1214-1222.
- Chanda S. and Dave R. (2009) In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, **3**, 981-996.
- Chandan B.K., Saxena A.K., Shukla S., Sharma N., Gupta D.K., Suri K.A. et al., (2007) hepatoprotective potential of aloe barbadensis Mill. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, **111 (3)**, p. 560-566.
- Chang W.S., Lee Y.J., Lu F.J. and Chiang H.C. (1993) Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research*, **13**, 2165-2170.
- Chatterjee T. K. and Sivashanmugam A.T. (2012) Xanthine oxidase inhibitory activity and enzyme kinetics of *Polyalthia longifolia* (Sonner.) Thw. Leaves using *in vitro* method. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*. **3(1)**, 61-65.
- Chen, A. Pearson M. and Gray J. I. (1992) Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, **43**, 177-183.
- Chen L., HU J.Y. and Wang S.Q. (2012) The rôle of antioxdants in photoprotection : a critical review. *Journal of American Academy of Dermatology*, **67(5)**, 1013-1024.
- Chiang H.C., Lo Y.J. and Lu F.J. (1994) Xanthine oxidase inhibitions from leaves of *Alsophila spinulosa*. *Agricultural and Food Chemistry*, **53(6)**, 1841-1856.
- Chiang A., Wu H., Yeh H., Chu C., Lin H. and Lee W. (2006) Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities. *Lipids*, **41**, 797-803.
- Chimi H., Cillard J., Cillard P. and Rahmani M. (1991) Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **68**, 307 – 312.

- Chu Y.F., Sun J., Wu X. and Liu R.H. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of agricultural and food chemistry*, **50**, 6910-6916.
- Chwalek M., Lalun N., Bobichon H., Ple´K. and Voutquenne-Nazabadioko L. (2006) Structure–activity relationships of some hederagenin diglycosides: haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1760**, 1418–1427.
- Claiborne A. (1985) Catalase activity. In: Handbook of Methods for Oxygene Radical Research. Greenwald RA (ed), CRC Press, Boca Raton, FL, pp: 283-284.
- Coppen A., Abou-Saleh M., Milln P., Bailey J. and Wood K. (1983) Decreasing lithium dosage reduces morbidity and side-effects during prophylaxis. *Journal of Affective Disorders*, **5(4)**, 353-62.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A. V. and Berghe D. K. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, **61**, 71-76.
- Costantino L., Albasini A., Rastelli G., Benvenuti S. (1992) Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Medica*. **58**, 342-345.
- Cottiglia F., Loy G., Garan D., Floris C., Casu M., Pompei R. and Bonsignore L. (2001) Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, **8(4)**, 302-305.
- Couto N., Malys N., Gaskell S. and Barber J. (2013) Partition and Turnover of Glutathione Reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research*, **12 (6)**, 2885–94.
- Cowan M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 564-582.
- Da Silva S.L., Da Silva A., Honório K.M., Marangoni S., Toyama M.H. and Da Silva A.B.F. (2004) The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure : Theochem*, **684**, 1-7.

- Dapkevicius A., Venskutonis R., Van Beek T. A. and 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.
- Deby-Dupont G., Deby C., Lamy M. (1999) Neutrophil myeloperoxidase : its role in health and disease. *Intensivmed.* **36**, 500-13
- Dellagrecia M., Fiorentinob A., Isidorib M., Lavorgna M., Monaco P., Previtera L. and Zarrelli A. (2002) Phenanthrenoids from the wetland. *Juncus acutus*. *Phytochemistry*, **60**, 633–638.
- Deng S.-L., Cheng W.-F., Zhou B., Yang L. and Liu Z.-L. (2006) Protective effect of curcumin and its analogues against free radical –induced oxidative haemolysis of human red blood cells. *Food Chemistry*, **98**, 112–119.
- Devaki T., Raghavendran HRB. and Sathivel A. (2004) Hepatoprotective nature of seaweed alcoholic extract on acetaminophen-induced hepatic oxidative stress. *Journal of Health Science*, **50**, 42-46.
- Dincel D., Hatipoglu S.D., Goren A.C. and Topcu G. (2013) Anticholinesterase furocoumarins from *Heracleum platytaenium*, a species endemic to the Ida Mountains. *Turkish Journal of Chemistry*, **37**, 675-683.
- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J.F. and Stocker P. (2007) Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, **224**, 801-809.
- Djeridane A., Yousfi M., Brunel J. M. and 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.
- Ellman G. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82(1)**, 70–77.
- Elgamal M.H.A., Elewa N.H., Elkhisy E.A.M., Duddeck H. and C-Ellman G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **82**, 70-77
- Enroth C., Eger B. and Nishino T. (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *Journal of Biochemistry*, **97**, 10723–10728.

- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdely C. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331**, 372-379.
- Fang Y.Z., Yang S. and Wu G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18(10)**, 872-9.
- Ferraz Filha Z.S., Vitolo I.F., Fietto L.G., Lombardi J.A., Saúde-Guimarães D.A. (2006). Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (Arnica). *Journal of Ethnopharmacology* **107**, 79-82.
- Ferrer J., Austin M., Stewart C.J. and Noel J. (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 356–70.
- Floc'h F., Mauger F. and Desmurs J. R. (2002) coumarin in plants and fruits. *Perfumer and flavorist*, **27 (2)**, 32-36
- Frankel E.N. and Meyer A.S. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants. *Journal of Science and Food Agriculture*, **80**, 1925-1941.
- Gardès-Albert M. and Jore D. (2005). "Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène." Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier: pp 1-23.
- George S., Brat P., Alter P. and Amiot MJ. (2005) Rapid determination of polyphenols and 13 vitamin C in plant-derived products. *Journal of agricultural and food chemistry*, **53**, 1370-1373.
- Gil del Valle L., Hernández R.G. and Ávila J.P. (2013) Oxidative Stress Associated to Disease Progression and Toxicity during Antiretroviral Therapy in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Virology and Microbiology*, 15p, DOI: 10.5171/2013.279685
- Girard A., Madani S., Boukott F., Cherkaoui-Malki M., Belleville J. and J. Prost, (2006) Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition*, **22**, 758-766.
- Gladston M., Feldman J. G., Levytska V. and Magnussen B. (1987) Antioxidant activity of serum ceruloplasmin and transferrin available iron-binding capacity in smokers and nonsmokers. *The American review of respiratory disease*, **135**, 783-787.
- Goldsby R., Kindt T.J. and Osborne B.A. (2001) Immunologie, 4ème éd. Dunod, Paris

- Gonzalez-Montelongo R., Gloria Lobo M. and Gonzalez M. 2010 Antioxidant activity in banana peel extracts: testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, **119**, 1030–1039.
- Goodwin T.W. (1955) Studies in Carotenogenesis a survey of the polyenes in a number of ripe berries. *Biochemistry*, **62**, 347-352.
- Green P. S. and Simpkins J. W. (2000) Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **18(4-5)**, 347-58
- Guarrera P.M. and Leporatti M.L. (2007) Ethnobotanical remarks on central and southern Italy. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, **3**, 23.
- Cuendet M., Hostettmann K. and Potterat O. (1997) Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, **80**, 1144-1152
- Gulcin I., Huyut Z., Elmastas M. and Aboul-Enein H. Y. (2010) Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, **3**, 43-53.
- Hajdú Z., Martins A., Orbán-Gyapai O., Forgo P., Jedlinszki N., Máthé I. and Hohmann J., (2014) Xanthine Oxidase-Inhibitory Activity and Antioxidant Properties of the Methanol Extract and Flavonoids of *Artemisia Asiatica*. *Rec Nat. Prod*, **8(3)**, 299-302.
- Hancock J.T., Salisbury V., Ovejero-Boglione M.C., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R. and Harrison R. (2002) Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**, 3308–3310.
- Hasani P., Yasa N., Vosough-Ghanbari S., Mohammad irad A., Dehghan G. and Abdollahi M. (2007) *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharmaceutica*, **57**, 123-127.
- Havsteen B.H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, **96(2-3)**, 67-202.
- Hebbel R.P., Ney P.A. and Foker W. (1989) Autoxidation, dehydration and adhesivity may be related abnormalities of sickle erythrocytes. *American journal of physiology*, **256**, 579-583.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R. and Bobilya D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 572–584.

- Hendrich Andrzej B. (2006) Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, **27 (1)**, 27–40.
- Henrotin Y., Kurz B. and Aigner T. (2005) Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage*, **13 (8)**, 643-54.
- Herrera E. and Barbas C. (2001) Vitamin E: action , metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **57**, 43-56.
- Hille R. and Nishino T. (1995) Flavoprotein structure and mechanism : Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *The FASEB Journal*, **9(11)**, 995-1003.
- Hockenberry M. J., Taylor O. A., Gundy P. M., Ross A. K., Pasvogel A., Montgomery D., Ribbeck P., McCarthy K. and Moore I. (2013) F2-Isoprostanes: A Measure of Oxidative Stress in Children Receiving Treatment for Leukemia. *Biological Research For Nursing*, **16(3)**, 303-309.
- Hoult J and Payd M. (1996) Pharmological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology*, **27**, 713-722.
- Hu S.G., Li L. and He X.W. (2005) Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chineseese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, **1062**, 31-37.
- Huang D., Ou B. and Prior R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856.
- Hunt J., Wolff S. (1991) The role of histidine residues in the non-enzyme covalent attachment of glucose and ascorbic acid to protein. *Free Radical Research*, **14(4)**, 279-87
- Ito N., Fukushima S., Hagiwara A., Shibata M. and Ogiso T. (1983) Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, **70**, 343-352.
- Jacob R.A. (1995) The integrated antioxidant system. *Nutrition Research*, **15 (5)**, 755-66.
- Jain P.K. and Joshi H. (2012) Coumarin: Chemical and Pharmacological. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **02 (06)**, 236-240.
- Janaszewska A. and Bartosz G. (2002) Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, **62**, 231-236.

- Jokić S., Velić D., Bilić M. and Bucić-Kojić A., Plan inić M. and Tomas S. (2010) Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Science*, **28**, 206- 212.
- Jump up- Hughes, R.E. (1964) Reduction of dehydroascorbic acid by animal tissues. *Nature*, **203 (4949)**, 1068–9.
- Kaneko T., Baba N. and Matsuo M. (2003) Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxid-induced cytotoxicity. *Chemico-biological interactions*, **142**, 239-254.
- Karamat F., Olry A., Munakata R., Koeduka T., Sugiyama A., Paris C., et al. (2013) A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley. *Plant Journal*, **77**, 627–638.
- Khan I., Kulkari M.V., Gopal M. and Shahabuddin M.S. (2005) Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **15**, 3584-3587.
- Kim H.P., Son K.H., Chang H.W. and Kang S.S. (2004) Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, **96**(3), 229-245.
- Klinenberg J.R., Goldfinger S. and Seegmiller J.E. (1965) The effectiveness of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout. *Annals of Internal Medicine*, **62**, 639-47.
- Kohen R. and Nyska A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, **30**, 620-650.
- Kolayli S., Ocak M., Kucuk M. and Abbasoglu R. (2004) Does caffeine bind to metal ions. *Food Chemistry*, **84**, 383-388.
- Koleva I.I., Van Beek T.A., Linssen J.P.H., de Groot A. and Evstatieva L.N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, **13**, 8-17.
- Kostova I. (2005) Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, **5**, 29-46.

- Kovacs A., Forgo P., Zupko I., Réthy B., Falkay G., Szabo P. and Hohmann J. (2007) Phenanthrenes and a dihydrophenanthrene from *Tamus communis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*, **68**, 687-691.
- Kruidenier L. and Verspaget H.W. (2002) Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous? *Alimentatry Pharmacology and Therapeutics*, **16**, 1997-2015.
- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C. and Abdelly C. (2007) Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**, 244-249.
- Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T and Nakayama T (2002). Studies of the constituents of *Uruguayan propolis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4777-82.
- Kunwar A, Mishra B., Barik A., Kumbhare L.B., Pandey R., Jain V.K. and Priyadarsini K.I. (2007) 3,3_-Diselenodipropionic acid, an efficient peroxy radical scavenger and a GPx mimic, protects erythrocytes (RBCs) from AAPH-induced hemolysis. *Chemical Research in Toxicology*, **20**, 1482–1487.
- Kusano C. and Ferrari B. (2008) Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecular Biology*, **7(1)**, 1-15.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lake B.G. (1999) Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food And Chemical Toxicology*, **37(4)**, 423-53.
- Lambert J., Heath S., Even G., Campion D., Sleegers K., Hiltunen M., Combarros O., *et al.* (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, **41**, 1094–1099.
- Le K., Chiu F. and Ng K. (2007) Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, **105**, 353-363.
- Lefevre G., Beljean-Leymarie M., Beyerle F., Bonnefont-Rousselot D., Cristol J. P., Thérond P. and Torreilles J. (1998) Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Annales de Biologie Clinique*, **56**, 305-319.

- Leopoldini M., Russo N. and Toscano M. (2011) The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, **125**, 288–306.
- Leporatti M.L. and Ivancheva S. (2003) Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 123-142.
- Lesgards J.F., Durand P., Lassarre M., Stocker. P., Lesgards G., Lanteaume A., Prost M. and Lehucher-Michel M.P. (2002) Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. *Environmental Health Perspectives*, **110**, 479-486.
- Lesgards M., Lehucher-Michel P., Vidal N., Prost M., and Stocker P. (2005) Assessment of antioxidative activity of lipid-and watersoluble vitamins in human whole blood. Comparative analysis between a biological test and chemical methods. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **75**, 11-18.
- Lewis H.J. (2000) Drug-induced liver disease. *Medical Clinics of North America*, **84**, 1275–311.
- Liyana-Pathirana C.M. and Shahidi F. (2006) Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**, 477-485.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. and Jiang Y. (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102**, 771-776.
- Li M., Ford T., Li X., Gu J-D. (2011) Cytochrome cd1-containing nitrite reductase encoding gene nirS as a new functional biomarker for detection of anaerobic ammonium oxidizing (Anammox) bacteria. *Environmental Science and Technology*, **45**, 3547–3553.
- Lin C.M., Chen C.S., Chen C.T., Liang Y.C. and Lin J.K. (2002) Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**, 167-72.
- Lin W., Yuan L., Cao X., Tan W. and Feng Y. (2008) A coumarin-based chromogenic sensor for transition-metal ions showing ion-dependent bathochromic shift. *European Journal of Organic Chemistry*, **29**, 4981-4987.
- Lubec G. (1996) The hydroxyl radical: from chemistry to human disease. *Journal of investigative medicine*, **44**, 324-346.

- Macheix *et al.*, (2006) Les polyphénols en agroalimentaire, *Lavoisier* 1-28
- Maire R. (1959) FLORA de l’afrique du nord Vol VI publie par les soins de P. Quézel.Eds. Le chevalier, Paris, pp : 394.
- Manna C., D’angelo S., Migliardi V., Loffredi E., Mazzoni O., Morrica P., Galletti P. and Zappia V. (2002) Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. **50**, 6521-6526.
- Marco G.L. (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **45**, 594 – 8.
- Marrot L. and Meunier J.R. (2008) Skin DNA photodamage and its biological consequences. *Journal of American Academy of Dermatology*, **58(5)**, 139-148.
- Marston A. and Hostettmann K. (2006) Separation and Quantification of Flavonoids, in: Andersen, Ø.M., Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids-Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Boca Raton, pp : 1-34.
- Martínez-Cayuela M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. **77**, 147-161.
- Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C. and Giovannini C.(2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **16**, 577–586.
- Massey V. and Harris C.M. (1997) Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years. *Biochemical Society Transactions*, **25**, 750–755.
- Masuoka K.I., Nihei T., Masuoka K.K., Kenji S. and Isao K. (2012) The Inhibition of Uric Acid Formation Catalyzed by Xanthine Oxidase Properties of the Alkyl Caffeates and Cardol Noriyoshi. *Journal of Food Research*, **1(3)**, 887 -895.
- Mc Cord J. M. and Fridovich I. (1968) The Reduction of Cytochrome c by Milk Xanthine Oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **243 (21)**, 5753-5760.
- Meite S. *et al.*, (2014) The Experiment, Antioxidant *in vivo*, *in vitro* activity assessment and acute toxicity of aqueous extract of gomphre celosioides (*amaranthaceae*). *The Experiment*, **23 (3)**, 1601-1610.
- Mena S., Ortega A. and Estrela J. M. (2009) Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **674(1-2)**, 36-44.

- Mete N., Isik ., Erdinç L. and Gürkan F. (1999) The Effect of Fish Oil on Liver and Plasma MDA and Antioxidant Status of Rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **29**, 1–6.
- Meziti A., Meziti H., Boudiaf K., Benboubetra M. and Bouriche H. (2012) Polyphenolic Profile and Antioxidant Activities of Nigella Sativa Seed Extracts In Vitro and In Vivo. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **6**, 04-24.
- Middleton E.Jr., Kandaswami C. and Theoharides T.C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, **52(4)**, 673-751.
- Miftakhova A.F., Burasheva G.S., Abilov Z.A., Ahmad V.U. and Zahid M. (2001) Coumarins from the aerial part of *Halocnemum strobilaceum*. *Fitoterapia*, **72**, 319-321.
- Miller H.E. (1971) A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **48(2)**, 91-95.
- Morris C.J., Earl J.R., Trenam C.W. and Blake D.R. (1995) Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry and cell biology*, **27**, 109-122.
- Mota R., Thomas G., Barbosa Filho J.M. (1985) Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. *Journal of ethnopharmacology*, **13**, 289-300.
- Moure A., Franco D., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J. and Lema J.M. (2000) Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3890-7.
- Murphy M.P., Packer M.A., Scarlett J.L. and Martin S.W. (1998) Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *General Pharmacology*, **31**, 179-186.
- Nabavi S.M., Nabavi S.F., Alinezhad H., Zare M. and Azimi R., (2012) Biological activities of flavonoid-rich fractions of *Eryngium Caucasicum* Trautv. *European review for medical and pharmacological sciences*, **16(13)**, 81-87.
- Nada A.S., Hawas A.M., Abd Elmageed Z.Y. and Amin N.E. (2013) Protective value of Aloe vera extract against g-irradiation-induced some biochemical disorders in rats. *Journal of radiation research and applied sciences*, **6**, 3-7.

- Nagai T., Reiji I., Hachiro I. and Nobutaka S. (2003) Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, **80**, 29–33.
- Naoghare P.K., Kwon H.T. and Song J.M., (2010) On-chip assay for determining the inhibitory effects and modes of action of drugs against xanthine oxidase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **51**, 1-6.
- Nakamura M. and Yamazaki I. (1982) Preparation of bovine milk xanthine oxidase as dehydrogenase form. *The Journal of Biochemistry*, **92**, 1279-1286.
- Niki E., Komuro E., Takahashi M., Urano S., Ito E. and Terao K. (1988) Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 19809-19814.
- Nile S.H., Khobragade C.N. and Won Park Se. (2012) Antioxidant, Anti-inflammatory and Xanthine oxidase inhibitory Activity of *Tephrosia purpurea* L. *International Journal of Phytomedicine*, **4(2)**, 1-13.
- Nur Alam Md., Bristi N. J. and Rafiquzzaman Md. (2013) Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **21**, 143–152.
- Ogeturka M., Kusa I., Colakoglu N., Zararsiz I., Ilhanc N. and Sarsilmaz M. (2005) Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, 273–280.
- Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979) Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*, **95**, 351-8.
- Ozen T. (2009) Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (Watercress) leaf extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, **66** (2), 187-193.
- Ozen T., Darcan C., Aktop O. and Turkecul I. (2011) Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildy grown in the black sea region of Turkey. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, **14**, 72-84.
- Ozsoy N., Candoken E. and Akev N. (2009) Implications for degenerative disorders: antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in *Aloe vera*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2(2)**, 99-106.

- Pacher P., Nivorozhkin A. and Szabo C. (2006) Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews*, **58**, 87–114.
- Packer L., Kraemer K. and Rimbach G. (2001) Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, **17**, 888-895.
- Pandey K.B and Rizvi S.I. (2010) Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **3**, 2-12.
- Park P. J., Jung W. K., Nam K.S., Shahidi F. and Kim S. K. (2001) Purification and characterization of antioxidative peptides from proteinhydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American oil Chemists Society*, **78 (6)**, 651-656.
- Pietta P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**, 1035-1042.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. and Defraigne J.O. (2002) Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16**, 233-239.
- Quideau S., Deffieux D, Douat-Casassus C, Poységu L. (2011) Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis. *Angewandte Chemie*, **50** 586-621.
- Raja S., Ahamed K., Kumar V., Mukherjee K., Bandyopadhyay A. and Mukherjee P., (2007) Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 41-47.
- Rajarajeswari N. and Pari L. (2011) Antioxidant role of coumarin on streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetic rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **25(6)**, 355-61.
- Rajbir S., Sukhpreet S., Subodh K. and Saroj A. (2007) Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn . *Food and Chemical Toxicology*, **45**, 1216–1223.
- Rao C.V. (2004). Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutation Research*, **555**, 107-119.
- Rastelli G., Costantino L. and Albasini A. (1997). A model of the interaction of substrates and inhibitors with xanthine oxidase. *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 3007-3016.

- Redoyal L.M., Beltram M., Sauchó R. and Olmedo D.A. (2005) Bioorganic and medicinal chemistry. *Fitoterapia*, **15**, 4447-4450.
- Reish J., Bathory M., Szendrei K. and Novaku M.E. (1972) Weitere phenanthrene aus dem rhizom von *Tamus communis*. *Journal of Phytochemistry*, **12**, 228-229.
- Reiter R.J. (2000) Melatonin: lowering the high price of free radicals. *News in physiological sciences*, **15**, 246–250.
- Repcak M., Imrich J. and Fanekova M. (2001) Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L) Rauschert. *Plant Physiology*, **158**, 1085-1087.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, **20(7)**, 933-986.
- Robak J. and Gryglewski R. J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemistry and Pharmacology*, **37**, 837-841.
- Roede J.R. and Jones D.P. (2010) Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **51**, 380-390.
- Rostan E. F., DeBuys H. V., Madey D. L. and Pinnell S. R. (2001) Evidence supporting zinc as an important antioxidant for skin. *International Journal of Dermatology*, **41**, 606-611.
- Rundles R. W. (1966) Effects of Allopurinol on 6-Mercaptopurine Therapy in Neoplastic Diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **25(6)**, 655–656.
- Sahreen S., Khan M. R., Khan R. A. (2010) Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, **122**, 1205-1211.
- Saiful M.N. Azmi, Parveen J. and Azura A. (2012) Purification of Xanthine Oxidase Inhibitor from *Carica papaya* Leaves using Reversed Phase Flash Column Chromatography (RPFCC) - High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **6(1)**, 117-122.
- Saksela M., Lapatto R. and Raivio K.O. (1998) Xanthine oxidoreductase gene expression and enzyme activity in developing human tissues. *Biology of the Neonate*, **74(4)**, 274-80.
- Sanders S., Eisenthal R.S. and Harrison R. (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase – reneration of superoxyde anion. *European Journal of Biochemistry*, **245**, 541-548.

- Sanhueza J., Valdes J., Campos R., Garrido A. and Valenzuela A. (1992) Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemiareperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, **78(2)**, 211-8.
- Sasikumar D., Mathi S., Awdah Masoud A.H., and Ramesh T. (2012) Physiological and beneficial role of *Nelumbo nucifera* on hypercholesterolemia in rats exposed to cigarette smoke. *Journal of Pharmacy Research*, **5(1)**, 425-427.
- Schachter L.P. (1986) Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide by erythrocytes from individuals with sickle trait or normal hemoglobin. *European Journal of Clinical Investigation*, **16**, 204-210.
- Schmeda-Hirschmann G., Zuniga J., Dutra-Behrens M., Habermehl G. (1996) Xanthine oxidase inhibitory activity of flavonoids and tannins from *Hexachlamys edulis* (Myrtaceae). *Phytotherapy Research*, **10**, 260-262.
- Schmidt R.J. and Moulton S.P. (1983) The dermatitic properties of black bryony (*Tamus communis* L.). *Contact Dermatitis*, **9**, 390-396.
- Scholz R.W., Graham K.S., Gumprich E. and Reddy C.C. (1989) Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **570**, 514-7.
- Schrader T.J. and Cooke G.M. (2000) Examination of selected food additives and organochlorine food contaminants for androgenic activity in vitro. *Toxicological Sciences*, **53(2)**, 278-88.
- Schwart R.S., Rybicki A.C., Heath R.H. and Bertram H. (1987) Proteins 4-1 in sickle erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 15666-15672.
- Seidel V. (2005) Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. *Humana (Totowa)*, pp. 27-37.
- Serteyn D., Mouithys-Mickalad A., Franck T., Grulke S., Lamy M, Deby C. and Deby-Dupont G. (2002) La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. *Annale de Médecine Vétérinaire*, **146**, 137-53
- Serteyn D., Grulke S., Franck T., Mouithys-Mickalad A. and Deby-Dupont G. (2003) La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Annale de Médecine Vétérinaire*, **147**, 79-93

- Setzer W.N., Setzer M.C., Schmidt J.M., Moriarity D.M., Volger B., Reeb S., Holmes A.M. and Haber W.A. (2000) Cytotoxic components from the bark of *Stauranthus perforatus* from Monteverde, Costa Rica. *Planta Medica*, **66**, 493-494.
- Sha'afi R. I., Gary-Bobo C. M. and Solomon A. K. (1971) Permeability of Red Cell Membranes to Small Hydrophilic and Lipophilic Solutes. *Journal of General Physiology*, **58 (3)**, 238-258.
- Shaheen F., Ali L., Ali S., Erdemoglu N., and Sener B. (2009) Antioxidant flavonoids from *Tamus communis* ssp. *Cretica*. *Chemistry of Natural Compounds*, **45(3)**, 346-349.
- Shoskes D. A. (1998) Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: A new class of renoprotective agents. *Transplantation*, **66(2)**, 147–162.
- Signorini C., De Felice C., Durand T., Oger C., Galano J. M., Leoncini S., Pecorelli A., Valacchi G., Ciccoli L. and Hayek J. (2013) Isoprostanes and 4-hydroxy-2-nonenal: markers or mediators of disease? Focus on Rett syndrome as a model of autism spectrum disorder. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi: 10.1155/2013/343824.
- .Singh R.P., Dhanalakshmi S. and Rao A.R. (2000) Chemomodulatory action of Aloe vera on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice. *Phytomedicine*, **7(3)**, 209-19.
- Smirnoff N. (2005) Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: Smirnoff N, ed. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford: Blackwell Publishing, 53–86.
- Smyth T., Ramachandran, V.N. and Smyth W.F. (2009) A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **33 (5)**, 421-426.
- Sondhia S., Duke S.O., Green S., Gemejiyeva N.G., Mamonov L.K. and Cantrell C.L. (2012) Phytotoxic furanocoumarines from the shoots of *Semenovia transiliensis*. *Natural Product Communications*, **7**, 1327-1330.
- Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I. and Bahorun T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents : Mechanisms and actions. *Mutation Research*. **579**, 200-13.
- Sproll C., Ruger W., Andlauer C., Godelmann R. and Lachenmaier D.W. (2008) HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. *Food Chemistry*, **109**, 462-469.

- Stefanova T., Nikolova N., Michailova A., Mitov I., Iancovii., Zlabinger g.I. and Neychev H. (2007) Enhanced resistance to *Salmonella enteric sero var typhimurium* infection in mice after coumarin treatment. *Microbes and infection*, **9**, 7-14.
- Stevens C.R., Millar T.M., Clinch J.G., Kanczler J., Bodamyali T. and Blake D.R. (2000) Antibacterial properties of xanthine oxidase in human milk. *Lancet*, **356**, 829–830.
- Stevenson P.C., Simmonds M.S., Yule M.A., Veitch N.C., Kite GC, Irwin D. and Legg M. (2003) Insect antifeedant furanocoumarins from *Tetradium daniellii*. *Phytochemistry*, **63(1)**, 41-6.
- Stirpe F., and Della Corte E. (1969). The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 3855-3863.
- Stocker P., Lesgards J.F., Vidal N., Chalier F. and Prost M. (2003) ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochimica et Biophysica Acta* .**1621**, 1-8.
- Stocker R., Yamamoto Y., McDonagh A. F., Glaser A. N. and Ames B. N. (1987) Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, **235**, 1043-1046.
- Suresh Kumar, K., Ganesan, K., Subba Rao, P.V. (2008) Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - an edible seaweed. *Food Chemistry*. **107**, 289-295.
- Svobodová A., Psotová J. and Walterová D. (2003) Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. *Biomedical Papers*, **147(2)**, 137-145.
- Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A. and Sakata K. (1994) A simple screening method for antioxidant and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **58**, 1780-1783.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. and Polissiou M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, **90**, 333-340.
- Thati B., Noble A., Rowan R., Creaven S.B., Walsh M., Egan D. and Kavanagh K. (2007) Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*, **21**, 801-808.

- Thannickal V.J., Fanburg B.L. (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, **279**, 1005-28.
- Topçu G., Ay M., Bilici A., Sarıkurkcu C., Ozturk M. and Ulubelen A. (2007) A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, **103**, 816-822.
- Traxler P., Bold G., Buchdunger E., Caravatti G., Furet P., Manley P., O'Reilly T., Wood J. and Zimmermann J. (2001) Tyrosine kinase inhibitors: from rational design to clinical trials. *Medicinal research reviews*, **21(6)**, 499-512.
- Tsimogiannins D.I. and Oreopoulou V. (2006) The contribution of flavonoid Cring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'- hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **7**, 140-146.
- Turko I.V. and Murad F. (2002) Protein nitration in cardiovascular diseases. *Pharmacological Reviews*, **54**, 619-634.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160(1)**, 1-40.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. and Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**, 44-84.
- Van Acker S.A.B.E., van den Berg D.J., Tromp M.N.J.L., Griffioen D.H. *et al.*, (1996) Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, 331-342.
- Van Hoorn D.E.C., Nijveldt R.J., Van Leeuwen P.A.M., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D.B.A. and Van Norren K. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*, **451**, 111-118.
- Valenzuela A., Aspillaga M., Vial S. and Guerra R. (1989) Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content of different tissues of the rat. *Planta Medica*, **55**, 420-422.
- Von Gadow A., Joubert E. and Hanssmann C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea and furochromones. *Phytochemistry*, **1997**, **18**, 139-143.

- Wang J. and Mazza G. (2002) Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide productions in LPS/IFN- γ -activated RAW 264,7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50(15)**, 4183-9.
- Wang I.K., Lin-Shiau S.Y. and Lin J.K. (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome C release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60. *cells European Journal of Cancer*, **35**, 1517-25.
- Wardman P. and Candeias L.P. (1996) Fenton Chemistry: An Introduction. *Radiation Research*, **145**, 523-531.
- Watanabe T., Misawa S., Hiradate S. and Osaki M. (2008) Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytologist*, **178**, 581-589.
- Wong S.P., Leong L.P. and William Koh J.H. (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, **99**, 775-783.
- Wortmann R.L. (2005) Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. *Current Opinion in Rheumatology*, **17(3)**, 319-24.
- Wu, S.J. and L.T. Ng. (2008) Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT-Food Science Technology*, **41**, 323– 330.
- Xu P., Huecksteadt T. and Hoidal J. (1996) Molecular cloning and characterisation of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics*, **34**, 173-180.
- Yang J.H., Lin H.C. and Mau J.L. (2002) Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, **77**, 229-235.
- Yang H. M., Ham Y. M., Yoon W. J., Roh S. W., Jeon Y. J. Oda T. et al. (2012) Quercitrin protects against ultraviolet B-induced cell death in vitro in an in vivo zebrafish model. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **114**, 126–131.
- Yao N., Eisfelder B., Marvin J., and Greenberg J.T. (2004) The mitochondrion—An organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **40**, 596–610.

- Yildirim A., Mavi A., Oktay M., Kara AA., Algur O.F. and Bilaloglu V. (2000) Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia arentea* Desf. Ex. D.C.) sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis* L.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48(10)**, 5030- 5034.
- Young J.L., Boswel R.B. and Nies A.S. (1974) Severe allopurinol hypersensitivity. *Archives of Internal Medicine*, **134**, 553-558.
- Zafrilla P., Ferreres F. and Tomás-Barberán F.A. (2001) Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3651-3655.
- Zai-Qun L. (2006) The "unexpected role" of vitamin E in free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: alpha-tocopherol-mediated peroxidation. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **44(2)**, 233-9.
- Zhao, H., Fan, W., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Shan, L., Lin, Y., Kong, W. (2008) Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry*. **107**: 296-304.
- Zhang H.Y. and Wang L.F. (2004) Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **673 (1-3)**, 199-202.
- Zhang Q., Li N., Zhou G., Lu X., Xu Z. and Li Z. (2003) *In vivo* antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacological Research*, **48**, 151-155.
- Zimmerman HJ, Ishak KG.(1994) Hepatic injury due to drugs and toxins. In: MacSween RNM, Anthony PP, Scheuer PJ, Burt AD, Portmann BC, editors. *Pathology of the liver*. Edinburgh: Churchill Livingstone; p 563–633.