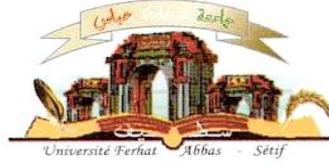


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

TRABSA Hayat

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Activité antioxydante et anti-inflammatoire des fractions des
plantes médicinales : *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum***

Soutenue publiquement le/...../2015

DEVANT LE JURY

Président	ARRAR Lekhmici	Pr.	UFA Sétif 1
Directeur	BAGHIANI Abderrahmane	Pr.	UFA Sétif 1
Examineurs	KHELIL Aminata	Pr.	Univ Ouargla
	ABDENNOUR Cherif	Pr.	Univ Annaba
	BOUMERFEG Sabah	DR.	Univ BBA

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Dédicaces

C'est avec l'aide et la grâce du Dieu que j'ai achevé ce modeste travail que je dédie :

A ma très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes frères et sœurs

Hamza, Rami, Amina, Malak et Bahi

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite

A mon fiancé Oussama et sa famille

A mes chères ami(e)s

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation

..... Hayat

REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Allah le tout puissant, merci de m'avoir accordé la force et la patience d'aller jusqu'au bout de mon rêve et le bonheur d'achever ce travail.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biochimie Appliquée et a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS, DGRSDT) et de l'Agence thématique de recherche en science de la Santé (ATRSS).

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon encadreur Pr. BAGHIANI Abderrahmane qui a guidé, suivi le déroulement et l'exécution du travail de cette thèse en me prodiguant tout aide possible, et en me consacrant son temps précieux.

Ma vive reconnaissance va au Pr ARRAR Lekhmici, professeur à l'Université Ferhat Abbas Sétif 1 d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.

J'adresse mes remerciements à Pr KHELIL Aminata, Professeur à l'Université de Ouargla, Pr ABDENNOUR Cherif, Professeur à l'Université de Annaba et Dr BOUMERFEG Sabah, Maître de conférences A à l'Université de Bordj Bouarréridj, d'avoir accepté de juger ce travail. Je présente ici le témoignage de ma sincère gratitude pour leur aide.

Je remercie Dr. OUHIDA S. maître assistante au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Sétif, ainsi que tous les techniciens et stagiaires du laboratoire pour leur aide précieuse dans la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques.

Je remercie Pr. TOUABTI Abderezak responsable du Laboratoire Central du CHU de Sétif. Mes sincères remerciements vont également à tout le personnel de son laboratoire pour leurs aides.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

RESUME

Le but de cette étude est d'évaluer les activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits des parties aériennes de *Sedum sediforme* (SS) et *Lycium arabicum* (LA) utilisées en médecine traditionnelle. Les broyats ont été soumis à une extraction et fractionnement pour avoir quatre extraits : l'extrait brut (EBr), extrait chloroformique (ECh), extrait d'acétate d'éthyle (EAe) et l'extrait aqueux (EAq). La quantité en polyphénols et en flavonoïdes la plus élevée a été présente dans l'EAe des deux plantes. Des méthodes enzymatiques et non-enzymatiques ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. La xanthine oxydase (XO) a été purifiée du lait bovin avec un rendement de 23 mg/l, une activité spécifique de 2261 nmole/min/mg, un rapport protéine / flavine de 5.23, et avec une bande majeure d'environ 150 KDa, en SDS-PAGE, indiquant une bonne pureté de l'enzyme. Les extraits EAe-LA et ECh-SS ont révélé l'inhibition de la XO la plus puissante ($IC_{50} = 17.92 \pm 0.19$ et 36.37 ± 2.68 $\mu\text{g/ml}$, respectivement). Une étude *in vivo* a été réalisée par l'injection de 50 mg/Kg de chaque fraction à des souris hyperuricémiques. Toutes les fractions injectées ont montré un effet hypouricémique où l'EAe-LA a provoqué une forte inhibition de la XO sérique (75.15 ± 1.05 %) et l'ECh-SS sur la XO hépatique (67.52 ± 0.97 %). Le test scavenger du DPPH a montré que l'EBr-SS et l'EAe-LA présentent l'effet le plus puissant avec une IC_{50} de 7.09 ± 0.12 et 35.44 ± 0.24 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. L'EBr-SS a montré l'effet le plus élevé dans le test du cytochrome c et le test du NBT avec une IC_{50} de 0.170 ± 0.001 mg/ml et 0.063 ± 0.005 mg/ml, respectivement. Tous les extraits inhibent remarquablement le blanchissement de β -carotène où l'EBr-SS et l'EBr-LA ont exercé l'effet le plus élevé ($I\% = 89.04 \pm 1.008$ % et 84.477 ± 0.534 %, respectivement). Les extraits ECh-SS et EAe-LA ont montré une activité chélatrice du Fe^{+2} modérée. Le pouvoir réducteur des extraits a été évalué en utilisant la technique de FRAP. Les extraits ont exercé un pouvoir réducteur remarquable surtout l'EBr-SS (TAP à 30 min = 110.214 ± 5.782 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mg}$ d'extrait). Cette activité a été confirmée *in vivo* où l'injection d'EBr-SS (25 et 50 mg/Kg) et d'EBr-LA (50 et 100 mg/Kg) a conduit à l'augmentation de la capacité antioxydante totale du sang et de plasma. De plus, l'effet anti-hémolytique le plus élevé a été observé avec l'EBr-LA (% d'inhibition d'hémolyse = 99 %). L'activité anti-inflammatoire chez les souris en utilisant le PMA a montré que l'EBr-SS (12.5 et 25 mg/Kg) et l'EBr-LA (50 et 100 mg/Kg) ont réduit significativement le poids et l'épaisseur de l'œdème de l'oreille (38.57 ± 1.87 %, 56.58 ± 4.08 % et 34.44 ± 2.59 %, 55.26 ± 4.36 %, respectivement). Ces résultats peuvent être considérés comme point de départ pour des applications de ces plantes en santé pour le traitement de certaines maladies où l'inhibition de la XO est nécessaire.

Mots clés : Anti-hémolytique, Anti-inflammatoire, Antioxydant, Flavonoïdes, Hyperuricémie, Polyphénols, Xanthine oxydase, *Sedum sediforme*, *Lycium arabicum*.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضاد للإلتهاب لنبتي *Sedum sediforme* (SS) و *Lycium arabicum* (LA) المستعملة في الطب الشعبي. تم استخلاص الأجزاء الهوائية للحصول على أربعة مستخلصات: المستخلص الخام (EBr) ومستخلص الكلوروفورم (ECh) ومستخلص إيثيل الأسيتات (EAe) والمستخلص المائي (EAq). أظهر تقدير كمية عديدات الفينول والفلافونويدات أن EAe للنبتين يحتوي على أكبر كمية. استعملت طرق إنزيمية و غير إنزيمية لتقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات. تمت تنقية الإنزيم المؤكسد للكزانثين (XO) من حليب البقر بمرودود 23 مغ/ل، ونشاطية نوعية 2261 نانومول/دقيقة/مغ، وقدرت نسبة البروتين إلى الفلافين ب 5.23، كما أظهر الفصل الكهربائي SDS-PAGE شريطا رئيسيا واحدا في حدود 150 كد، مما يدل على النقاوة العالية للإنزيم. أعطى LA-EAe و SS-EBr تثبيطا عاليا ضد إنزيم XO (IC_{50} = 1.05 ± 17.92 و 2.68 ± 36.37 ميكروغ/مل، على الترتيب). بينت دراسة في الكائن الحي (*in vivo*) على فئران مصابة بفرط إنتاج حمض اليوريا، عن طريق حقن 50 مغ/كغ من كل مستخلص، أن كل المستخلصات أدت إلى خفض حمض اليوريا. وقد أعطى LA-EAe تثبيطا عاليا ضد XO في البلازما بنسبة 1.05 ± 75.15 % و SS-ECh ضد XO في الكبد بنسبة 0.97 ± 67.52 %. بين إختبار إزاحة جذر DPPH أن المستخلصين SS-EBr و LA-EAe يملكان أعلى قدرة إزاحية (IC_{50} = 0.12 ± 7.09 و 0.53 ± 84.47 ميكروغ/مل، على الترتيب). كما بينت أن SS-EBr يملك أعلى قدرة إزاحية لجذر $O_2^{\cdot-}$ سواء باختبار cytochrome c أو باختبار NBT (IC_{50} = 0.001 و 0.005 ± 0.063 مغ/مل، على الترتيب). أما نتائج اختبار تبيض البيتاكاروتين فقد أثبتت أن المستخلصات تملك نشاطا معتبرا مضادا للأكسدة حيث أظهر EBr للنبتين SS و AL النشاط الأكبر بنسبة (1.00 ± 89.04 % و 0.53 ± 84.47 %، على الترتيب). أظهر كل من SS-EBr و LA-EAe قدرة متوسطة في استخلاص أيونات الحديد الثنائي (Fe^{2+}). من جهة أخرى، بين تقدير القدرة الإرجاعية لمختلف المستخلصات بتقنية FRAP أن المستخلصات تملك قدرة إرجاعية جد معتبرة خاصة SS-EBr (TAP) في 30 د = 5.78 ± 110.21 ميكرومولر Fe^{2+} / مغ من المستخلص). وتم إثبات هذه النشاطية *in vivo* حيث أدى حقن المستخلصات SS-EBr (12.5-50 مغ/كغ) و LA-EBr (50-100 مغ/كغ) إلى زيادة في النشاطية الكلية المضادة لأكسدة الدم والبلازما. أظهر SS-EBr المستخلص النشاطية المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء بنسبة 99 %. كما أظهرت النشاطية المضادة للإلتهاب بإستعمال PMA عند الفئران أن المستخلص SS-EBr (25 مغ/كغ) و LA-EBr (100 مغ/كغ) أديا إلى خفض وزن وسمك وذمة الأذن (1.78 ± 38.57 % ، 4.08 ± 56.58 % و 2.59 ± 34.44 % ، 24.36 ± 55.26 % ، على الترتيب). يمكن اعبار هذه النتائج نقطة بداية لاستعمال هذه النباتات في مجال الصحة خاصة في علاج الأمراض التي تتطلب تثبيط إنزيم XO.

الكلمات المفاتيح: مضادات الإنحلال الدموي، مضادات الإلتهاب، مضادات الأكسدة، الفينولات، إنتاج مفرط من اليوريا، عديدات الفينول، إنزيم مؤكسد للكزانثين، *Sedum sediforme*، *Lycium arabicum*.

Summary

The aim of this study was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of *Sedum sediforme* (SS) and *Lycium arabicum* (LA) shoots extracts, used in folk medicine. Methanolic extracts were subjected to fractionation to give four fractions: crude extract (EBr), chloroformic extract (ECh), ethyl acetate extract (EAe) and aqueous extract (EAq). Both enzymatic and non-enzymatic methods were used to evaluate the antioxidant activity of extracts. The highest total polyphenols and flavonoids amounts were recorded in EAe of both plants. Xanthine oxidase (XO) was purified from bovine milk with yield of 23 mg/l, specific activity of 2261 nmole/min/mg, protein/flavin ratio of 5.23, and a single major band, on SDS-PAGE, of approximately 150 KDa, indicating a high purity of the purified enzyme. EAe-LA and ECh-SS extracts showed the highest XO inhibitory effect ($IC_{50} = 17.92 \pm 0.19$ and 36.37 ± 2.68 $\mu\text{g/ml}$, respectively). *In vivo* study was performed by the injection of 50 mg/Kg of each fraction to hyperuricemic mice. All fractions showed hypouricemic effect were EAe-LA caused a strong inhibition of serum XO (75.15 ± 1.05 %) and ECh-SS on liver XO (67.52 ± 0.97 %). DPPH scavenging assay showed that EBr-SS and EAe-LA exhibited the highest effect with an IC_{50} 7.09 ± 0.12 and 35.44 ± 0.24 $\mu\text{g/ml}$, respectively. EBr-SS presented the highest effect in both cytochrome c test and NBT assay with an IC_{50} of 0.170 ± 0.001 mg/ml and 0.063 ± 0.005 mg/ml, respectively. All extracts inhibited the bleaching of β -carotene, with a remarkable percentage. The highest effect was showed by EBr-SS and EBr-LA (% I = 89.04 ± 1.00 % and 84.47 ± 0.53 %, respectively). Both ECh-SS and EAe-LA had a moderate chelating activity on ferrous iron (Fe^{+2}). Reducing power of extracts was evaluated using FRAP assay. Extracts exhibited a considerable reducing power, and the highest power was recorded for EBr-SS (TAP at 30 min = 110.214 ± 5.782 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ /mg of extract). This activity was confirmed *in vivo* when the injection of EBr-SS (25 and 50 mg/Kg) and EBr-LA (50 and 100 mg/Kg) led to the increase of the total antioxidant capacity of blood and plasma. In addition, the highest anti-haemolytic effect was observed with EBr-LA (% of hemolysis inhibition = 99 %). The anti-inflammatory effect using PMA in mice showed that EBr-SS (12.5 and 25 mg/Kg) and EBr-LA (50 and 100 mg/Kg) reduced the weight and the thickness of the ear edema (38.57 ± 1.87 %, 56.58 ± 4.08 % and 34.44 ± 2.59 %, 55.26 ± 4.36 %, respectively). These results can be considered as a starting point for further applications of these plants for the treatment of diseases where the inhibition of XO is warranted.

Key words: Anti-hemolytic, Anti-inflammatory, Antioxidant, Flavonoids, Hyperuricemia, Polyphenols, Xanthine oxidase, *Sedum sediforme*, *Lycium arabicum*.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I: PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	3
<i>I.1 STRESS OXYDANT.....</i>	<i>3</i>
<i>I.1.1 Radicaux libres.....</i>	<i>3</i>
<i>I.1.2 Formes des radicaux libres</i>	<i>3</i>
I.1.2.1 Espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	4
I.1.2.2 Espèces réactives de l'azote (RNS).....	4
<i>I.1.3 Sources des radicaux libres.....</i>	<i>5</i>
I.1.3.1 Sources endogènes.....	5
I.1.3.2 Sources exogènes.....	6
<i>I.1.4 Rôles physiologiques des radicaux libres.....</i>	<i>7</i>
<i>I.1.5 Rôles pathologiques des radicaux libres</i>	<i>8</i>
<i>I.2 XANTHINE OXYDOREDUCTASE.....</i>	<i>10</i>
<i>I.2.1 Définition et structure.....</i>	<i>10</i>
<i>I.2.2 Formes de la XOR</i>	<i>11</i>
<i>I.2.3 Distribution de la XOR.....</i>	<i>12</i>
<i>I.2.4 Rôles physiologiques de la XOR.....</i>	<i>13</i>
<i>I.2.5 Rôles pathologiques de la XOR.....</i>	<i>13</i>
<i>I.2.6 Inhibiteurs de la XOR.....</i>	<i>15</i>
<i>I.3 INFLAMMATION.....</i>	<i>15</i>
<i>I.3.1 Inflammation aiguë.....</i>	<i>16</i>
<i>I.3.2 Inflammation chronique.....</i>	<i>17</i>
<i>I.3.3 Cellules impliquées dans l'inflammation.....</i>	<i>18</i>
<i>I.3.4 Médiateurs de l'inflammation.....</i>	<i>19</i>
<i>I.3.5 Anti-inflammatoires</i>	<i>19</i>
<i>I.4 ANTIOXYDANTS</i>	<i>21</i>
<i>I.4.1 Antioxydants enzymatiques.....</i>	<i>21</i>
<i>I.4.2 Antioxydants non enzymatiques.....</i>	<i>22</i>
<i>I.5 POLYPHENOLS</i>	<i>23</i>
<i>I.5.1 Acide phénolique</i>	<i>23</i>
<i>I.5.2 Flavonoïdes.....</i>	<i>24</i>
<i>I.5.3 Tannins</i>	<i>25</i>
<i>I.6 PLANTES MEDICINALES UTILISEES.....</i>	<i>26</i>
<i>I.6.1 Sedum sediforme.....</i>	<i>26</i>
I.6.1.1 Description botanique.....	26
I.6.1.2 Répartition géographique et classification.....	26
I.6.1.3 Utilisation traditionnelle.....	27
<i>I.6.2 Lycium arabicum</i>	<i>27</i>

I.6.2.1 Description botanique.....	27
I.6.2.2 Répartition géographique et classification.....	28
I.6.2.3 Utilisation traditionnelle.....	28
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES.....	29
<i>II.1 MATERIEL.....</i>	<i>29</i>
II.1.1 <i>Matériel biologique</i>	29
II.1.2 <i>Réactifs chimiques et matériel instrumental</i>	29
<i>II.2 METHODES.....</i>	<i>30</i>
II.2.1 <i>Extraction et analyses des fractions</i>	30
II.2.1.1 <i>Extraction des flavonoïdes</i>	30
II.2.1.2 <i>Dosage des polyphénols totaux</i>	32
II.2.1.3 <i>Dosage des flavonoïdes</i>	32
II.2.2 <i>Purification de la xanthine oxydase</i>	33
II.2.2.1 <i>Extraction et purification de la XO</i>	33
II.2.2.2 <i>Contrôle de pureté de la XO</i>	34
II.2.2.3 <i>Estimation de l'activité enzymatique de la XO</i>	35
II.2.3 <i>Test d'effet des extraits sur la XO</i>	35
II.2.3.1 <i>Test d'inhibition de la XO in vitro</i>	35
II.2.3.2 <i>Détermination du type d'inhibition</i>	36
II.2.3.3 <i>Test d'inhibition de la XO in vivo (effet hypouricémique)</i>	36
II.2.4 <i>Tests d'activité antioxydante in vitro</i>	39
II.2.4.1 <i>Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)</i>	39
II.2.4.2 <i>Test d'effet scavenger du superoxyde produit par la XO (Cytochrome c)</i>	39
II.2.4.3 <i>Test d'effet scavenger du superoxyde produit par NADH-PMS (NBT)</i>	40
II.2.4.4 <i>Test de blanchissement de β-carotène / acide linoléique</i>	41
II.2.4.5 <i>Test de chélation des métaux (Ferrozine)</i>	41
II.2.4.6 <i>Test de pouvoir réducteur (FRAP)</i>	42
II.2.4.7 <i>Test d'activité anti-hémolytique</i>	43
II.2.5 <i>Test de toxicité aiguë (Détermination de la DL_{50})</i>	43
II.2.6 <i>Test d'activité antioxydante in vivo</i>	44
II.2.6.1 <i>Test d'activité anti-hémolytique in vivo</i>	45
II.2.6.2 <i>Test de capacité antioxydante plasmatique (DPPH in vivo)</i>	45
II.2.6.3 <i>Test de pouvoir réducteur plasmatique (FRAP in vivo)</i>	45
II.2.7 <i>Test d'activité anti-inflammatoire</i>	46
II.2.8 <i>Analyses statistiques</i>	47
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION	48
<i>III.1 EXTRACTION ET ANALYSES DES FRACTIONS.....</i>	<i>48</i>
III.1.1 <i>Extraction des flavonoïdes</i>	48
III.1.2 <i>Dosage des polyphénols totaux</i>	49
III.1.3 <i>Dosage des flavonoïdes</i>	50
<i>III.2 PURIFICATION DE LA XO.....</i>	<i>51</i>
<i>III.3 TEST D'EFFET DES EXTRAITS SUR LA XO.....</i>	<i>53</i>
III.3.1 <i>Test d'effet inhibiteur de la XO in vitro</i>	53
III.3.2 <i>Détermination du type d'inhibition</i>	56
III.3.3 <i>Test d'inhibition de la XO in vivo (effet hypouricémique)</i>	57
<i>III.4 TESTS D'ACTIVITE ANTIOXYDANTES IN VITRO</i>	<i>61</i>

<i>III.4.1 Test d'activité anti-radicalaire (DPPH).....</i>	<i>61</i>
<i>III.4.2 Test d'effet scavenger du superoxyde produit par la XO (Cytochrome c).....</i>	<i>64</i>
<i>III.4.3 Test d'activité scavenger du superoxyde produit par NADH-PMS (NBT).....</i>	<i>66</i>
<i>III.4.4 Test de blanchissement de β-carotène / acide linoléique.....</i>	<i>67</i>
<i>III.4.5 Test de chélation des métaux (Ferrozine).....</i>	<i>70</i>
<i>III.4.6 Test de pouvoir réducteur (FRAP).....</i>	<i>73</i>
<i>III.4.7 Test d'activité anti-hémolytique.....</i>	<i>78</i>
<i>III.5 TEST DE TOXICITE AIGUË (DL₅₀)</i>	<i>84</i>
<i>III.6 TEST D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE IN VIVO</i>	<i>85</i>
<i>III.6.1 Test d'activité anti-hémolytique in vivo.....</i>	<i>85</i>
<i>III.6.2 Test de capacité antioxydante plasmatique (DPPH in vivo)</i>	<i>88</i>
<i>III.6.3 Test de pouvoir réducteur plasmatique (FRAP in vivo)</i>	<i>90</i>
<i>III.7 TEST D'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE</i>	<i>92</i>
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	97
REFERENCES.....	100
ANNEXES	

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure secondaire de la XOR.....	10
Figure 2. Réactions d'oxydoréduction catalysées par la XOR.....	11
Figure 3. Modèle de structure de xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO).....	11
Figure 4. Mécanisme de génération des ROS par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion.	14
Figure 5. Inflammation aiguë..	16
Figure 6. Squelettes de base de tous les flavonoïdes	24
Figure 7. Aspect morphologique de <i>Sedum sediforme</i>	26
Figure 8. Aspect morphologique de <i>Lycium arabicum</i>	28
Figure 9. Etapes de l'extraction des flavonoïdes des broyats des deux plantes.	31
Figure 10. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	32
Figure 11. Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine.....	33
Figure 12. Spectre d'absorption UV-Visible de la XO purifiée.	52
Figure 13. Electrophorèse (SDS-PAGE) de la XO purifiée	52
Figure 14. Inhibition de la XO par les extraits de SS et LA.....	54
Figure 15. Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence d'allopurinol.....	56
Figure 16. Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de quercétine et catéchine.	57
Figure 17. Cinétique d'activité anti-radicalaire des fractions de SS et LA..	62
Figure 18. IC ₅₀ d'inhibition de la XO en suivant la production d'acide urique et en suivant la réduction de Cyt c des extraits de SS et LA.	65
Figure 19. Effet piègeur du superoxyde produit dans le système (PMS-NADH-NBT) par les extraits de SS et LA.	66
Figure 20. IC ₅₀ d'effet piègeur du superoxyde produit dans le système (PMS-NADH-NBT) par les extraits de SS et LA.	67
Figure 21. Cinétique de blanchissement du β-carotène en absence et en présence des extraits de SS et LA.....	68
Figure 22. Activité antioxydante en présence des extraits (SS et LA) et du BHT à 24 h par le test de β-carotène / acide linoléique..	69
Figure 23. Chélation des ions ferreux des extraits des deux plantes (SS et LA).....	71

Figure 24. Concentration effective qui exprime 50% de la chélation de Fe^{2+} des fractions de SS et LA..	72
Figure 25. Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe^{3+} en TPTZ-Fe^{2+} par les extraits de SS (27.75 $\mu\text{g/ml}$).....	74
Figure 26. Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe^{3+} en TPTZ-Fe^{2+} par la Vit C.....	74
Figure 27. Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe^{3+} en TPTZ-Fe^{2+} par les extraits de LA (55.55 $\mu\text{g/ml}$).....	75
Figure 28. Cinétique d'hémolyse des globules rouges en absence (T) et en présence des extraits de SS.	78
Figure 29. Cinétique d'hémolyse des globules rouges en absence (T) et en présence des extraits de LA..	79
Figure 30. Cinétique d'hémolyse des globules rouge en absence (T) et en présence du Vit C..	80
Figure 31. Cinétique de l'hémolyse provoqué par le <i>t</i> -BHP des groupes traités.....	85
Figure 32. Temps de demi-hémolyse (HT_{50} min) de sang des groupes traités	86
Figure 33. ΔT (min) des groupes traités.	87
Figure 34. % IH des groupes traités	88
Figure 35. % CAP des groupes traités.....	89
Figure 36. Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe^{3+} en TPTZ-Fe^{2+} des groupes traités.	90
Figure 37. Valeurs de FRAP des groupes traités.....	91
Figure 38. Poids et épaisseur d'œdème d'oreille provoqué par le PMA des groupes traités. ...	92
Figure 39. Coupe histologiques des oreilles de groupe témoin.....	95
Figure 40. Coupe histologiques d'oreilles gauche de groupe traité avec le diclofénac.....	95
Figure 41. Coupe histologiques des oreilles gauche des groupes traités avec l'EBr de SS..	96
Figure 42. Coupe histologiques des oreilles gauches des groupes traités avec l'EBr de LA. ...	96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Différents types des espèces réactives.....	4
Tableau 2. Principaux rôles physiologiques des radicaux libres et ces dérivés	8
Tableau 3. Certaines pathologies résultent de stress oxydatif.....	9
Tableau 4. Différents leucocytes intervenant au cours de la réponse inflammatoire.....	18
Tableau 5. Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire	19
Tableau 6. Structures et classification de quelques acides phénoliques	23
Tableau 7. Structures des flavonoïdes.....	25
Tableau 8. Classification botanique de <i>Sedum sediforme</i>	27
Tableau 9. Classification botanique de <i>Lycium arabicum</i>	28
Tableau 10. Injections des groupes traités.....	37
Tableau 11. Répartition et doses injectées pour chaque groupe.....	44
Tableau 12. Doses injectées avant une heure de l'application de PMA.	46
Tableau 13. Rendements des fractions extraites en pourcentage par rapport au poids total et EBr.....	49
Tableau 14. Dosage des polyphénols totaux des fractions de SS et LA.	50
Tableau 15. Dosage des flavonoïdes des fractions de SS et LA.	51
Tableau 16. Caractéristiques de XO bovine purifiée.	53
Tableau 17. IC ₅₀ d'inhibition de la XO des extraits de SS et LA.....	54
Tableau 18. Concentration d'acide urique sérique et hépatique des groupes traités.....	58
Tableau 19. Dosage de l'activité de la XO sérique de tous les groupes étudiés.	59
Tableau 20. Dosage de l'activité de la XO hépatique des groupes traités.	60
Tableau 21. Dosage de l'urée et de la créatinine du sérum et du foie des groupes traités.....	61
Tableau 22. IC ₅₀ d'activité anti-radicalaire <i>vis-à-vis</i> le DPPH des extraits de SS et LA.....	63
Tableau 23. Equation de régression des extraits de SS et LA et Vit C, et leurs coefficients de corrélation.....	75
Tableau 24. Valeurs d'EC1 et TAP de SS à 4 min et 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP.	76
Tableau 25. Valeurs d'EC1 et TAP de LA à 4 min et 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP.	77
Tableau 26. Temps de demi-hémolyse (HT ₅₀ min) pour les fractions de SS.	81

Tableau 27. Temps de demi-hémolyse (HT_{50} min) pour les fractions de LA.	81
Tableau 28. Temps de latence (t_{lag} en min) des fractions de SS, LA et Vit C.	82
Tableau 29. ΔT des fractions de SS et Vit C.	83
Tableau 30. ΔT des fractions de LA et Vit C.	83
Tableau 31. Détermination de la DL_{50} d'EBr-SS par l'analyse en suivant la méthode de probits -méthode de moindres carrés (distribution normale).....	84
Tableau 32. Détermination de la DL_{50} d'EBr-LA par l'analyse en suivant la méthode de probits -méthode de moindres carrés (distribution normale).	84
Tableau 33. % d'inhibition d'œdème des groupes traités avec le diclofénac, les EBr de SS et LA.	93

LISTE DES ABREVIATIONS

¹O₂	Oxygène singulet
AA	Activité antioxydante
AAPH	2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS	Anti-inflammatoires stéroïdiens
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Catalase
CHU	Hôpital universitaire
COX	Cyclooxygénase
DL₅₀	Dose létale 50
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	Dithiothréitol
EAc	Extrait acétate d'éthyle
Eaq	Extrait aqueux
EBr	Extrait brute
EC1	Concentration équivalente 1
EC₅₀	Concentration effective qui chélate 50 % de Fe ²⁺
ECh	Extrait chloroformique
EC-SOD	Extracellulaire superoxyde dismutase
EHx	Extrait d'hexane
EQ ou R	Equivalent de quercétine ou la rutine
EqAG	Equivalent d'acide gallique
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FC	Folin-Ciocalteau
FRAP	Ferric Reducing/Antioxidant Power
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfure

HOCl	Acide hypochlorique
HT₅₀	Temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes
I/R	Ischemie reperfusion
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50 %
IL-2	Interleukine 2
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
LA	<i>Lycium arabicum</i>
LOO[•]	Lipidique peroxyde
MGGL	Membrane de globule gras du lait
Mo-Co	Cofacteur de molybdène
Na₂S	Sulfure de sodium
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT	Nitrobleu tetrazolium
NF	Facteur nucléaire
NO[•]	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrique synthase
O₂^{•-}	Anion superoxyde
OH[•]	Radical hydroxyle
ONAB	Office national des aliments de bétails
ONOO	Peroxydinitrite
PFR	Rapport protéine / flavine
PMA	Phorbol myristate acétate
PMS	Phenazine methosulphate
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PNNs	Polynucléaires neutrophiles
RL	Radical libre
RNS	Espèces réactives de l'azote
RO[•]	Radical alkoxyde
ROO[•]	Radical peroxyde
ROOH	Peroxyde organique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène

SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate
SOD	Superoxyde dismutase
SS	<i>Sedum sediforme</i>
TAP	Pouvoir antioxydant total
<i>t</i>-BHP	<i>tert</i> -butyle hydroperoxyde
TCA	Acide trichloracétique
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylene diamine
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale
TPTZ	Tripyridyl-triazine
XDH	Xanthine déshydrogénase
XO	Xanthine oxydase
XOLB	Xanthine oxydase du lait bovin
XOR	Xanthine oxydoréductase

***INTRODUCTION
GÉNÉRALE***

INTRODUCTION GENERALE

Radicaux libres, stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public. Au début des années 2000, ces notions n'étaient généralement évoquées que dans les congrès scientifiques. Mais ces dernières années, l'industrie pharmaceutique, les laboratoires d'analyses médicales et la presse grand public ont massivement diffusé des informations nécessaires. Ce terme est fréquemment employé dans un certain nombre de situations biochimiques, physiologiques et pathophysiologiques.

Le mode de vie, les mauvaises habitudes alimentaires, les changements d'environnement, de pollution, de métabolisme, de régime et d'âge, les systèmes de productions endogène des radicaux libres (tel que la xanthine oxydase) sont des facteurs influençant le stress oxydant qui est défini d'une manière concluante pour être associé au vieillissement et aux maladies relatives à l'âge, y compris les maladies inflammatoires, le cancer, maladie neuro-dégénérative, maladie cardio-vasculaire et diabète.

La recherche et la caractérisation de nouvelles substances bioactives, ou des drogues, a été intensifiée. Plusieurs études donnant des résultats controversés des antioxydants exogènes, discutant que le type, le dosage et la matrice de ces antioxydants peuvent être des facteurs déterminants l'équilibre entre les effets bénéfiques et délétères de ces composés naturels.

Les effets secondaires des antioxydants et des anti-inflammatoires disponibles, conduit à la recherche des substances naturelles dotées d'activités biologiques et/ou pharmacologiques et leur valorisation présentent un intérêt socio-économique, peut être sans équivoque en biopharmacologie. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable des substances à activités biologiques et pharmacologiques très variées et l'organisation mondiale de la santé a estimé que plus de vingt milles espèces végétales à travers le monde sont utilisées comme

produits. *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum*, se sont des plantes médicinales utilisées pour le traitement des maladies rhumatismales et inflammatoires.

Dans ce contexte, nous avons fixé les quatre objectifs suivants : (1) Extraction et analyse quantitative et qualitative du contenu en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits aqueux et organiques de *Sedum sediforme* et *Lycium arabicum*, (2) Évaluation de l'effet des extraits sur la XO purifié à partir de lait bovin et l'effet hypouricémique des extraits, (3) Testé l'activité antioxydante *in vitro* des extraits via plusieurs techniques (NBT, Cyt c, hémolyse,.....), (4) Évaluation du pouvoir antioxydant *in vivo*, (5) Évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits des deux plantes.

Chapitre I

Partie bibliographique

CHAPITRE I: PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Stress oxydant

L'organisme doit confronter et contrôler la présence des antioxydants et des pro-oxydants continuellement, ces derniers sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Le stress oxydant est le terme se rapportant au déséquilibre entre la génération des oxydants et l'activité des défenses anti-oxydantes, qui pourrait mener aux dommages oxydants. C'est une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des espèces radicalaire toxiques (Ríos-Arrabal *et al.*, 2013).

I.1.1 Radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires, cet électron lui confère une certaine instabilité et haute réactivité (demi-vie courte) (Ortiz *et al.*, 2013). Les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (Afanas'ev, 2009). A des concentrations physiologiques, les RLs jouent des rôles dans la signalisation, la migration et la différenciation cellulaire (Ziech *et al.*, 2010), mais à des concentrations plus élevées, ils induisent la mort cellulaire et l'apoptose (Salido et Rosado, 2009).

I.1.2 Formes des radicaux libres

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (Tableau 1), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003), et d'autre classification basé sur le type de radical en

donnant deux groupes principales : des radicaux dérivé de l'oxygène (Reactive oxygen species : ROS) ou d'autres atomes comme l'azote (Reactive nitrogen species : RNS) (Yan, 2014).

Tableau 1. Différents types des espèces réactives (Gutowski et Kowalczyk, 2013).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}	Oxygène singulet	1O_2
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}	Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$

I.1.2.1 Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

L'oxygène (O_2) est un élément essentiel pour des processus de la vie en aérobiose. Cependant, environ 5 % ou plus de l' O_2 inhalé est converti en espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS présentent un groupe de composés dérivés de la réduction incomplète de l'oxygène moléculaire (Merksamer *et al.*, 2013). Les ROS sont des médiateurs importants de la signalisation pendant divers processus biologiques, ils sont produits en réponse à des divers stimulus, y compris des facteurs de croissance, des cytokines et des facteurs chimiotactiques (Zhou *et al.*, 2013).

I.1.2.2 Espèces réactives de l'azote (RNS)

Le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), un RNS, est produit de manière endogène à partir de la L-arginine, de l'oxygène et du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) par plusieurs enzymes d'oxyde nitrique synthase (NOS) en réponse à un certain nombre de stimulus physiologiques. Le NO^{\cdot} est une espèce très réactives, il représente le messenger moléculaire idéal, il est impliqué dans le règlement d'un certain nombre de fonctions y compris la tension artérielle, phagocytes et l'activité antimicrobienne, homéostasie endothéliale et neuronale, adhérence de plaquette et de leucocyte, et l'induction de l'apoptose (De Marco, 2013).

La génération spontanée de l' $O_2^{\cdot-}$ et de radical NO^{\cdot} favorise la formation de peroxynitrite (**Equation 1**) qui est un produit très toxique, un RNS lui-même capable d'induire la peroxydation lipidique et la nitration de protéine (De Marco, 2013).



I.1.3 Sources des radicaux libres

Les cellules sont exposées à des ROS ou RNS de sources endogènes ou exogènes.

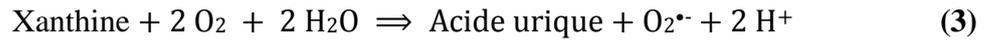
I.1.3.1 Sources endogènes

Au niveau des mitochondries, au cours du transfert d'électron dans la chaîne respiratoire, l' $O_2^{\cdot-}$ est produit par réaction de l' O_2 avec un radical semi-ubiquinone (Lagourge et Lorsson, 2013). Les complexes, nicotinamide adénine dinucléotide réduct (NADH)-ubiquinone oxydoréductase et l'ubiquinone-cytochrome c réductase, sont alors d'importants complexes membranaires mitochondriaux qui peuvent générer d' $O_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 (Zhang et Gutterman, 2007 ; Grivennikova et Vinogradov, 2013).

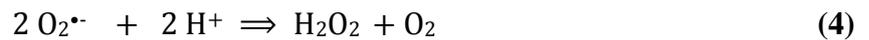
Les cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication d' $O_2^{\cdot-}$ (**Equation 2**). La NADPH oxydase phagocytaire joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Guzik, 2010 ; Touyz *et al.*, 2010). La NADPH oxydase des cellules non phagocytaires (les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules de muscles lisses), produit aussi des RLs en quantité plus faible, (1/3 des ROS phagocytaires), comme des régulateurs des cascades de signalisation intracellulaires (Cai, 2005).



La xanthine oxydase (XO) est une enzyme qui utilise l'oxygène moléculaire comme un accepteur d'électrons en produisant l' $O_2^{\cdot-}$ (**Equation 3**) au cours de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (O'Mahony *et al.*, 2013).



Le peroxyosome est une source importante dans la production cellulaire d'H₂O₂, cet organelle contient de nombreuses enzymes générant d'H₂O₂ (**Equation 4**) (Sandalio *et al.*, 2013). La catalase peroxyosomale utilise l'H₂O₂, généré par les enzymes de peroxyosome, comme substrat pour réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats, ces enzymes sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie (Wages *et al.*, 2014).



Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre sous leurs formes réduites, sont des remarquables promoteurs de processus radicalaires *in vitro* : ils transforment l'H₂O₂ en OH[•]. La formation d'OH[•], à partir d'H₂O₂ (**Equation 5**) en présence de fer ferreux (Fe²⁺), est dite réaction de Fenton (Fontaine, 2007 ; Cotticelli *et al.*, 2013).



Les lipooxygénases présentent une source importante de production des ROS dans les parois vasculaires, ces enzymes catalysent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) ou des acides gras estérifiés comme les esters de cholestérol pour donner des dérivés d'acides gras hydroperoxydes toxiques pour la cellule (Maccarrone, 2008).

L'oxyde nitrique synthase (NOS) est un générateur important du NO[•], à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Le NO[•] permet la production des autres RNS tel que le peroxydinitrite ONOO⁻ (Rahal *et al.*, 2014).

I.1.3.2 Sources exogènes

Dans les circonstances quotidiennes normales, des RLs sont produits en permanence en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense (Yan, 2014). Le tabagisme, poisons environnementaux, alcool et rayonnement ionisant favorisent la génération des RLs (Pickering *et al.*, 2013)

Les rayonnements ultraviolets (UV) solaire divisé en 3 composants, seulement l'UVA (320-400 nm) et l'UVB (290-320 nm) peuvent atteindre la surface de la terre, tandis qu'UVC (200-290 nm) est complètement bloqué par la couche d'ozone. L'irradiation des macromolécules par UVA peut causer la génération d' H_2O_2 et d' $\text{O}_2^{\bullet-}$. L'UVA a été également montré pour induire la formation de $^1\text{O}_2$. Les rayonnements ionisants sont bien connus pour induire la production des RLs, l'exposition à des radiations ionisants conduit à la production de ; $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} et $\text{ONOO}^{\bullet-}$ (Franco *et al.*, 2009).

Les métaux tels que le fer (Fe), cuivre (Cu), cadmium (Cd), mercure (Hg), nickel (Ni) et Zinc (Zn) ont la capacité de produire les ROS par l'intermédiaire de la réaction de Fenton, comme la production du radical hydroxyle et $^1\text{O}_2^{\bullet-}$. Le Ni (II) et le Fe (III) peut réagir avec H_2O_2 par différents mécanismes pour former des complexes du métal-oxygène (Mena *et al.* 2009 ; Wanges *et al.*, 2014).

Différentes expositions de pesticide, y compris des organophosphates, induisent le stress oxydant dû à la génération des RLs, aussi un changement des mécanismes de défense antioxydants (Migliore et Coppedè, 2009 ; Pickering *et al.*, 2013).

La fumée de cigarette (FC) est un mélange complexe et réactif d'environ 5000 produits chimiques produits par la combustion des ingrédients du tabac (Chalouhi *et al.*, 2012). Elle se compose de deux phases, l'une gazeuse, l'autre solide est constituée de goudrons, qui se caractérisent toutes deux par une concentration très élevée en ROS toxiques (Haj Mouhamed *et al.*, 2012). Chaque gramme de goudron provenant d'une cigarette contient 10^{17} RL, plus de 3000 composés aromatiques et de nombreux produits générateurs d'oxydants. La phase gazeuse de la fumée contient 10^{15} radical par bouffée ainsi que de nombreux NO (Ouellet *et al.*, 2007).

I.1.4 Rôles physiologiques des radicaux libres

Selon Dröge (2002), les radicaux libres ont les fonctions physiologiques suivantes (Tableau 2) :

Tableau 2. Principaux rôles physiologiques des radicaux libres et ces dérivés (Dröge, 2002).

Espèce	Rôle physiologique
O₂⁻ et dérivés	Transduction du signal.
	Relaxation du muscle lisse.
	Activation du facteur nucléaire (NF-κB) responsable de l'expression du gène de l'interleukine 2 (IL-2).
	Activation de la protéine kinase C.
	Amélioration des fonctions immunologiques par amplification du signal intracellulaire. dans les lymphocytes T.
	Induction de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales. Induction et exécution du phénomène d'apoptose.
NO[•]	Relaxation des muscles lisses.
	Modulation des fonctions des protéines kinases, phosphodiesterases, et des canaux ioniques.
	Activation des MAPK des cellules endothéliales et monocytes. Protection contre l'apoptose par inhibition de certaines cascades.

I.1.5 Rôles pathologiques des radicaux libres

Lors d'un stress oxydant, les RLs non détoxiquées par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Menon, 2014).

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les RLs. L'attaque radicalaire peut entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées, mais le stress oxydant peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (Burton et Jauniaux, 2011 ; Charbon *et al.*, 2014).

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par l'OH⁻ qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette réaction est appelée peroxydation lipidique qui aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques. Parmi ces dérivés, le malondialdéhyde qui a une demi-vie plus

longue que celle des RLs et qui diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN, et il provoque aussi une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète (Miwa *et al.*, 2008 ; Cotticelli *et al.*, 2013).

Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires. Les RLs sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane, la tyrosine et l'histidine, sur lesquels l'OH[•] s'additionne. L'oxydation par les RLs conduit à la formation des ponts disulfures, sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, en modifiant la conformation de la protéine. De nombreux enzymes cellulaires et protéines de transport vont ainsi être oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Důračková, 2008 ; Rahal *et al.*, 2014).

Un stress oxydatif est souvent associé à toutes sortes de maladies, mais il n'est pas toujours facile de déterminer s'il s'agit d'une cause ou une conséquence de l'état observé. Une sélection de pathologies pour lesquelles le mécanisme de stress oxydatif est bien documenté, est décrite dans le tableau 3.

Tableau 3. Certaines pathologies résultent de stress oxydatif.

Pathologie	Référence
Alzheimer	(Cai et Yan, 2007)
Cancer	(Goetz et Luch, 2008)
Cardiovasculaire	(Vijaya Lakshmi <i>et al.</i> , 2009)
Diabète	(Maritim <i>et al.</i> , 2003)
Obésité	(Gutowski et Kowalczyk, 2013)
Inflammation	(Libetta <i>et al.</i> , 2011)
Parkinson	(Cohen, 2002)
Syndrome métabolique	(Calhau et Santos, 2009)
Arthrites rhumatoïde	(Hitchon et El-Gabalawy, 2004)

I.2 Xanthine oxydoréductase

I.2.1 Définition et structure

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdo-flavo-protéique, qui a été identifié pour la première fois dans le lait bovin. La forme active de cette enzyme se produit comme un homo dimère approximativement du 290 kDa (Battelli *et al.*, 2014b). Chaque sous unité contient quatre centres redox (Figure 1), le domaine N-terminale présente deux sites Fe_2S_2 (29 KDa), le domaine intermédiaire contient une flavine adénine dinucléotide (FAD ; 40 KDa) et le domaine C-terminale contient le cofacteur de molybdène (Mo-Co) (85 KDa) (Pacher *et al.*, 2006).

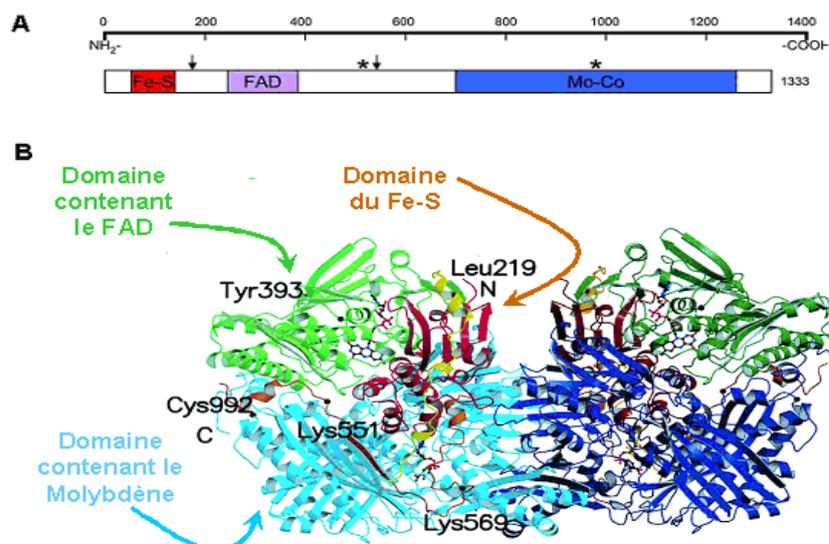


Figure 1. Structure secondaire de la XOR ; **A.** Arrangement linéaire de la structure primaire des domaines **B.** Structure cristalline de l'homodimère de la XOR bovine ; les domaines identiques des deux sous unités sont représentés par les mêmes couleurs (claires et foncées) : en rouge le domaine du Fe-S (résidus 3-165), en vert le domaine contenant le FAD (résidus 226-531) et en bleu le domaine contenant le molybdène (résidus 590-1331) (Pacher *et al.*, 2006).

Physiologiquement, l'enzyme catalyse la réduction de l'hypoxanthine et de la xanthine, (Figure 2), mais également il réduit un large spectre de N-hétérocycles et aldéhydes (Battelli *et al.*, 2014a). La réaction réductrice se produit au niveau du centre Mo-ptérine où la XOR accepte

deux électrons de la xanthine, ramenant le Mo^{VI} au Mo^{IV} et la réaction oxydante de NAD⁺ ou d'O₂ a lieu au niveau du centre FAD (Boueiz *et al.*, 2008 ; Cantu-Medellin et Kelly, 2013).

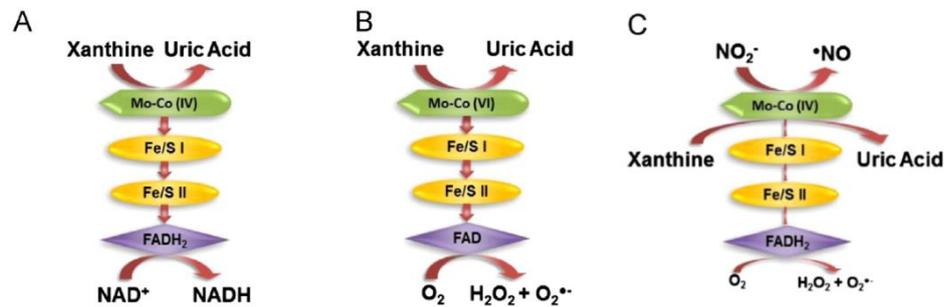


Figure 2. Réactions d'oxydoréduction catalysées par la XOR. (A) XDH ; l'oxydation de la xanthine en acide urique, un transfert d'électron du site d'entrée molybdène à travers les centres Fe-S vers le FAD pour la réduction de NAD⁺, (B) ou de l'O₂ pour la XO, (C) formation de NO* par la XO (Cantu-Medellin et Kelly, 2013).

I.2.2 Formes de la XOR

La XOR se synthétise sous forme appelée la xanthine déshydrogénase (XDH) qui peut convertir en xanthine oxydase (XO), ces deux formes ayant le même gène et les mêmes principaux domaines avec un changement structural. Ces formes peuvent être inter converties réversiblement par des réactifs de sulfure par exemple le dithiothréitol (DTT) qui fait la réduction de groupement thiol ou irréversiblement (XDH à XO) par la protéolyse (Pauff et Hille, 2009 ; Battelli *et al.*, 2014) (Figure 3).

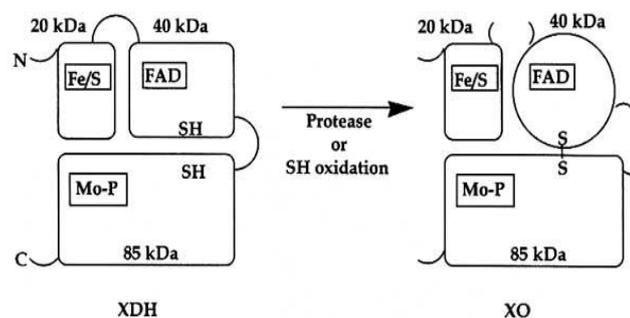


Figure 3. Modèle de structure de xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO) (Borges *et al.*, 2002).

La XDH réduit préférentiellement le NAD⁺ et l'O₂, tandis que la XO ne peut pas réduire le NAD⁺, préférant l'O₂. Donc la XDH, utilise NAD⁺ comme accepteur des 2 électrons provenant

de la purine oxydée, tandis que la XO transfère ces 2 e⁻ à 2 molécules d'O₂. La réduction de l'O₂ par l'une ou l'autre forme d'enzymes donne l'O₂^{•-} et l'H₂O₂. La XDH est la forme qui prédomine dans le catabolisme de purine ayant pour résultat la synthèse de l'acide urique (antioxydant) (Ginger *et al.*, 2004 ; Cantu-Medellin et Kelley, 2013).

La XOR a deux formes inactives, l'une est démolybdo-XOR et l'autre est désulfo-XOR, les formes inactives de la XOR peuvent être produites avec la perte d'un atome de soufre où le groupement Mo=S essentiel pour l'activité, est remplacé par le Mo=O ou par la perte d'un atome de molybdène (Gadave *et al.*, 2014). Ces formes représentent environ 60 % de l'enzyme du lait bovin (Bray, 1975) et plus de 97 % du lait humain (Sanders *et al.*, 1997). La forme desulfo-XOR peut être réactivée après une résulfuration en l'incubant avec des composés sulfurés tel que le sulfure de sodium (Na₂S) (Baghiani *et al.*, 2003). Cette réaction est catalysée par une sulfurase présente dans les tissus humains (Ichida *et al.*, 2001).

1.2.3 Distribution de la XOR

L'activité du XOR a été détectée dans toutes les espèces examinées, y compris les bactéries. Dans les tissus des mammifères, l'activité de cette enzyme est largement distribuée, avec les niveaux les plus élevés étant trouvés dans le foie et l'intestin (Cantu-Medellin et Kelley, 2013). Chez l'homme, mis à part le foie et l'intestin, la plupart des tissus montrent peu d'activité de XOR (George et Struthers, 2009). L'enzyme est un élément protéique important de la membrane de globule gras du lait (MGGL) (Gadave *et al.*, 2014).

La distribution cellulaire de XOR est légèrement spécialisée, avec des concentrations relativement élevées étant trouvées en cellules épithéliales et endothéliales, l'enzyme a été rapporté pour être exclusivement cytosoliques dans les cellules endothéliales de tissu des bovins (Mittal *et al.*, 2008). Le plus intéressant, c'est la région apicale des cellules épithéliales, donc ces cellules impliquant la sécrétion de XOR dans la bile (Martin *et al.*, 2004). Hellsten Westing a détecté la XOR dans les macrophages humains (DeJong *et al.*, 2000). La présence de XOR

circulée chez les mammifères a été identifiée, et beaucoup de différentes analyses ont été développées pour sa détermination (Battelli *et al.*, 2014a).

I.2.4 Rôles physiologiques de la XOR

Pour plusieurs décennies, le seul rôle présumé de la XOR était dans le catabolisme des purines (Cantu-Medellin et Kelley, 2013), mais sa complexité, son large spectre d'activité et sa distribution préférentielle dans les organes suggèrent des fonctions plus larges à cette enzyme dans la physiologie de l'organisme, il a été noté que la XOR est nécessaire à la sécrétion des MGGL (Vorbach *et al.*, 2002).

La XOR a la capacité de produire les ROS qui participent dans la signalisation, en particulier l'O₂[•] et l'H₂O₂. La capacité destructive des ROS est bien établie dans la défense antimicrobienne du lait humain et bovin qui inhibe la croissance des bactéries (Hancock *et al.*, 2002 ; Gadave *et al.*, 2014).

Au niveau de l'appareil gastro-intestinal, la XOR est fortement exprimée sur les cellules épithéliales, en jouant le rôle de barrière antimicrobienne (Battelli *et al.*, 2014b). La présence de la XOR dans la bile a été rapportée et il a été suggéré qu'elle servira de source additionnelle au tube digestif en cette enzyme (Martin *et al.*, 2004). Ainsi, dans des conditions anaérobies, la XOR catalyse la réduction de NO[•], qui a des propriétés bactéricides (Cantu-Medellin et Kelley, 2014).

I.2.5 Rôles pathologiques de la XOR

L'hyperuricémie est la pathologie la plus citée impliquant la XOR, c'est un état pathologique qui résulte de la surproduction (par XOR) ou l'excrétion (troubles des tubules rénaux) d'acide urique qui forme des cristaux microscopiques insolubles dans les vaisseaux capillaires des articulations. Ces cristaux provoquent une inflammation et une douleur aiguë ce qui donne une maladie s'appelle l'arthrite goutteuse aiguë (Jetanalin et Lee, 2013).

La XOR est liée à la pathophysiologie de la réoxygénation après hypoxie. C'est le processus l'ischémie reperfusion (I/R). L'hypoxanthine est libérée pendant l'ischémie suite à la dégradation d'adénosine triphosphate (ATP). Concurrément, le calcium pénètre dans les cellules favorisant ainsi l'activation des protéases qui convertissent la XDH en XO (forme productrice d' $O_2^{\cdot-}$) (Cour et Argaud, 2010). Lors de réperfusion, la XO oxyde l'hypoxanthine accumulée pour produire les ROS qui entraînent des dommages tissulaires (Battelli *et al.*, 2014a) (Figure 4).

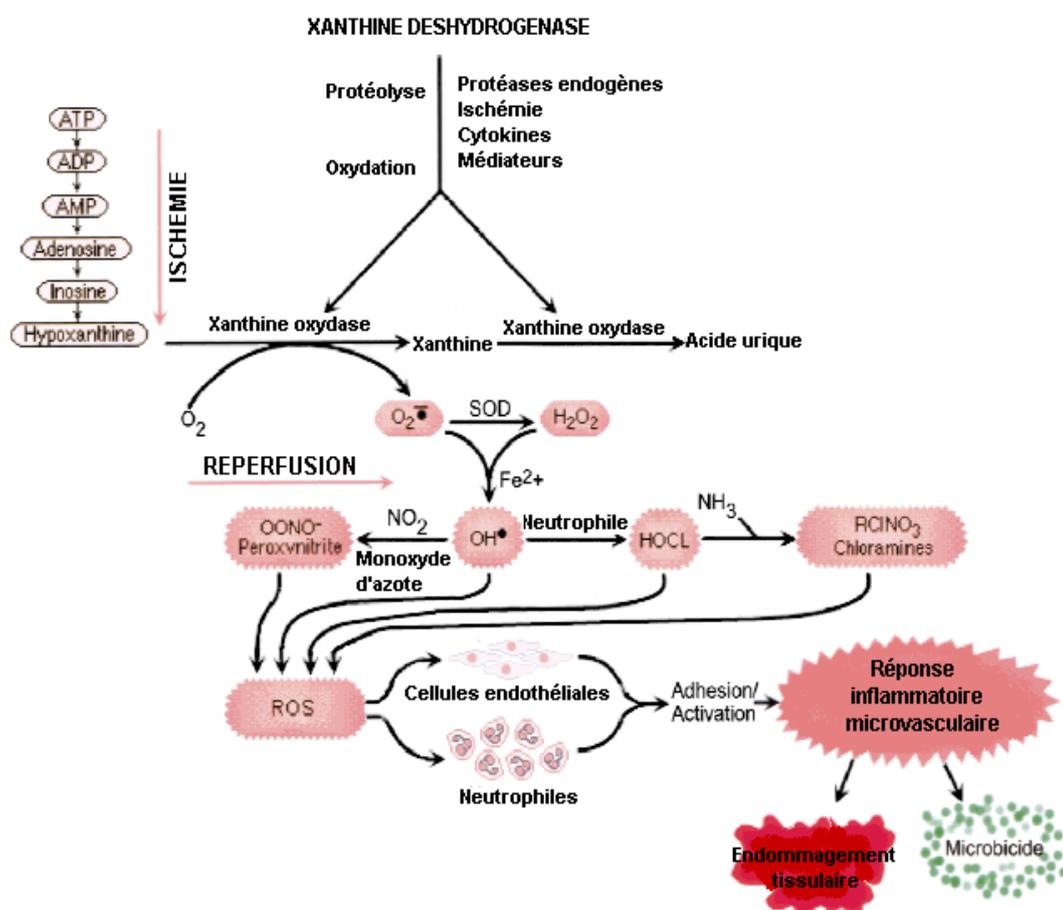


Figure 4. Mécanisme de génération des ROS par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion (Meneshian et Bulkley, 2002).

Au cours de l'inflammation, la XOR est activée par différents médiateurs inflammatoires, tels que $TNF-\alpha$ (facteur de nécrose tumorale), qui provoquent la conversion de la XDH en XO (Battelli *et al.*, 2014b), les neutrophiles activés causent également une conversion irréversible de la forme XDH en forme XO dans les cellules endothéliales (Richard *et al.*, 2007).

I.2.6 Inhibiteurs de la XOR

Les inhibiteurs de la XOR peuvent être divisés en deux catégories, des analogues structuraux de substrats et des molécules indépendantes de substrats physiologiques (Cui *et al.*, 2010). Les deux types d'inhibiteurs réagissent au niveau ou aux alentours du site Mo (George et Struthers, 2009).

Les inhibiteurs analogues de substrats renferment le groupe des pyrazol[3,4-d]pyrimidine, en particulier allopurinol, (1,5-dihydro-4-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one), qui est oxydé rapidement par la XO *in-vivo* pour former son métabolite actif, oxypurinol (alloxanthine). À concentrations élevées, l'allopurinol est un inhibiteur non-compétitif mais à faibles concentrations il inhibe l'enzyme compétitivement (Pacher *et al.*, 2006). L'allopurinol est utilisé pour la thérapie de la goutte (Bieber et Terkeltaub, 2004 ; Lee *et al.*, 2009).

Les autres inhibiteurs sont structurellement différents de substrats physiologiques, tel que les dérivés d'imidazole et de thiazole (Borges *et al.*, 2002), les cyanides, l'arsenite, le formaldéhyde et le méthanol (Park et Granger, 1986).

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs naturels de la XOR. Des études menées sur l'inhibition de la XO par les flavonoïdes montrent l'existence des similarités structurales entre le cycle A des flavonoïdes et le noyau purinique de l'hypoxanthine et la xanthine (Lin *et al.*, 2002 ; Lespade et Bercion, 2010).

I.3 Inflammation

L'inflammation est la réponse des tissus vivants vascularisés à une agression par une infection pathogène, ou par un traumatisme (Rankin, 2004). Le but de l'inflammation est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de la persistance de l'agent pathogène dans le siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire (Ashley *et al.*, 2012).

I.3.1 Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, elle est caractérisée par des phénomènes vasculoexsudatifs intenses, par une forte présence des polymorphonucléaires au niveau du foyer inflammatoire (Serhan *et al.*, 2010). Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement mais peuvent laisser des séquelles mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante. Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë sont toujours les mêmes quelque soient le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé (Dorward *et al.*, 2012) (Figure 5).

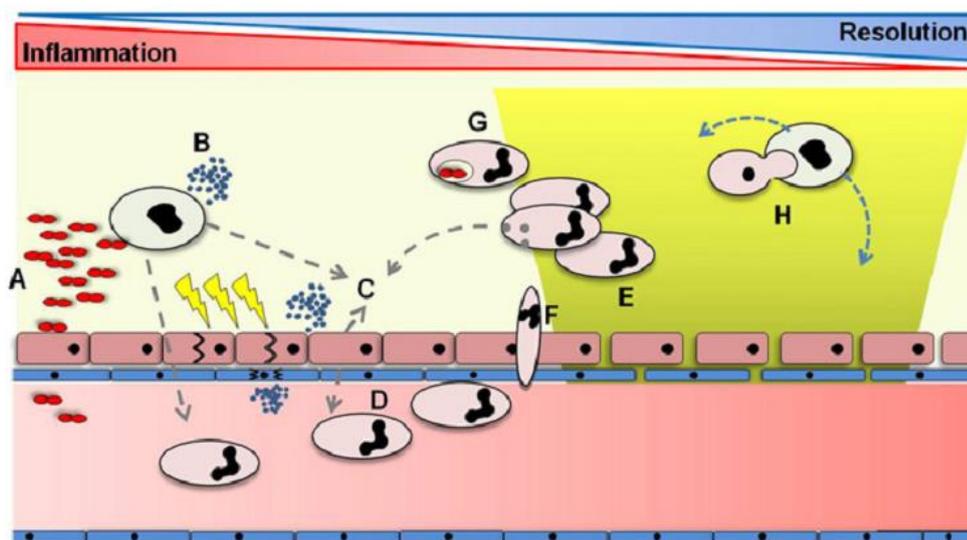


Figure 5. L'inflammation aiguë. Le processus inflammatoire aiguë est déclenché par l'interaction d'organismes pathogènes (A), ou les produits tissulaires (B), avec des récepteurs de reconnaissance présents sur les cellules inflammatoires résidentes dans les tissus affectés et les cellules épithéliales environnantes. Cela conduit à la libération de différents médiateurs pro-inflammatoires (C) conduisant à l'activation des cellules endothéliales (D), de la perméabilité vasculaire (E), l'adhésion des neutrophiles, l'activation et la transmigration (F) ainsi que l'activation des plaquettes et des monocytes, phagocytose (G) (Dorward *et al.*, 2012).

L'inflammation aiguë se déroule en trois phases : la phase vasculaire, la phase cellulaire et la phase de résolution. Des modifications vasculaires caractérisées par la tétrade classique ; douleur, rougeur, chaleur et tuméfaction, telles que l'augmentation de la perméabilité de la paroi vasculaire apparaissent au niveau du tissu enflammé. Ces modifications vasculaires permettent

la migration des leucocytes hors de la microcirculation et leur accumulation dans le foyer lésionnel et déclenche alors la phase cellulaire (Stevens, 2010).

Les polynucléaires sont les premières cellules qui migrent vers le site enflammé, pendant les 6 à 24 premières heures, puis un peu plus tard au-delà de 24 à 48 heures les monocytes et les lymphocytes sont recrutés. Elles se déplacent alors directement vers l'agent causal de l'inflammation, guidés par un gradient de concentrations de substances dites chimio-attractantes (Wagner et Roth, 2000). Arrivés au niveau du site inflammatoire, la phagocytose et la libération de différentes enzymes hydrolytiques (protéase, élastase et de collagénase...etc) des polynucléaires permettent la destruction de l'agent pathogène. Cependant, les macrophages permettent le nettoyage du foyer inflammatoire et l'élimination des débris cellulaires et tissulaires (Diegelmann et Evans, 2004 ; Male, 2005).

La phase de réparation sera plus ou moins importante et son intensité est liée au degré de destruction cellulaire. Les macrophages ne complètent pas seulement l'action des polynucléaires neutrophiles, mais également jouent un rôle de présentateurs de l'antigène et de réparateurs. Au début, ce sont les cellules endothéliales qui vont réparer l'endothélium. Ceci est dû à diverses molécules telles que la collagénase I ou III. Si la destruction est plus importante, non seulement les macrophages vont participer, les fibroblastes en produisant la fibronectine, la laminine et du collagène est l'élément clef de reconstruction (Gilroy et Lawrence, 2008).

I.3.2 Inflammation chronique

La persistance de la réaction inflammatoire et la perturbation de son contrôle physiologique conduisent à la chronicité de l'inflammation (Serhan *et al.*, 2010). En effet, une infiltration excessive des leucocytes au niveau du site inflammatoire et une mauvaise élimination de l'agent causal de l'inflammation sont à l'origine du développement de l'inflammation chronique (Dorward *et al.*, 2012). L'inflammation chronique est également provoquée dans le cas de certaines maladies auto-immunes, et ainsi caractérisée par une longue durée (Anzai *et al.*, 2004).

I.3.3 Cellules impliquées dans l'inflammation

Les polynucléaires neutrophiles (PNNs), représentent 50 à 70% des leucocytes circulants dans le sang (Botting et Botting, 2000). Ils constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les agents infectieux et les substances étrangères (Stevens, 2010). Les fonctions des différents leucocytes impliqués dans la réponse inflammatoire sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4. Différents leucocytes intervenant au cours de la réponse inflammatoire (Serhan *et al.*, 2010).

Type cellulaire	Fonction basique dans l'inflammation
Neutrophiles	Migrent vers le tissu extravasculaire, ont des propriétés phagocytaires et sont activés par des chimio-attracteurs dans le site de l'agression.
Mastocytes	Cellules phagocytaires, résidentes dans les tissus de connexions et dans les muqueuses. Libèrent de médiateurs inflammatoires (essentiellement anaphylactiques).
Basophiles	Migrent vers le tissu extravasculaire et ont des propriétés phagocytaires. Interviennent dans les réactions allergiques.
Eosinophiles	Migrent vers le tissu extravasculaire où ils peuvent survivre plusieurs semaines. Ils ont des propriétés phagocytaires et interviennent dans les infections parasitaires.
Plaquettes	Source initiales de médiateurs inflammatoires et interviennent aussi dans la cascade de coagulation.
Monocytes	Se différencient en macrophages tissulaires, dans le foie, les poumons... où ils peuvent y survivre pendant des années. Ce sont de puissants phagocytes, ils sont impliqués dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et B et dans la libération des médiateurs inflammatoires.

Les cellules de l'endothélium des vaisseaux de petit et moyen calibre jouent un rôle important au cours de l'inflammation. Les cellules endothéliales sont capables de participer aux phénomènes de réparation post-inflammatoire par la production de protéines matricielles et de différentes protéases (Aggarwal et Shishodia, 2006 ; Davoine et Lacy, 2014).

Les fibroblastes de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif produisent au cours de la réaction inflammatoire des enzymes de destruction de la matrice : collagénases, gélatinase... etc.

Ils participent aussi aux phénomènes de cicatrisation par la production de différents constituants de la matrice : collagènes, protéoglycanes, fibronectine, élastine (Botting et Botting, 2000).

I.3.4 Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire provoque la libération de divers médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs affectent le développement et la résolution de l'inflammation en agissant sur les différentes cellules impliquées dans la réaction inflammatoire (Rankin, 2004). Le tableau 5 résume l'origine et les effets des plus importants médiateurs de l'inflammation.

Tableau 5. Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs impliqués dans le développement de la réaction inflammatoire (Rankin, 2004 ; Male, 2005 ; Davoine et Lacy, 2014).

Médiateurs	Origines	Effets
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine	Mastocytes et plaquettes	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteurs d'activation plaquettaire (PAF)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales	Vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule l'agrégation des plaquettes, induit la production des ROS et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages.
Prostaglandine	Essentiellement par les leucocytes	Vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.
Cytokines	Macrophages et les lymphocytes	Elles agissent sur des récepteurs membranaires, elles peuvent être pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, ou le TNF α) ou encore anti-inflammatoires (IL-10). Intervient dans la réparation tissulaire.

I.3.5 Anti-inflammatoires

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèses du type anti-inflammatoire non stéroïdien ou stéroïdien (corticoïdes), ce sont des

médicaments largement utilisés mais dont les effets secondaires sont parfois graves, en particulier la toxicité sur le système rénal et digestif (irritations digestives pouvant aller jusqu'à l'ulcération gastrique) (Das, 2011).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (COX) (Ortega *et al.*, 2014). Les AINS traditionnels inhibent les deux enzymes capables de synthétiser des prostaglandines : la COX-1 et la COX-2. Les prostaglandines produites par la COX-1 jouent surtout un rôle physiologique (en particulier la protection gastrique), alors que celles produites par la COX-2 sont surtout produites dans des conditions inflammatoires (Vonkeman *et al.*, 2008).

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes se sont des dérivés du cortisol. Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'arthrite rhumatoïde et les maladies auto-immune (Kessel *et al.*, 2014). L'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables, le risque d'apparition de ces effets s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement. Conduisant à des troubles aigus tels que l'hypertension artérielle et l'ulcères gastro-duodénaux (Henzen, 2003 ; Chung, 2014).

Les effets anti-inflammatoires des polyphénols, qui peuvent être exercées au niveau moléculaire, sont dépendants de la structure spécifique des composés polyphénoliques. Les fonctions de macrophage, y compris la production de cytokines, peut également être affectée par certains flavonoïdes par la modulation de la cyclo-oxygénase inductible (COX-2) et l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS). Plusieurs études expérimentales ont rapporté les effets immunomodulateur des composés polyphénoliques sur l'immunité humorale et cellulaire (Neyestani, 2008 ; Madhuri *et al.*, 2008).

I.4 Antioxydants

La production des RLs est régulée par notre organisme qui a développé des moyens de défense antioxydant de protection contre les effets potentiellement destructeurs des RLs. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Rahal *et al.*, 2014). Un antioxydant idéal devrait être aisément absorbé et éteindre des RLs, et chélate les métaux aux niveaux physiologique appropriés. Quelques antioxydants peuvent agir l'un sur l'autre avec d'autres antioxydants régénérant leurs propriétés originales ; ce mécanisme désigné souvent sous le nom du « réseau antioxydant » (Qusti *et al.*, 2010).

I.4.1 Antioxydants enzymatiques

La Superoxyde dismutase (SOD) réagit contre les produits toxiques de métabolisme cellulaire, et catalyse la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (**Equation 6**) (Papa *et al.*, 2014). Cette enzyme associée à des cofacteurs métallique : ions de cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD) c'est une forme cytosolique et nucléaire, manganèse (Mn-SOD) c'est une forme mitochondriale et une forme extracellulaire (EC-SOD) (Peng *et al.*, 2014).

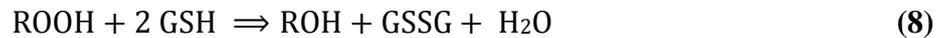


La Catalase (CAT) est une enzyme qui catalyse la transformation d' H_2O_2 en H_2O et oxygène moléculaire (**Equation 7**) (Bonfont-Rousselot et Collin, 2010), et se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules (Tokarz *et al.*, 2014).



La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation d' H_2O_2 en H_2O et O_2 et la réduction de divers hydroperoxydes lipidiques. Lors de cette réaction (**Equation 8**), deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont

oxydées en glutathion disulfure (GSSG) (Jacquot, 2013). Le GSSG ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) utilisant le NADPH comme donneur d'électron (**Equation 9**) (Foyer *et al.*, 2008 ; Lonn *et al.*, 2012). Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries (Sorg, 2004).



I.4.2 Antioxydants non enzymatiques

La vitamine C (Vit C) empêche l'oxydation des lipoprotéine de basse densité (LDL) produites par divers systèmes générateurs des ROS (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase) (Limbach et Guillard, 2007). La Vit C est hydrosoluble et localisé dans le cytosol et le fluide extracellulaire, elle capte directement l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et l' OH^{\cdot} (Comhair et Erzurum, 2002 ; Peng *et al.*, 2014).

Les quatre isomères de tocophérol, α , β , γ et δ , ont une activité antioxydante variable (Limbach et Guillard, 2007). Mais la forme la plus active c'est α , elle est liposoluble et se fixe à la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxyde (LOO^{\cdot}). Elle devient à son tour un radical moins actif que le LOO^{\cdot} et pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Evans, 2000).

Les caroténoïdes, ce sont des pigments liposolubles jaunes, orangée à rouge, synthétisés par les plantes et les microorganismes. Les caroténoïdes sont capables d'inactiver l' $^1\text{O}_2$ et les RLs en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Tanumihardjo, 2013).

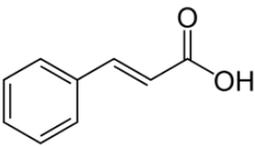
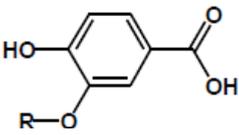
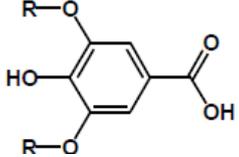
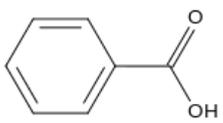
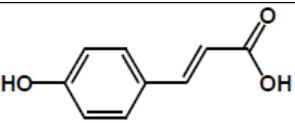
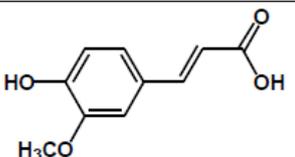
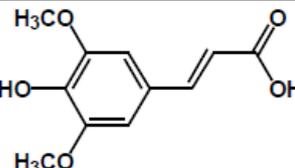
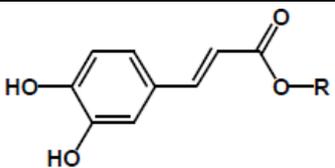
Les polyphénols sont des métabolites secondaires ont des propriétés antioxydantes, et en particulier la classe des flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des RLs, par chélation de métaux de transition comme le fer ou par inhibition de l'activité de la XO (Li *et al.*, 2014).

I.5 Polyphénols

I.5.1 Acide phénolique

Les acides phénoliques se trouvent dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová *et al.*, 2003). Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques non-flavonoïdes qui peuvent être divisés en deux classes principaux, qui sont des dérivés d'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique (Tableau 6).

Tableau 6. Structures et classification de quelques acides phénoliques (Tsao, 2010).

Classe	Structure	Acide phénolique
 Acide cinnamique		Acide vanillique (R = OCH ₃) Acide Protocatechique (R=H)
		Acide gallique (R = H) Acide syringique (R = OCH ₃)
 Acide benzoïque		Acide <i>p</i> -coumarique
		Acide férulique
		Acide sinapique
		Acide caféique (R = H) Acide chlorogénique (R = 5-quinonyl)

Alors que les fruits et légumes contiennent beaucoup d'acides phénoliques libres, dans les céréales et les graines les acides phénoliques sont souvent dans la forme liée. Ces acides phénoliques ne peuvent être libérés ou hydrolysés que par hydrolyse acide ou alcaline, ou par

des enzymes. Ils ont des effets antioxydant, antimicrobien, anti-inflammatoire et chélateurs (Mandale et al., 2010).

I.5.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyrone (anneaux A et C). Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux et sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Egert et Rimbach, 2011). La structure de base de ces molécules est caractérisée par 15 atomes de carbone arrangés en trois cycles. A l'exception des chalcones (ouverture du cycle B), ces métabolites secondaires sont toujours tricycliques : deux cycles benzoïques A et B et un hétérocycle C (Shankari *et al.*, 2014).

La structure de base de ces molécules est caractérisée par 15 atomes de carbone arrangés en trois cycles (Figure 6). A l'exception des chalcones, ces métabolites secondaires sont toujours tricycliques : deux cycles benzoïques A et B se lie à l'hétérocycle (C) en position 2. Lorsque la liaison s'effectue en position 3', les composés résultants sont appelés iso-flavonoïdes, ou bien en position 4' se sont les chalcones. L'ouverture du cycle oxygéné B caractérise les chalcones (Tsao, 2010).

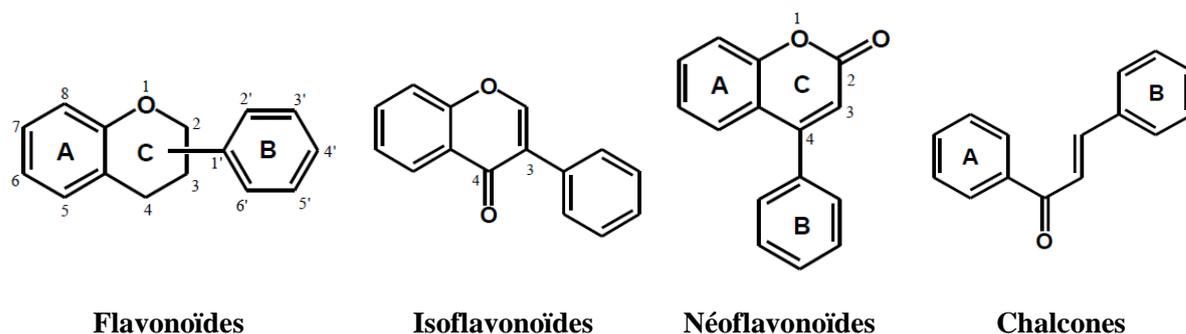
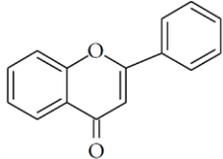
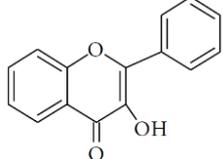
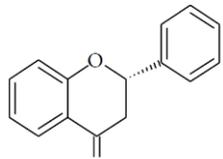
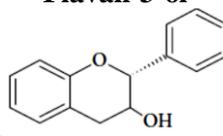
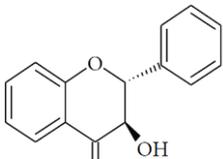
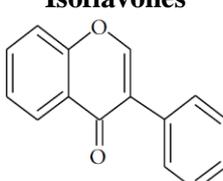


Figure 6. Squelettes de base de tous les flavonoïdes (Tsao, 2010).

Les flavonoïdes sont subdivisés en plusieurs sous classes différentes dont 6 sont les plus répandues et les mieux caractérisés (Tableau 7). Les flavonoïdes se distinguent entre eux par les substituants hydroxyles, méthoxyles ou glucidiques sur leurs cycles.

Tableau 7. Structures des flavonoïdes (Kumar et Paney, 2013).

Formule chimique	Nom	Substitution									
		3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	
	Apigénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
	Chrysrine	H	OH	H	OH	H	H	H	H	H	
	Lutéoline	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Quercétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Myricétine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	
	Kaempférol	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
	Rutine	sucre	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Naringénine	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
	Hespérétine	H	OH	H	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	
	Catéchine	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Epicatéchine	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	OH	
	Taxifoline	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
	Génistéine	/	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	
	Daidzéine	/	H	H	OH	H	H	H	OH	H	

1.5.3 Tannins

Ce sont des polyphénols polaires d'origine végétale, existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines (Redondo *et al.*, 2014). Ce sont un des polymères phénoliques, ils forment des complexes avec les protéines et aussi les polysaccharides par des forces non spécifiques, les liaisons hydrogènes et hydrophobes (Okuda et Ito, 2011). Ils

peuvent avoir plusieurs activités biologiques dont l'activité antioxydante, antifongique, antitumorale et antivirale (Lamy *et al.*, 2014).

I.6 Plantes médicinales utilisées

I.6.1 *Sedum sediforme*

I.6.1.1 Description botanique

Sedum sediforme est une plante vivace, ligneuse à la base, Elle pousse en tapis et peuvent atteindre une hauteur de 10 à 20 centimètres (Figure 7). C'est une plante de croissance relativement lente, et une durée de vie relativement courte. C'est une plante à feuilles persistantes, vertes fougère, simples et en rosettes. Elles sont lancéolées et sessiles avec un bord entier. La floraison de *Sedum sediforme* a lieu de mai à juillet. Les plantes présentent des fleurs à cinq pétales de couleur jaune, cette plante vivace produise des follicules (Poliese, 2007).



Figure 7. Aspect morphologique de *Sedum sediforme*.

I.6.1.2 Répartition géographique et classification

La plante *Sedum sediforme* nommé localement lebid ou âkerban, autrement appelée l'orpin de nice est une plante classique appartenant au genre *Sedum* qui contient environ de 395 à 759 espèces et fait partie de la famille des Crassulaceae (Tableau 6) (Quezel et Santa, 1963). *Sedum sediforme* provient du Liban, la Turquie, la France, de la péninsule ibérique, la péninsule balkanique et la Chypre. Les plantes vivaces poussent sur des sols frais à humides et préfèrent

une exposition ensoleillée. Le substrat doit être limono-graveleux. Elles supportent des températures jusqu'à -12°C (Hart, 2003).

Tableau 8. Classification botanique de *Sedum sediforme* (Jauzein, 1995).

Classification	Répartition systématique
Règne	Plantae
Classe	Equisetopsida
Sous classe	Magnoliidae
Ordre	Saxifragales
Famille	Crassulaceae
Genre	Sedum
Espèce	<i>Sedum sediforme</i> (Jacq.) Pau.

I.6.1.3 Utilisation traditionnelle

Sedum sediforme est récoltée en fleurs et séchée pour une utilisation comme ; dépurative, diurétique et sudorifique, de plus les différentes parties de la plante ont été appliquées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de quelques inflammations, dans les pommades à usage externe pour le traitement des plaies et des brûlures (Ennabili *et al.*, 2000).

I.6.2 *Lycium arabicum*

I.6.2.1 Description botanique

Lycium arabicum nommé localement ghardeq appartient à le genre *Lycium*, qui comprend environ 90 espèces, c'est un arbuste érigé a étalé, fortement ramifié, parfois grimpant, atteignant 2.5 à 3 m de haut, tres épineux à épines axillaire de 5 à 15 mm de long (Figure 8). Tiges légèrement zigzagantes, vigoureuses, glabres, rameaux s'incurvant, blanc grisâtre. Feuilles en fascicules de 2 à 6, simple et entières. Fleurs bisexuées, blanc crème à mauves pâle veiné de violet. Fruits : baie globuleuse ou légèrement obovoïdes de 3 à 5 mm de diamètre, rouge, contenant de nombreuses graines. Graines à contour ovale, de 2 × 1.5 mm, aplaties, brunes (Schmelzer *et al.*, 2008).



Figure 8. Aspect morphologique de *Lycium arabicum*.

I.6.2.2 Répartition géographique et classification

L'aire de répartition de *Lycium arabicum* (Tableau 7) va du Soudan et de l'Ethiopie jusqu'au Malawi, à la Zambie, au Botswana et au Zimbabwe, en passant par le Kenya et la Tanzanie. Il est également présent en Afrique du Sud, en Méditerranée, au Proch-Orient et dans l'ouest de l'Inde (Gongalves, 2005).

Tableau 9. Classification botanique de *Lycium arabicum* (Quezel et Santa, 1963).

Classification	Répartition systématique
Règne	Plantea
Classe	Dicotylédone
Sous classe	Asterideas
Ordre	Polomoniale
Famille	Solanaceae
Genre	<i>Lycium</i>
Espèce	<i>Lycium arabicum</i> Roem. & Schult.

I.6.2.3 Utilisation traditionnelle

La décoction de la partie aérienne de *Lycium arabicum* sert à traiter les lésions buccales, elle est utilisée pour traiter la toux. La décoction en usage externe sert à soulager le mal de dos et à laver les patients atteints de polio. L'infusion de feuilles se boit pour déclencher des vomissements chez les personnes infectées par le ténia et aussi pour traiter la constipation et les maux d'estomac (Schmelzer, 2008).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel biologique

Plantes : la récolte du *Sedum sediforme* (SS) et *Lycium arabicum* (LA) a été effectuée au mois de Mai 2012 (la région de N'Gaous, Wilaya de Batna), et ont été identifiées par le Pr. Oudjih Bachir (Département d'agronomie, université de Batna). Les vouchers ont été préparés et stockés à l'herbier de département d'agronomie, université de Batna (IAB/290 et 291, respectivement).

Animaux : l'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris mâles, Swiss albinos dont le poids varie entre 25 et 30 g, procurés aux prés de l'institut Pasteur d'Alger. Les animaux ont été hébergés dans des cages de polypropylène munies d'un porte étiquette où est mentionné le nom du lot, le traitement subi et les dates des expérimentations. Ces souris sont utilisées après une période d'adaptation de 7 jours, lumière 12h/12h, ils ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard fourni par l'office national des aliments de bétails (ONAB) de Bejaia. L'autorisation éthique d'utilisation des souris a été récupérée auprès de faculté des sciences exacte et science de la nature et de la vie (307/V.D.P.G).

Lait : le lait bovin utilisé pour la purification de la XO a été obtenu d'une ferme des environs de Marouana, Batna.

II.1.2 Réactifs chimiques et matériel instrumental

Tous les produits utilisés proviennent de Sigma, Fluka et prolabo. Les kits de dosage (Spireact, Spain). Parmi l'appareillage utilisé : rotavapeur (BÜCHI), centrifugeuse 3-K30 (Sigma), 1601 Shimadzu spectrophotomètre et le spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (Techcomp). Lecteur de microplaque (BioTek).

II.2 Méthodes

II.2.1 Extraction et analyses des fractions

II.2.1.1 Extraction des flavonoïdes

Les parties aériennes des deux plantes (SS et LA) ont été bien nettoyées et séchées à température ambiante et à l'ombre pendant 10 et 20 jours, respectivement, ensuite broyées à l'aide d'un mortier. L'extraction des polyphénols a été effectuée selon la méthode décrite par Markham (1982), en utilisant des solvants organiques à polarité croissante (Figure 9). Le broyat (100 g) a été additionné au 1 litre de méthanol / eau distillée (85/15), le mélange a été soumis à une agitation pendant une nuit à 4 °C, puis laissé reposer quelques heures. Le mélange est par la suite filtré, le filtrat a été conservé à 4 °C alors que le précipité a été soumis à une deuxième extraction en suivant le même protocole avec un litre de méthanol/eau (50/50). Le deuxième filtrat a été mélangé avec le premier. Le mélange a été filtré pour la dernière fois sur papier filtre et soumis à une évaporation rotative à 40 °C pour éliminer le méthanol du filtrat. L'extrait obtenu est considéré comme étant l'extrait brut (EBr) pour chaque plante. Un volume de 50 ml de l'EBr qui a été séché jusqu'à l'élimination de l'eau puis conservé à - 4 °C jusqu'à son utilisation.

L'autre fraction d'EBr a été initialement mélangée avec l'hexane, le mélange a été laissé décanter, et la phase organique supérieure a été récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant (hexane) devienne transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (EHx). La phase aqueuse résiduelle est soumise à une autre extraction par le chloroforme, et enfin par l'acétate d'éthyle en suivant les mêmes étapes que la première extraction par l'hexane. Cinq fractions sont obtenues; l'EBr, l'EHx, la fraction du chloroforme (ECh), la fraction de l'acétate d'éthyle (EAe) et la fraction aqueuse (EAq) résiduelle. Les cinq fractions ont été séchées et conservées à -4 °C jusqu'à son utilisation.

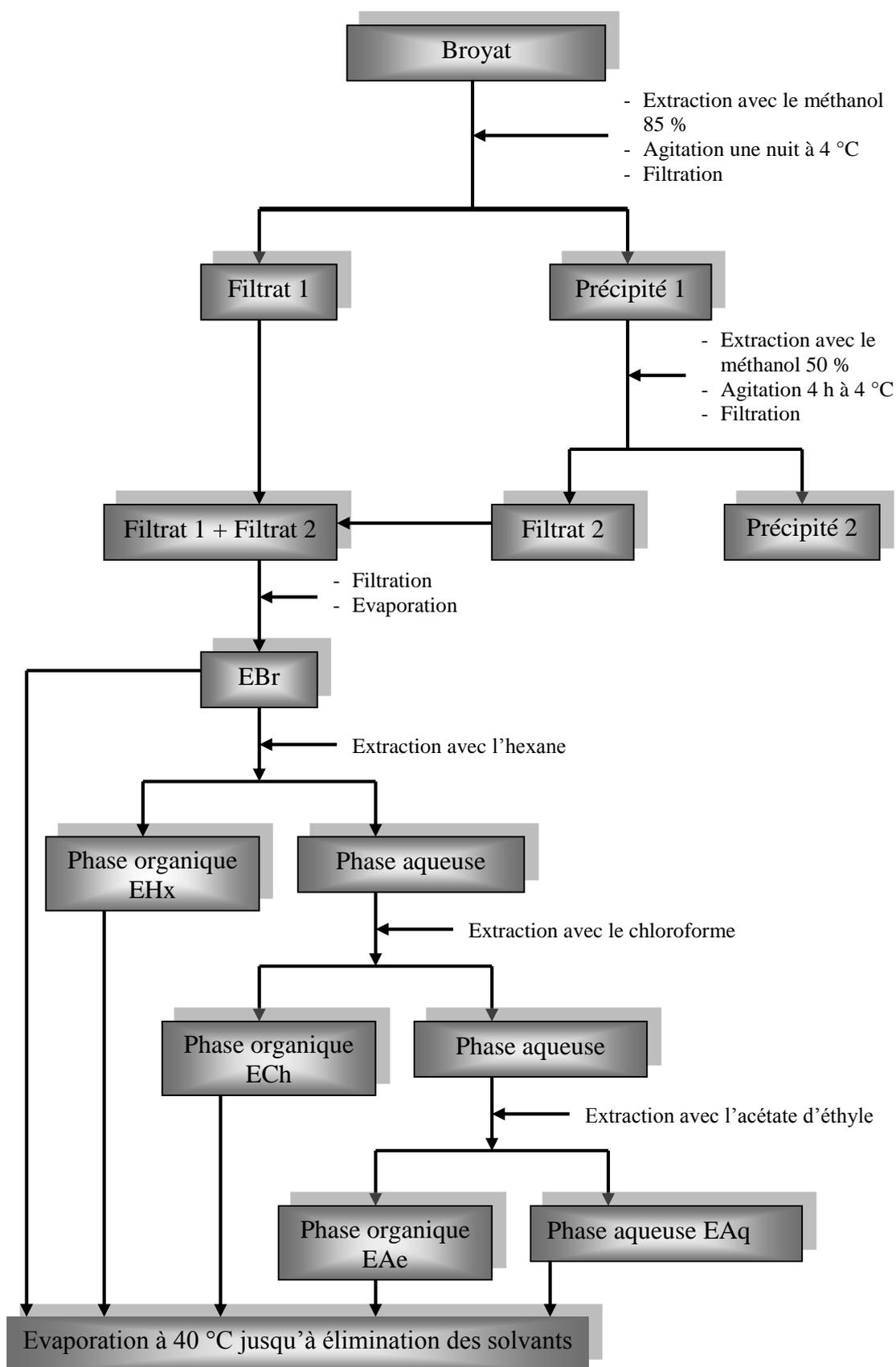


Figure 9. Etapes de l'extraction des polyphénols des broyats des deux plantes par la méthode de Markham (1982).

II.2.1.2 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques des différents extraits a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Brièvement, 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (1/10) a été ajouté à 200 µl d'extrait ou standard avec des dilutions convenables. Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) ont été additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 765 nm. La teneur en polyphénols totaux a été estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (Figure 10) établie avec l'acide gallique (0-150 µg/ml) et exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EqAG/mg d'extrait).

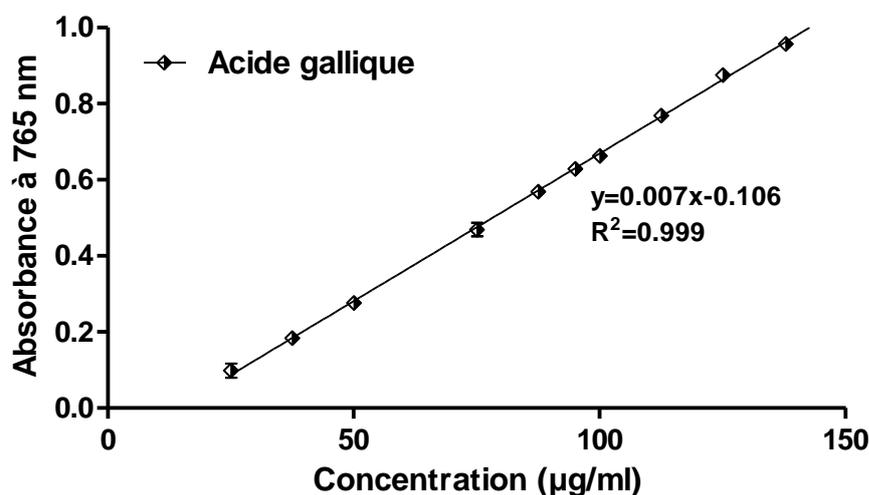


Figure 10. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3).

II.2.1.3 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes des extraits de SS et LA a été effectué selon la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Bahorun *et al.*, 1996) ; 1 V de chaque extrait (préparé dans le méthanol) avec des dilutions convenables, a été ajouté à 1 V de la solution d' AlCl_3 (2 % dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes a été déduite à partir des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine et la rutine (0-40 µg/ml) (Figure 11) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine ou la rutine par milligramme d'extrait (µg EQ ou R/mg).

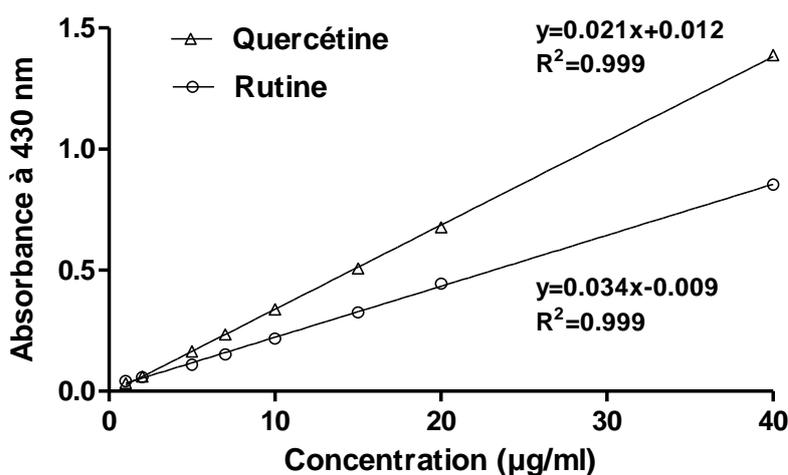


Figure 11. Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine. Chaque point des deux courbes représente la moyenne \pm SD (n = 3).

II.2.2 Purification de la xanthine oxydase

II.2.2.1 Extraction et purification de la XO

La purification de la xanthine oxydase du lait bovin (XOLB) a été réalisée selon la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée par Baghiani *et al.* (2003). Le lait bovin a été centrifugé à 5000 rpm pendant 20 min, la crème flottante a été dissoute dans un volume double de phosphate de potassium (K_2HPO_4 , 0.2 M) contenant 1 mM d'EDTA et 10 mM de DTT. Le mélange a été soumis à une agitation douce pendant 2 heures puis centrifugée à 6000 rpm pendant 20 min. Le surnageant récupéré a été filtré sur la laine de verre et additionné progressivement de 15 % (V/V) du butanol froid ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) et de sulfate d'ammonium 15 % (P/V), sous agitation douce pendant 1 heure, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 20 min.

Après filtration du surnageant sur laine de verre, la XO a été précipitée par ajout progressif de sulfate d'ammonium 20 % (P/V), sous agitation douce pendant 1 heure et 30 min, puis centrifugation à 11000 rpm pendant 30 min. Le précipité a été récupéré attentivement et resuspendu dans 15 à 20 ml 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 insolubles, le dialysat a été centrifugé à 18000 rpm pendant 60 min. Après filtration à travers un filtre de 45 µm de porosité, le produit final constitue l'extrait brut de la XO.

L'extrait brut obtenu a été déposé sur une colonne chromatographique contenant un gel d'héparine-agarose équilibré et lavée par le tampon héparine. La colonne a été ensuite lavée par le même tampon renfermant 0.02 M de NaCl. La XO a été récupérée de la colonne par le tampon héparine contenant 0.2 M de NaCl, et dialysée contre un tampon Bicine (50 mM, pH 8.3), pendant une nuit. Enfin, l'enzyme a été répartie en aliquotes de 0.5 ml et conservée à -20 °C jusqu'à son utilisation. La colonne a été régénérée par lavage avec une solution de NaCl 1 M puis avec le tampon héparine pour une nouvelle utilisation (toutes les étapes ont été effectuées à 4 °C).

II.2.2.2 Contrôle de pureté de la XO

La pureté de l'enzyme purifiée a été estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) et par le rapport protéine / flavine PFR (Protein to Flavin Ratio), correspondant à la lecture de l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm ($A_{280\text{nm}} / A_{450\text{nm}}$). Une valeur 5 ou proche de 5 indique une grande pureté (Bray, 1975).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970) ; le gel de séparation (10 % d'acrylamide et 2.74 % de bis-acrylamide) a été préparé dans un tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1 % de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.042 % de N,N,N',N' Tetramethylene diamine (TEMED) (V/V) et 0.1 % de persulfate d'ammonium (P/V). Le gel de concentration a été préparé dans le même tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1% de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.1% de TEMED (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Les échantillons (XO, environ 1 mg / ml) ont été préparés dans une solution échantillon constituée d'un tampon Tris-HCl (62.5 mM,

pH 6.8), 2 % de SDS (P/V), 20 % de glycérol (V/V) et 0.005 % de bleu de bromophénol (P/V), ainsi que les standards des poids moléculaires (1 mg / ml) de Sigma ont été utilisés. Ensuite, ils ont été chauffés à 100 °C pendant 5 minutes. Les standards des poids moléculaires utilisés sont de 14400 Da à 200000 Da.

La migration électrophorétique a été réalisée dans un tampon Tris-HCl (25 mM) contenant 0.192 M de glycine et 0.1 % de SDS (P/V) par application d'un courant électrique de 10 mA jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel de séparation, l'ampérage a été ensuite augmenté jusqu'à 37- 45 mA. Les protéines séparées ont été colorées pendant au moins une heure dans une solution de bleu de Coomassie 0.2 % (P/V) contenant 10 % d'acide acétique (V/V), 45 % de méthanol (V/V) dans de l'eau distillée. Le gel a été ensuite décoloré par une solution d'acide acétique 5-10 % (V/V).

II.2.2.3 Estimation de l'activité enzymatique de la XO

L'activité totale de la XOR a été estimée en suivant l'augmentation de la production de l'acide urique à 295 nm, en présence de 100 µM de xanthine comme substrat de l'enzyme et 500 µM de NAD⁺ comme accepteur d'électrons dissous dans un tampon Na-Bicine à pH 8.3 (Avis *et al.*, 1956). L'activité de la forme oxydase a été mesurée par la même méthode mais en absence de NAD⁺. L'activité spécifique a été exprimé en nombre de nanomole d'acide urique produit dans une minute par milligramme de l'enzyme (nmol / min / mg de protéine).

II.2.3 Test d'effet des extraits sur la XO

II.2.3.1 Test d'inhibition de la XO *in vitro*

L'effet inhibiteur des extraits de SS et LA sur l'activité de la XO a été étudié spectrophotométriquement en suivant la production de l'acide urique à 295 nm ($\epsilon_{\text{acide urique}} = 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) par l'oxydation de 100 µM de xanthine dissous dans un tampon phosphate de sodium (PBS) saturé en air (50 mM, pH 7.4, contenant 0.1 mM d'EDTA), en présence de plusieurs

concentrations de chaque extrait (Baghiani *et al.*, 2011). Les solutions mères des différents extraits ont été préparées dans le méthanol (5% dans le volume final) et le PBS. L'allopurinol (l'inhibiteur spécifique de la XO) a été utilisé comme control positif.

Après l'ajout de la XO, la réaction a été suivie pendant 60 secondes et l'activité inhibitrice des extraits été exprimée en pourcentage d'inhibition (% I) calculé ainsi :

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

A_C : Activité de l'enzyme en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

A_E : Activité de l'enzyme en présence de l'inhibiteur

L' IC_{50} de chaque extrait (concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique) a été calculée.

II.2.3.2 Détermination du type d'inhibition

L'activité enzymatique a été mesurée en suivant la production de l'acide urique à 295 nm ($\epsilon_{\text{acide urique}} = 9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en présence de concentrations croissantes du substrat et un inhibiteur, la XO utilisé présente 0.02 UI/mL. Les paramètres cinétiques ont été déterminés par la représentation de Lineweaver-Burk grâce au logiciel « SIGMAPLOT 12.5 » auquel le module « Enzyme Kinetics 1.1 » a été ajouté. Les tests d'inhibition ont été réalisés en présence des concentrations croissantes de la xanthine (5 à 120 μM) et d'une concentration pour chaque inhibiteur ($\approx IC_{50}$). Le volume réactionnel final est de 500 μl dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7.4. Les vitesses initiales de la réaction en μmol d'acide urique/min ont été calculées et le type d'inhibition a été déterminé. La valeur de l'activité enzymatique est la moyenne de trois à quatre mesures \pm SD. L'allopurinol, quercétine et catéchine ont été utilisés comme contrôle positifs (Berboucha *et al.*, 2011).

II.2.3.3 Test d'inhibition de la XO *in vivo* (effet hypouricémique)

La méthode de Mo *et al.*, 2007 a été utilisée avec une légère modification. Des souris mâles adultes de poids variant entre 25 et 30 g ont été répartis selon l'homogénéité de leurs poids en 9

lots expérimentaux de 8 à 9 animaux pour chacun. Le 1^{er} groupe (Témoin) : groupe normal traité par le véhicule (l'eau physiologique). Les autres groupes ont été soumis à l'induction de l'hyperuricémie faite par l'injection intrapéritonéale d'oxonate de potassium (OP) avec une dose 250 mg/Kg de poids de souris (1^{ère} injection). Après une heure, les tests (les extraits des deux plants et l'allopurinol) ont été administrés par l'injection intrapéritonéale (2^{ème} injection), selon le tableau suivant :

Tableau 10. Injections des groupes traités.

Groupes	1 ^{er} injection	2 ^{ème} injection	
		Test	Dose (mg/Kg)
Témoin	Eau physiologique	Eau physiologique	/
OP	OP	Eau physiologique	/
OP+Allopurinol	OP	Allopurinol	10
OP+EBr-SS	OP	EBr-SS	50
OP+ECh-SS	OP	ECh-SS	50
OP+EAe-SS	OP	EAe-SS	50
OP+EAq-SS	OP	EAq-SS	50
OP+EBr-LA	OP	EBr-LA	50
OP+ECh-LA	OP	ECh-LA	50
OP+EAe-LA	OP	EAe-LA	50
OP+EAq-LA	OP	EAq-LA	50

Concentration d'OP injecté est 250 mg/Kg

Le prélèvement sanguin a été réalisé après 1 heure de traitement des souris anesthésiées et le sang a été recueilli dans des tubes héparinés, puis centrifugés à 1500 rpm pendant 5 min à 4 °C. Le sérum obtenu a été conservé à -20 °C jusqu'à son usage.

Les foies de chaque groupe ont été récupérés, rincés avec un tampon saliné (NaCl : 0.9 %) et divisé en deux morceaux ; le premier a été homogénéisé (sonication) dans un tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7.8) et centrifugé à 10000 rpm pendant 15 min à 4 °C, le surnageant a été utilisé pour le dosage d'acide urique. Le deuxième morceau a été homogénéisé

(sonication) dans un tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7.8) contient 1 mM EDTA et 1 mM PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle), l'homogénat a été centrifugé à 10000 rpm pendant 15 min à 4 °C et le surnageant a été utilisé pour le dosage d'activité de la XO (Shi-Fu *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2011).

A. Dosage de l'acide urique

La concentration de l'acide urique du sérum et du surnageant du foie a été déterminée par une méthode colorimétrique. Ces dosages ont été réalisés au niveau du laboratoire central de l'hôpital universitaire de sétif (CHU) en utilisant un automate (Bechman, Germany) et des kits achetés auprès de *Spinreact* (Spain).

B. Dosage de l'activité de la XO

Le protocole du dosage d'activité de la XO dans les liquides biologiques (sérum et surnageant de foie), a été fait selon Hashimoto (1974), avec modifications : 1 V de sérum ou surnageant de foie ont été incubés pendant 20 min à 30 °C dans un milieu contenant du tampon phosphate (pH 7.5, 50 mM) ; 1 V du substrat (120 mM) et 1 V d'OP (300 µM). La réaction a été stoppée par l'addition de 1 V d'acide trichloracétique (TCA à 20 %) et le mélange a été centrifugé à 15000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Résultant un surnageant limpide, l'absorption à 292 nm a été mesurée sur le blanc, qui a été exécuté en parallèle avec le mélange de réaction sans xanthine. L'activité de la XO a été calculée sur la base du coefficient d'extinction molaire (ϵ) d'acide urique ($7600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) déterminé au même pH du mélange d'incubation de l'échantillon (TCA). Une unité d'activité de XO a été définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la formation de 1 µmol de l'acide urique de la xanthine par minute à 30 °C.

C. Evaluation de la fonction rénale

Les sérum et les surnageant des foies ont été utilisés aussi pour l'évaluation de la fonction rénale, l'urée et la créatinine a été déterminée par une méthode colorimétrique, en utilisant un

automate (Bechman) et des kits achetés auprès de *Spinreact*. Ces dosages ont été réalisés au niveau du laboratoire central de l'hôpital universitaire de Sétif (CHU).

II.2.4 Tests d'activité antioxydante *in vitro*

II.2.4.1 Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)

L'activité anti-radicalaire des différents extraits de SS et LA a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode permet de suivre spectrophotométriquement la cinétique de décoloration de radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette à 517 nm (Boumarfegue *et al.*, 2012). Pour cela, 50 µl de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 1.25 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées. Les résultats obtenus pour chaque extrait testé ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition (% I) du radical DPPH par les extraits a été calculé comme suit :

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

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

A_E : absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % du DPPH (IC_{50}) de chaque extrait a été par la suite calculée et exprimée en µg/ml et comparée avec celle du BHT.

II.2.4.2 Test d'effet scavenger du superoxyde produit par la XO (Cytochrome c)

L'effet scavenger des extraits sur l' $O_2^{\cdot-}$ produit par la XO a été déterminé en suivant la réduction du cytochrome c à 550 nm (Boumarfegue *et al.*, 2009). Le milieu réactionnel a été composé d'un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7.4, 0.1 mM d'EDTA) bien saturé en oxygène aérien, contenant 100 µM de xanthine et 25 µM de cytochrome c et en présence de plusieurs concentrations de chacun des extraits de SS et LA, préparées dans le méthanol (5 %)

et le tampon phosphate de sodium. La réaction a été suivie pendant 60 secondes après ajout de la XO. La concentration d'O₂^{•-} générée a été calculée en utilisant ($\epsilon_{550} = 21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). L'activité inhibitrice de la réduction du cytochrome c par les extraits a été exprimée en pourcentage d'inhibition (% I) calculé ainsi :

$$\% \text{ Scavenger superoxyde} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C : Activité de réduction en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

A_E : Activité de réduction en présence de l'inhibiteur

L'IC₅₀ de chaque extrait (concentration inhibitrice de la réduction de 50 % du cytochrome c) a été par la suite calculée.

II.2.4.3 Test d'effet scavenger du superoxyde produit par NADH-PMS (NBT)

L'activité anti-radicalaire a été déterminée selon la méthode d'Ani et leurs collaborateurs (2006). L'essai basé sur la production d'O₂^{•-} à partir d'O₂, en utilisant comme réducteur du NADH, et le PMS (phenazine methosulphate) en tant que catalyseur, en présence d'un indicateur (NBT ; nitroblue tetrazolium), qui devient bleu lorsqu'il est réduit par l'O₂^{•-}. Le changement de couleur peut être surveillé par spectrophotométrie à 560 nm. Brièvement, le mélange réactionnel est constitué de 300 µl de tampon PBS (20 mM, pH 7.8), 50 µl β-NADH (3 mM), 50 µl de concentrations variables de chaque extrait, 50 µl de NBT (1 mM) et 50 µl PMS (0.3 mM). La réaction a été conduite à la température ambiante pendant 2 min et initiée par l'addition de PMS pendant 3 min. l'activité scavenger de superoxyde des extraits a été déterminée en comparant le degré de réduction du NBT avec des contrôles. L'évaluation de cette activité a été basée sur l'IC₅₀. Le pourcentage d'inhibition de la production d'anion superoxyde (Activité scavenger) a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Activité scavenger} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_E : absorbance en présence de l'extrait

A_C : absorbance en absence de l'extrait

II.2.4.4 Test de blanchissement de β -carotène / acide linoléique

La capacité des extraits de SS et LA d'inhiber la peroxydation lipidique a été étudiée par le test au β -carotène / acide linoléique (Barriere *et al.*, 2001 ; Aslan *et al.*, 2006). Une solution de β -carotène / acide linoléique a été préparée comme suit : premièrement, 0.5 mg de β -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40 °C dans le rotavapor. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutées au mélange avec agitation vigoureuse. Le mélange réactionnel a été par la suite aliquoté (2.5 ml) dans des tubes à essai, et 350 μ l de chacun des extraits préparés (2 mg/ml, dans l'eau distillée ou dans le méthanol) ont été ajoutés. La même procédure a été répétée avec l'hydroxytoluène butylé (BHT ; 2 mg/ml) comme un contrôle positif et avec le méthanol et l'eau distillée comme des contrôles négatifs. Les absorbances ont été lues à 490 nm, après 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h et 48 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité antioxydante (% AA) a été calculé ainsi :

$$\% \text{ AA} = (A_E / A_C) \times 100$$

A_E : absorbance en présence de l'extrait ou BHT

A_C : absorbance en absence de l'extrait ou BHT

Les valeurs de % AA prises pour la comparaison sont ceux calculées à 24 h.

II.2.4.5 Test de chélation des métaux (Ferrozine)

La capacité chélatrice des extraits a été mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après incubation des échantillons, à différents concentrations, avec le fer divalent selon la méthode de Decker et Welch (1990). Les solutions d'échantillons (500 μ l) ont été initialement mélangées avec 100 μ l FeCl₂ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 μ l de méthanol. Après 5 min, 100 μ l de Ferrozine (5 mM dans le méthanol) ont été additionnés au milieu réactionnel, le mélange a été bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la formation de complexe avec une couleur violet (Fe (II)-

Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Par ailleurs, le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception des extraits. L'éthylène diamine tétra acétique (EDTA) a été utilisé comme chélateur de référence à un intervalle de concentration de (0-40 µg/ml). L'activité des échantillons vis-à-vis du fer a été exprimée en pourcentage de chélation selon l'équation :

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

A_E : absorbance en présence de l'extrait

A_C : absorbance en absence de l'extrait

La concentration effective (EC_{50}) qui chélate 50 % de Fe^{2+} a été calculée.

II.2.4.6 Test de pouvoir réducteur (FRAP)

L'essai de FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) a été réalisé selon la méthode décrite initialement par Benzie et Strain (1996) et modifiée par Pulido et ses collaborateurs (2000). Cette méthode mesure le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans un mélange par leur capacité de réduire le tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) à pH acide. Une solution fraîche du réactif FRAP a été préparée par mélange de 2.5 ml de la solution du TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) avec 2.5 ml du $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (20 mM) et 25 ml du tampon acétate (300 mM d'acétate de sodium, pH conduit à 3.6 par l'acide acétique). 900 µl du réactif FRAP, préalablement incubé à 37 °C, ont été mélangés avec 70 µl d'eau bidistillée et 30 µl de l'échantillon (avec dilutions appropriées). L'augmentation de l'absorbance à 593 nm a été ensuite suivie pendant 30 minutes à 37 °C. Une gamme du $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Annexe 1), étalon réducteur, entre 0 et 2000 µM ont été utilisée pour calculer les valeurs de FRAP des extraits et de l'antioxydant standard (Vit C).

Le paramètre EC_1 (concentration équivalente 1) des extraits et standard a été calculée à 4 et 30 minutes. L' EC_1 est défini comme la concentration de l'antioxydant qui donne une réduction du TPTZ équivalente à 1 mM du $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; c'est la concentration de l'antioxydant donnant une augmentation dans l'absorbance à 593 nm équivalente à la valeur théorique de l'absorbance

donnée par une concentration de 1 mM du FeSO₄ déterminée par l'équation de régression correspondante.

Le pouvoir antioxydant total (TAP), des extraits et de standard a été exprimé en micromoles d'équivalents du FeSO₄.7H₂O par mg d'extrait (μmole Eq FeSO₄.7H₂O/mg).

II.2.4.7 Test d'activité anti-hémolytique

La résistance des érythrocytes prétraités par les extraits des plantes à l'attaque radicalaire a été évaluée selon le protocole décrit par Takebayashi *et al.* (2010) avec quelques modifications, en remplaçant le radical AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl) par le *tert*-butyle hydroperoxyde (*t*-BHP) (Dwight et Hendry, 1996). Le sang des souris utilisé dans ce test a été obtenu par décapitation (des souris mâles 25 à 30 g). Le sang a été collecté dans des tube héparinés, puis dilué dans un tampon phosphate (300 mOsm, pH 7.4) pour obtenir un hématocrite de 2 %. L'attaque radicalaire a été induite par l'addition du *t*-BHP à la suspension érythrocytaire préalablement incubée (10 min) avec les extraits (EBr, ECh, EAe, et EAq) des deux plantes, pour chaque extrait quatre concentrations ont été testées : SS (1.32, 2.64, 5.28 et 10.56 μg/ml), LA (10.56, 21.18, 42.37 et 84.74 μg/ml), la Vit C a été utilisé comme standard.

Après trois heures d'incubation avec le *t*-BHP à 37 °C, la cinétique de disparition progressive des hématies a été suivie par la mesure dynamique de la diminution de l'absorbance à 630 nm, la résistance du sang à l'attaque radicalaire a été exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50 % des érythrocytes (*half-hemolysis time* ; HT₅₀). Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne HT₅₀ ± SEM (n = 6).

II.2.5 Test de toxicité aiguë (Détermination de la DL₅₀)

La toxicité aiguë se manifeste rapidement après une prise unique ou à court terme après plusieurs prises rapprochées. La dose létale 50 (DL₅₀) est la dose d'une substance chimique qui, administrée aux souris, provoque la mort de la moitié d'entre eux, plus la DL₅₀ est petite, plus la

substance est toxique (Oduola *et al.*, 2007). L'analyse par la méthode de probits (méthode des moindres carrés, Méthode de Finney), en utilisant le logiciel stat PLUS 5.8.0.0, 2009 (Abu sitta *et al.*, 2009), a été utilisée pour déterminer la DL₅₀ des deux extraits brutes de SS et LA *in vivo*.

Les souris préalablement mis à jeun pendant 24 h sont regroupés par lot de 10. Les doses utilisées d'EBr des deux plantes étudiées sont : 0, 100, 200, 300, 400 mg/Kg pour SS, et 0, 200, 350, 500, 700 mg/Kg pour LA. Les extraits ont été repris dans NaCl 0.9 % et administrés aux souris par voie intrapéritonéale à raison de 100 µl de solution par 30 g de masse corporelle. Le lot témoin ne recevait que du NaCl 9 %. Par la suite, les symptômes possibles sont observés ainsi que le nombre de morts au bout du temps imparti (les premières 15 min, ensuite les 1^{ère} h, 2^{ème} h, 24^{ème} h, 72^{ème} h jusqu'au 14^{ème} jour).

II.2.6 Test d'activité antioxydante *in vivo*

Des souris mâles, Swiss albinos, adultes de poids variant entre 25 et 30 g, ont été répartis selon l'homogénéité de leurs poids en plusieurs lots expérimentaux de 9 à 10 animaux chacun. L'administration de l'extrait se fait par injection intrapéritonéale quotidiennement durant trois semaines (Tableau 11).

Tableau 11. Répartition et doses injectées pour chaque groupe.

Groupe	Solution injecté	Dose (mg/Kg)
T	NaCl (0.9 %)	/
Vit C	Vit C	50
SS-D ₁	EBr-SS	25
SS-D ₂	EBr-SS	50
LA-D ₁	EBr-LA	50
LA-D ₂	EBr-LA	100

Le prélèvement sanguin a été réalisé pour les souris anesthésiées par l'éther diéthylique. Au cours de chaque prélèvement, un aliquote de sang total a été transféré immédiatement vers un autre tube contenant un tampon phosphate (300 mOsm, pH 7.4) afin d'obtenir hématocrite de

2 %. Ce sang a été utilisé pour évaluer la capacité antioxydante totale du sang. La quantité du sang restante a été centrifugée à 1500 g / 5 min / 4 °C. Le plasma obtenu a été aliquoté et conservé à une température de -20 °C jusqu'à son utilisation pour le test du DPPH et FRAP.

II.2.6.1 Test d'activité anti-hémolytique *in vivo*

Le sang obtenu précédemment (hématocrite de 2%) a été soumis à une attaque radicalaire par l'addition du *t*-BHP à la suspension érythrocytaire. La cinétique de disparition progressive des hématies a été suivie à 37 °C par la mesure de la diminution de l'absorbance à 630 nm. La résistance du sang à l'attaque radicalaire a été exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50 % des érythrocytes (HT₅₀). Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne HT₅₀ ± SEM (Takebayashi *et al.*, 2010).

II.2.6.2 Test de capacité antioxydante plasmatique (DPPH *in vivo*)

Dans ce test, 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 plasma a été additionné à la solution méthanolique de DPPH (4 mg / 100 ml de méthanol). Après 30 min d'incubation à l'obscurité suivie d'une centrifugation (2000 rpm / 5 min / 4 °C), l'absorbance à 517 a été mesurée. La capacité antioxydant plasmatique (CAP) a été ensuite calculée.

II.2.6.3 Test de pouvoir réducteur plasmatique (FRAP *in vivo*)

L'essai FRAP a été réalisé selon la méthode décrite par Benzie et Strain (1996). Brièvement, 300 µl du réactif FRAP, préalablement incubé à 37 °C, ont été mélangés avec 30 µl d'eau bidistillée et 10 µl de sérum. L'augmentation de l'absorbance à 593 nm a été ensuite suivie pendant 30 minutes à 37 °C. Une gamme du FeSO₄.7H₂O a été utilisée pour calculer les valeurs FRAP des sérums de chaque groupe. La valeur FRAP a été exprimée en mM du FeSO₄.7H₂O/ml de sérum.

II.2.7 Test d'activité anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire a été évalué selon la méthode de Garrido et ses collaborateurs (2004), sur des souris mâles adultes (25-30 g). En effet, une solution (0.2 mg/ml) de PMA (phorbol myristate acétate) dissout dans 20 µl de DMSO, a été appliquée sur la surface de l'oreille gauche de chaque souris (4 µg/oreille). L'oreille droite (contrôle) a reçu le véhicule seulement (20 µl DMSO). Les EBr de chaque plante (Tableau 12) ont été injectés 1 h avant l'application du PMA. Deux groupes témoins ont été utilisés : un groupe de témoin positif avec l'application du PMA à l'oreille gauche et un groupe de référence traités avec le diclofénac (DCF).

Tableau 12. Doses injectées avant une heure de l'application de PMA.

Groupe	Solution injectée	Dose (mg/Kg)
T (+)	NaCl (0.9 %)	/
DCF	Diclofénac	10
SS-D ₁	SS-EBr	12.5
SS-D ₂	SS-EBr	25
LA-D ₁	LA-EBr	50
LA-D ₂	LA-EBr	100

Six heures après l'application du PMA, les souris ont été tués par dislocation cervicale et un disque de 6 mm de diamètre de chaque oreille a été enlevé, le poids et l'épaisseur de chaque disque ont été mesurés. L'œdème de l'oreille a été calculé par la soustraction du poids ou d'épaisseur d'oreille droite (véhicule) de l'oreille gauche (PMA), et exprimé en poids ou épaisseur d'œdème. Le pourcentage d'inhibition a été exprimé comme une réduction en poids ou en épaisseur par rapport au groupe témoin positif.

Réalisation des coupes histologiques

Les disques de chaque oreille gauche et droite sont fixés dans 10 % formol pendant une semaine. Puis, les étapes suivantes : inclusion, coupure et coloration sont effectuées au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique, CHU de Sétif.

Les échantillons ont été déshydratés par le passage (30 min) dans trois bains successifs d'éthanol (70-75, 90-95 et 100 %), puis éclaircies (20 min) dans deux bains de toluène et inclus dans la paraffine (deux bains de 2 heures pour chacun) (l'opération a été automatisée à l'aide d'un automate TISSUE-TEK® II). L'inclusion définitive a été ensuite réalisée dans des moules métalliques (Shandon [O] Histocentre). Les blocs de paraffines obtenus ont été ensuite coupés par un microtome (LEICA RM 2145). Les coupes de 5 µm d'épaisseur ont été étalées sur des lames et séchées pendant une heure à 37 °C, réhydratées, colorées à l'hématoxyline-éosine (SHANDON [O]) (Lullman-Rauch, 2008).

II.2.8 Analyses statistiques

Les valeurs ont été en général exprimées en moyenne \pm SD ou SEM. Les résultats des différents tests ont été analysés par ANOVA univariée, suivie du test de *Dunnnett* pour les comparaisons avec les standards ou test de Tukey's pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives. La comparaison des moyennes et des variances a été déterminée grâce au logiciel « Graphpad Prism » version 5.0.

Chapitre III

Résultats et discussion

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Extraction et analyses des fractions

III.1.1 Extraction des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes des deux plantes médicinales a été effectuée par les solvants organiques à partir d'une poudre végétale selon Markham *et al.*, (1982). La séparation est basée sur le degré de solubilité des polyphénols dans les solvants organiques. Elle s'effectue en quatre étapes : (i) solubilisation des polyphénols dans le méthanol, (ii) délipidation de l'extrait par l'ajout de l'hexane, (iii) l'ajout du chloroforme pour l'obtention des flavonoïdes aglycones et (iiii) l'ajout de l'acétate d'éthyle pour l'obtention des flavonoïdes glycosylés.

Donc les différents extraits préparés seraient comme suit : l'extrait brut peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins, l'extrait d'hexane qui est en générale constitué de lipides et de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, l'extrait du chloroforme est plus riche en flavonoïdes aglycones, l'extrait d'acétate d'éthyle contient les flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés et l'extrait aqueux peut être constitué des flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tetra-glycosylés).

Le calcul des rendements par rapport au poids de la poudre végétale (Tableau 13) a montré pour la plante SS que l'EBr représente le rendement le plus élevé, suivi par l'EAq, l'ECh et l'EAE, en fin le rendement de l'EHx est le plus faible, c'est 11 fois plus inférieurs à celui de l'EBr. L'ordre de % de rendement obtenu pour la deuxième plante (LA) est proche à celle de SS, sauf que pour l'EAE qui présente un rendement plus élevé que l'ECh. La comparaison entre les résultats des deux plantes montre que LA contient une quantité des biomolécules soluble dans le mélange hydro-alcoolique 10 fois plus supérieure à celle de SS, aussi le pourcentage des flavonoïdes (glycosylés et aglycones) de LA est plus élevé que SS.

Le calcul des pourcentages de rendement des fractions par rapport au poids de l'EBr de chaque plante (Tableau 13) donne le pourcentage des flavonoïdes présents dans l'EBr de chaque plante. Les résultats obtenus montre que l'EBr-SS contient un grand pourcentage des flavonoïdes (aglycones et glycosylés), mais l'EBr-LA contient un grands pourcentage des molécules hautement polaires (flavonoïdes di, tri et tetra-glycosylés, tannin...etc.).

Tableau 13. Rendements des fractions extraites en pourcentage par rapport au poids total et EBr.

Extrait	% Rendement/Poids totale		% Rendement/EBr	
	SS	LA	SS	LA
EBr	2.98 ± 0.08	29.99 ± 0.10	/	/
ECh	0.48 ± 0.05	2.02 ± 0.02	16.31 ± 1.50	6.73 ± 0.07
E Ae	0.44 ± 0.06	2.77 ± 0.02	15.04 ± 1.62	9.23 ± 0.06
E Aq	0.70 ± 0.04	23.02 ± 0.02	23.54 ± 0.81	76.67 ± 0.06
E Hx	0.26 ± 0.02	0.47 ± 0.01	8.78 ± 0.69	1.56 ± 0.04

Les valeurs exprimé la moyenne ± SD (n = 3).

La partie aérienne de LA présente une quantité des molécules soluble dans le solvant d'extraction 5 fois plus élevé que *Capparis spinosa* (Baghiani *et al.*, 2012), mais cette plante a un rendement 3 fois plus supérieur que SS.

III.1.2 Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des fractions des deux plantes basé sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) de réactif de Folin-Ciocalteu (FC) par les groupement oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation des produits de réduction de couleur bleu. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Li *et al.*, 2007).

Le dosage montre que l'E Ae est le plus riche en polyphénols pour les deux plantes suivi par l'E Ch pour SS et l'E Br pour LA, l'E Aq représente la fraction la plus pauvre en polyphénols

(Tableau 14). Les résultats montrent que l'E Ae-SS est le plus riche en polyphénols totaux en comparant avec les fractions de l'autre plante (LA).

Tableau 14. Dosage des polyphénols totaux des fractions de SS et LA.

Extrait	µg AG/mg d'extrait	
	SS	LA
EBr	266.93 ± 7.04	272.16 ± 3.71
ECh	327.56 ± 2.57	234.86 ± 0.81
E Ae	429.72 ± 5.64	278.55 ± 2.02
E Aq	143.24 ± 1.88	163.37 ± 4.96

Les valeurs exprimé la moyenne ± SD (n = 3).

Les résultats de dosage montre approximativement que l'E Br des deux plantes (SS et LA) contient presque le même pourcentage des polyphénols totaux (26.69 ± 0.70 % et 27.21 ± 0.37 %, respectivement) mais ce pourcentage des polyphénols contient une forme majoritaire des flavonoïdes glycosylés, flavonoïdes sulfatés et des coumarines (E Ae) pour les deux plantes.

Le réactif de FC est un réactif non spécifique de composés phénoliques et peut être réduit par de nombreux composés non phénoliques, la mesure des changements de couleur après une incubation de deux heures dans des conditions basiques peut être utilisé pour déterminer l'existence de phénols dans les extraits (Huang *et al.*, 2005).

III.1.3 Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes comme l'un des groupes les plus diverse et répandue des composés naturels, se sont probablement les composés phénoliques naturels les plus importants. Ces composés possèdent un large spectre d'activités chimiques et biologiques, y compris les propriétés anti-radicalaires (Djeridane *et al.*, 2010).

La méthode $AlCl_3$ est simple, peu coûteuse et offre une bonne sensibilité. Cette méthode permet de déterminer la teneur en flavonoïdes totale, qui forment un complexe avec $AlCl_3$ même en présence d'autres composés polyphénoliques, qui ne peut pas former un complexe avec $AlCl_3$

(Matyushchenko et Stepanova, 2003). La teneur en flavonoïdes a été estimée en utilisant cette méthode (Bahorun *et al.*, 1996), a été calculée en $\mu\text{g EQ}$ et ER / mg d'extrait (Tableau 15).

Tableau 15. Dosage des flavonoïdes des fractions de SS et LA.

Extrait	$\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait		$\mu\text{g ER/mg}$ d'extrait	
	SS	LA	SS	LA
EBr	37.38 ± 0.31	74.77 ± 1.27	59.65 ± 0.52	119.30 ± 2.09
ECh	46.61 ± 0.18	97.37 ± 0.32	72.85 ± 0.30	156.96 ± 5.34
E Ae	55.73 ± 0.43	116.90 ± 6.10	87.89 ± 0.71	196.01 ± 0.65
E Aq	15.33 ± 0.11	50.25 ± 1.30	24.28 ± 0.19	78.86 ± 2.15

Les valeurs exprimé la moyenne \pm SD (n = 3).

La teneur en flavonoïdes pour les deux plantes diminuée dans l'ordre : EAe, ECh, EBr et EAq. En d'autre terme, les flavonoïdes existants dans l'EAe sont presque de la même concentration dans l'ECh des deux plantes. Mais cette teneur en flavonoïdes de SS montré que l'EAe est 1.5 et 3.5 fois plus élevées que celles de l'EBr et l'EAq, respectivement. Pour LA, l'EAe présente une concentration des flavonoides 1.5 et 2.5 fois plus élevées que celles du EBr et EAq, respectivement. La comparaison entre les fractions des deux plantes montres que l'EAe-SS présente la teneur la plus élevé des flavonoïdes.

Les EBr de LA et SS contient une quantité en polyphénols et en flavonoïdes supérieur à celle des EBr de plusieurs plantes médicinale ; racines et parties aérienne de *Carthamus caeruleus* (Baghiani *et al.*, 2010), racines d'*Ajuga iva* (Baghiani *et al.*, 2011), graines de *Peaganum harmala* (Djarmouni *et al.*, 2012), parties aériennes de *Globularia alypum* et *Anchusa azurea* (Boussoualim *et al.*, 2014). Mais une quantité inférieur à celle trouvé dans les extraits méthanolique et aqueux des feuille de *Myrtus nivellei* (Touaibia et Chaouch, 2014).

III.2 Purification de la XO

La purification de la XO a été réalisée par la méthode décrite par Baghiani *et al.*, (2003) à partir du lait bovin frais, par une série de centrifugations puis précipitation au sulfate

d'ammonium, suivie d'une chromatographie d'affinité sur colonne d'agarose-héparine basée sur l'affinité de la XO aux glycosaminoglycanes sulphatés. Le rendement de la purification est de 23.21 mg d'enzyme purifiée par un litre du lait bovin frais. Il est similaire à ce qui est trouvé par Baghiani *et al.*, (2002 ; 2003). Le spectre d'absorption caractéristique de la XO par un balayage spectrophotométrique (UV-Vis) a présenté trois pics majeurs à 280, 325 et 450 nm (Figure 12). La XO purifiée a donné un degré de pureté élevé présenté par son PFR de 5.23.

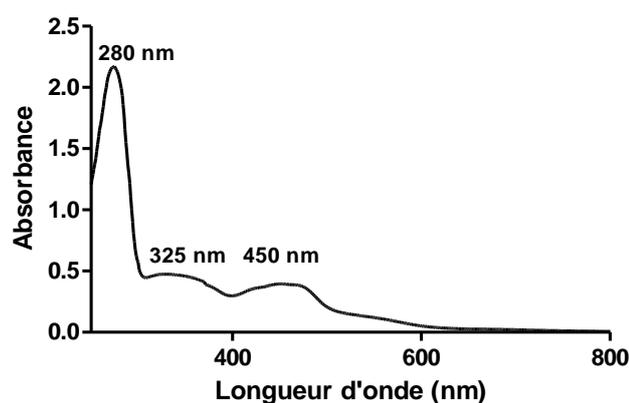


Figure 12. Spectre d'absorption UV-Visible de la XO purifiée.

La pureté de l'enzyme a été confirmée par une électrophorèse (SDS-PAGE). Le chemin électrophorétique a présenté une bande majeure d'approximativement de 150 KDa (Figure 13).

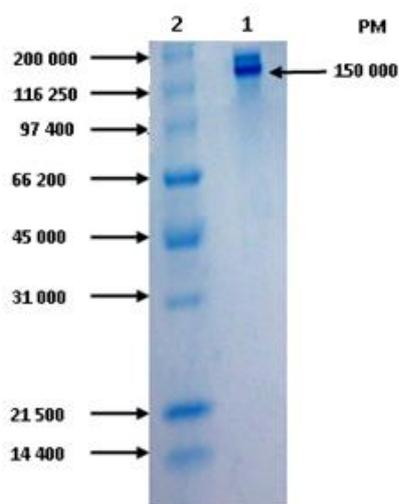


Figure 13. Electrophorèse (SDS-PAGE) de la XO purifiée, (1) XO pure (150 000 Da), (2) standards des poids moléculaires (myosine 200 000, β -galactosidase 116 250, phosphorylase b 97 400, albumine 66 200, ovalbumine 45 000, anhydrase carbonique 31 000, Trypsine inhibiteur 21 500 et lysozyme 14 400 Da).

L'activité totale et l'activité de la forme oxydase de l'enzyme purifiée du lait bovin a été estimée en présence de xanthine comme un substrat réducteur et de NAD^+ et d' O_2 comme substrat oxydant, et le pourcentage de la forme oxydase a été par la suite calculé. L'enzyme pure a présenté une activité totale de 2011 nmol/min/mg de protéine, et le pourcentage de la forme oxydase (% XO) de l'enzyme est de 89 % (Tableau 16).

Tableau 16. Caractéristiques de XO bovine purifiée.

PFR	XO ratio	Rendement (mg/l)	Activité spécifique (nmole/min/mg d'enzyme)	
			XO	XOR
5.23	89 %	23	2011	2261

Environ 10 % de l'enzyme purifiée était sous la forme déshydrogénase. Depuis la solubilisation de XOLB, tel que décrit ici, a été fait en présence de 10 mM de DTT (agent réducteur), il est raisonnable de supposer que la XOLB solubilisé sera principalement sous forme de XDH et cette forme peut être retenue lors de la procédure de purification (Hunt et Massey, 1992). Cependant, dans le procédé de purification de XOLB, au moyen d'un fractionnement au sulfate d'ammonium, la dialyse et la chromatographie, l'agent réducteur est éliminé progressivement à partir de la solution de protéine. Sous cette condition non réduite la forme de XDH sera convertie à la XO. La XOLB isolée sera donc la plupart du temps, si pas complètement, sous la forme de XO.

III.3 Test d'effet des extraits sur la XO

III.3.1 Test d'effet inhibiteur de la XO *in vitro*

L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits de SS et LA sur l'activité de la XO a été déterminée par la mesure de la production de l'acide urique à 295 nm. Tous les extraits de SS et LA ont montré un effet inhibiteur significatif sur l'activité de la XO ($p < 0.01$), dont la relation est dose dépendante (Figure 14).

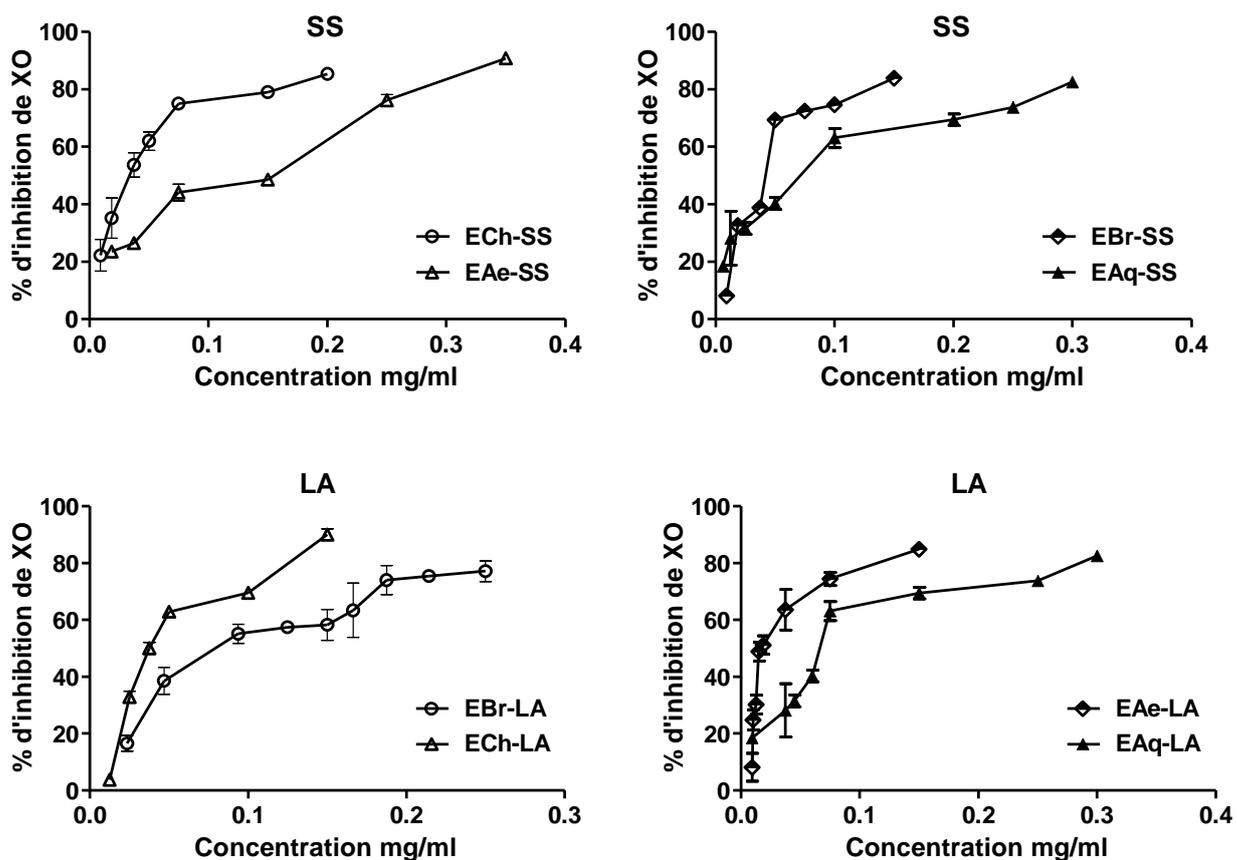


Figure 14. Inhibition de la XO par les extraits de SS et LA. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures \pm SD.

Les extraits de SS inhibent la XO significativement, les valeurs d' IC_{50} montrent que les extraits les plus actifs sont l'ECh et l'EBr, suivi par l'EAe et EAq (Tableau 17).

Tableau 17. IC_{50} d'inhibition de la XO des extraits de SS et LA.

Extrait	IC_{50} (μ g/ml)	
	SS	LA
EBr	$49.075 \pm 5.706^{***}$	$85.380 \pm 6.363^{***}$
ECh	$36.370 \pm 2.684^{***}$	$39.112 \pm 0.285^{***}$
EAe	$137.616 \pm 4.396^{***}$	17.926 ± 0.169^{ns}
EAq	$139.508 \pm 5.203^{***}$	$63.777 \pm 0.703^{***}$

Les valeurs sont les moyennes \pm SD (n = 3 à 4). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au allopurinol ($IC_{50} = 8.57 \pm 0.53 \mu$ g/ml) ; ns : non significatif, *** : $p \leq 0.001$.

LA présente une très grande activité pour les EAe et ECh suivie par l'EAq et l'EBr (Tableau 17). La forte activité de l'EAe, qui était de 2 fois plus inférieure à celui de l'allopurinol, peut

s'expliquer par sa teneur élevée en polyphénols. Cependant, l'ECh a présenté un effet d'inhibition supérieur à celui de l'EBr, bien que la teneur élevée en composés polyphénoliques d'EBr. L'inhibition de la XO par l'ECh pourrait être liée non seulement à la teneur en polyphénols, mais aussi de la nature de ces composés.

Orbán-Gyapai *et al.* (2014) ont testé l'activité inhibitrice de la XOLB des extraits aqueux et organique de 27 espèces appartenant à la famille Polygonaceae, la comparaison des résultats d'IC₅₀ obtenue conduit à sélectionné deux plante active ; *Polygonum hydropiper* (16.41 ± 3.36 µg/ml) et *Rumex acetosella* (19.32 ± 3.11 µg/ml) et cette activité est comparable à celle d'EAE-LA.

Les fonctions biologiques des flavonoïdes sont en relation étroite avec leurs structures, Lin *et al.*, (2002) ont constaté que la présence de la double liaison entre les carbones C2 et C3 permet de maintenir la structure plane des flavonoïdes qui est essentielle pour la potentialisation de leur effet inhibiteur, et les flavonoïdes manquant de cette structure ne présentent aucune activité inhibitrice sur la XO. Ils ont montré aussi que les hydroxyles présents sur les carbones C5 et C7 ainsi que la fonction carbonyle sur le carbone C4 interviennent dans les interactions hydrogènes et électrostatiques entre l'inhibiteur et le site actif de l'enzyme. Cependant, la substitution de l'hydroxyle C3 ou la glycosylation de carbone C6 induit une déstabilisation des interactions entre l'inhibiteur et le site actif de l'enzyme et par conséquent une diminution de l'effet inhibiteur.

Skibo (1986) a montré que les dérivés du benzimidazole, en particulier l'analogue 2- α -bromo, agissent au niveau du cofacteur FAD plutôt qu'au site Molybdène. Ces composés inhibent l'enzyme par alkylation du FAD réduit conduisant à une inhibition irréversible de l'enzyme. Par ailleurs, Sanders et collaborateurs (1997) ont rapporté que le diphenylène iodonium (DPI), un inhibiteur de la NADPH oxydase des neutrophiles, inhibe efficacement les activités NADH oxydase et la XOR humaine et bovine. Ces chercheurs ont interprété cette inhibition par l'action du DPI sur le cofacteur FAD sans passer par le site Molybdène. Bien qu'il

existe des substances qui inhibent la XO en bloquant la fixation du substrat au site FAD. Yan *et al.* (2013) ont montré que le lutéoline interagir avec les résidus d'acides aminés primaires situés à l'intérieur du site actif de la XO.

L'inhibition de la XO par les extraits SS et LA est peut traduite par la présence d'un ou de plusieurs composés agissant indépendamment ou en synergie sur les sites Mo et FAD actifs de l'enzyme.

III.3.2 Détermination du type d'inhibition

Les mécanismes d'inhibition des extraits des deux plantes a été étudié par analyse cinétique de Lineweaver-Burk de réactions en présence et en l'absence des extraits de SS (Annexe 2) et LA (Annexe 3), avec une concentration approximativement proche d' IC_{50} de chaque extrait, dans un mélange réactionnel de la XO.

Le mode d'inhibition a été étudié et comparé aux standards ; l'allopurinol, la quercétine et la catéchine. Les données indiquent que l'EAc-LA (18 $\mu\text{g/ml}$), qui est un puissant inhibiteur de la XO, a montré une inhibition compétitive, de même que l'EBr-LA (93 $\mu\text{g/ml}$). Pour les extraits de SS qui présentent une inhibition compétitif sont l'EAc (140 $\mu\text{g/ml}$) et l'EAq (140 $\mu\text{g/ml}$). Le même type d'inhibition a été trouvé dans le cas de l'allopurinol (8 $\mu\text{g/ml}$) (Figure 15).

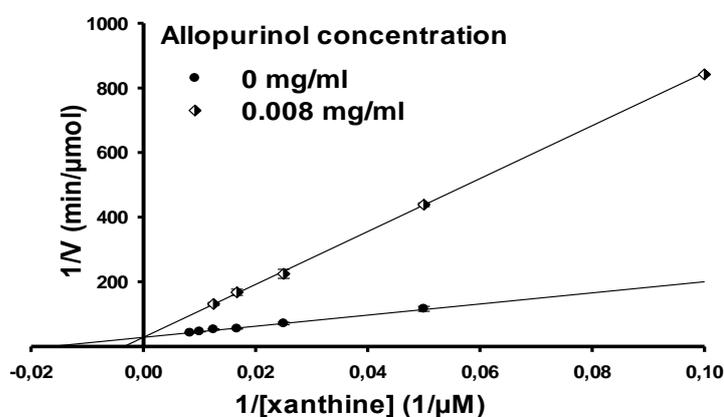


Figure 15. Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence d'allopurinol (8 $\mu\text{g/ml}$). Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures \pm SD.

Cependant, l'ECh (37.5 $\mu\text{g/ml}$) et l'EAq (45 $\mu\text{g/ml}$) de LA et l'EBr (50 $\mu\text{g/ml}$) et l'ECh (35 $\mu\text{g/ml}$) de SS ont montré une inhibition de type mixte. Inhibition mixte a été observée de manière similaire pour la quercétine (50 $\mu\text{g/ml}$). Nos résultats ont montré que les flavonoïdes glycosidiques (EAe) de LA présentent la plus forte inhibition de la XO et dans un type compétitif et les flavonoïdes non-glycosidiques (ECh) des deux plante ont montré une inhibition mixte.

Les flavonoïdes peuvent inhiber l'activité de XO, de nombreux chercheurs ont étudié les mécanismes d'inhibition. Özyürek *et al.*, (2009) ont été montrés que le catéchines de thé inhibe la XO à faible concentration. Cette inhibition est d'une manière non compétitive (Berboucha *et al.*, 2009). Takahama *et al.*, (2011) ont montré que l'inhibition de la XO par quercétine était mixte (compétitive / non compétitive). Nos résultats ont confirmé ces recherches, où la catéchine et de quercétine ont montré une inhibition mixte et non compétitif, respectivement, à une dose de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 16).

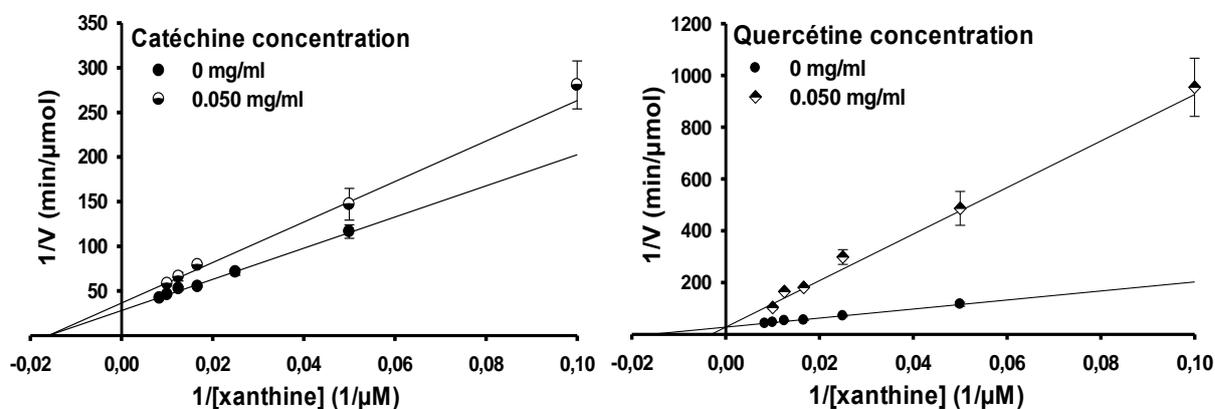


Figure 16. Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de quercétine et catéchine (50 $\mu\text{g/ml}$). Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures \pm SD.

III.3.3 Test d'inhibition de la XO *in vivo* (effet hypouricémique)

L'oxonate de potassium, un inhibiteur compétitif sélectif de l'uricase, bloque l'effet de l'uricase hépatique et provoque hyperuricémie (Feidovich, 1965). Les résultats montrent que les souris traitées avec 250 mg/Kg d'OP présentaient une élévation significative des taux d'acide urique sérique et hépatique par rapport au groupe normal-véhicule (Tableau 18).

Tableau 18. Concentration d'acide urique sérique et hépatique des groupes traités.

Groupes	Acide urique sérique (mg/dL)	Acide urique hépatique (mg/dL)
Témoin	1.550 ± 0.123	4.850 ± 0.449
OP	4.711 ± 0.297	10.350 ± 0.836
OP+Allopurinol	1.890 ± 0.102***	1.450 ± 0.143***
OP+EBr-SS	2.017 ± 0.090***	1.500 ± 0.137***
OP+ECh-SS	1.900 ± 0.130***	1.325 ± 0.170***
OP+EAe-SS	2.100 ± 0.104***	1.860 ± 0.211***
OP+EAq-SS	2.200 ± 0.089***	1.917 ± 0.181***
OP+EBr-LA	1.922 ± 0.092***	4.160 ± 0.393***
OP+ECh-LA	1.883 ± 0.162***	2.700 ± 0.204***
OP+EAe-LA	1.783 ± 0.116***	1.747 ± 0.187***
OP+EAq-LA	3.240 ± 0.216***	5.886 ± 0.326***

Les valeurs sont les moyennes ± SD (n = 8 à 9). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au groupe OP ; *** : $p \leq 0.001$.

Les résultats ont montré que le niveau d'acide urique sérique initial chez les souris était de 1.55 ± 0.12 mg/dL. L'injection intrapéritonéale d'OP a provoqué une augmentation significative du taux d'acide urique sérique, qui a été atteint 4.71 ± 0.29 mg/dL. Les niveaux d'acide urique du foie chez les souris hyperuricémique (10.35 ± 0.83 mg/dL) étaient 2 fois plus élevés que leur niveau chez les souris non traité (4.85 ± 0.44 mg/dL).

L'administration des extraits de SS et LA provoque la diminution du taux d'acide urique sérique et hépatique, significativement. Cependant, l'EAq-LA a présenté une forte inhibition de la XO *in vitro* mais il avait une faible activité hypo-uricémiantes. Il est possible que les différences dans la structure, l'absorption et le métabolisme des différents extraits testés peuvent conduire à la formation de métabolites qui n'inhibent pas la XO ou avec une faible activité inhibitrices de la XO.

L'allopurinol a montré une réduction remarquable des niveaux d'acide urique dans le foie chez les animaux hyperuricémiques (1.45 ± 0.14 mg/dL) et ce niveau est inférieur à celui des animaux normaux, et ces résultats sont en accord avec les résultats de Mo *et al.*, 2007. L'ECh-SS a montré un effet hypoureicimiant plus élevé que celui de l'allopurinol, cet extrait semble à

avoir l'effet inhibiteur de la XO *in vitro* le plus important et aussi l'effet hypo-uricémique le plus puissant *in vivo*.

Les résultats de dosage de l'activité enzymatique de la XO (nmole d'acide urique/min) des sérums ont montré le même ordre d'activité hypo-uricémique (Tableau 19). Deux extraits de LA (ECh et EAe) présentent une activité inhibitrice de la XO sérique supérieure à celle de l'allopurinol.

Tableau 19. Dosage de l'activité de la XO sérique de tous les groupes étudiés.

Groupes	Activité (nmole/min)	% d'inhibition de XO
Témoin	0.972 ± 0.031	/
OP	0.935 ± 0.007 ns	3.80 ± 0.77***
OP+Allopurinol	0.356 ± 0.018***	63.40 ± 1.87
OP+EBr-SS	0.754 ± 0.014***	22.42 ± 1.51***
OP+ECh-SS	0.427 ± 0.017***	56.04 ± 1.83**
OP+EAe-SS	0.664 ± 0.015***	31.70 ± 1.64***
OP+SS-EAq	0.865 ± 0.012***	11.07 ± 1.26***
OP+EBr-LA	0.561 ± 0.012***	42.27 ± 1.32***
OP+ECh-LA	0.310 ± 0.017***	68.13 ± 1.82 ns
OP+EAe-LA	0.241 ± 0.010***	75.15 ± 1.05***
OP+EAq-LA	0.872 ± 0.011***	10.31 ± 1.16***

Les valeurs sont les moyennes ± SD (n = 8 à 9). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au groupe ; Témoin (Activité) et OP+Allopurinol (% d'inhibition) ; ns : non significatif, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$.

Mais pour le dosage de l'activité de la XO hépatique (Tableau 20), l'allopurinol présente l'inhibiteur le plus puissant et l'ECh-SS présente la fraction la plus active sur la XO de foie, la diminution de pourcentage d'inhibition de la XO hépatique par rapport au XO sérique est peut être due à la biodisponibilité des biomolécules des fractions.

Le groupe d'OP présente un pourcentage d'inhibition de la XO (sérique et hépatique) très faible malgré l'absence totale des inhibiteurs exogènes, et cela peut être dû à la concentration très élevée de l'acide urique sérique et hépatique (4.71 ± 0.29 et 10.35 ± 0.83 mg/dL, respectivement). Selon Radi *et al.*, 1992, les produit issus de l'activité de la XOR peuvent également l'inhiber, citant comme exemple l'acide urique, ce dernier est un inhibiteur non

compétitif de la XOR, son mécanisme d'inhibition pourrait correspondre à une dissociation réversible du complexe enzyme-produit.

Tableau 20. Dosage de l'activité de la XO hépatique des groupes traités.

Groupes	Activité (nmole/min)	% d'inhibition de XO
Témoin	2.035 ± 0.036	/
OP	1.979 ± 0.012 ns	2.74 ± 0.62***
OP+Allopurinol	0.649 ± 0.019***	68.08 ± 0.97
OP+EBr-SS	0.717 ± 0.029***	64.77 ± 1.43 ns
OP+ECh-SS	0.661 ± 0.029***	67.52 ± 1.42 ns
OP+EAe-SS	0.922 ± 0.015***	54.67 ± 0.72***
OP+EAq-SS	0.952 ± 0.013***	53.21 ± 0.68***
OP+EBr-LA	1.660 ± 0.027***	18.45 ± 1.34***
OP+ECh-LA	1.337 ± 0.030***	34.30 ± 1.48***
OP+EAe-LA	0.850 ± 0.018***	58.21 ± 0.90***
OP+EAq-LA	1.840 ± 0.238***	9.57 ± 1.17***

Les valeurs sont les moyennes ± SD (n = 8 à 9). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au groupe ; Témoin (Activité) et OP+Allopurinol (% d'inhibition) ; ns : non significatif, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$.

L'insuffisance rénale est la cessation de la fonction rénale et elle peut être aiguë ou chronique. En cas d'insuffisance rénale aiguë, il est la perte rapide de la fonction rénale dans les heures ou jours, même si la condition est potentiellement réversible et une fonction rénale normale peut être rétablie. La dégradation est brutale, avec des augmentations dans les concentrations d'urée et de créatinine (Nessar *et al.*, 2007).

Li *et al.* (2011) ont été montré que l'OP induit l'insuffisance rénale, il provoque l'augmentation des taux d'urée et de créatinine. Les résultats de dosage d'urée et créatinine sériques et hépatiques (Tableau 21), ont montré l'effet protecteur de toutes les fractions de LA et SS. Les recherches ont montré que la thérapie d'allopurinol diminue de manière significative les taux d'acide urique sériques chez les patients hyperuricémiques, et son utilisation contribue à préserver la fonction rénale au cours de 12 premiers mois de traitement (Sui *et al.*, 2006). Ce qui explique les niveaux normaux de la créatinine et de l'urée chez les souris hyperuricémiques traitées avec l'allopurinol (10 mg/Kg).

Tableau 21. Dosage de l'urée et de la créatinine du sérum et du foie des groupes traités.

Groupes	Sérum		Foie	
	Urée (g/l)	Créatinine (mg/l)	Urée (g/l)	Créatinine (mg/l)
Témoin	0.012 ± 0.002	1.000 ± 0.002	0.100 ± 0.012	1.571 ± 0.202
OP	0.070 ± 0.004	3.570 ± 0.012	0.178 ± 0.002	4.375 ± 0.263
OP+Allopurinol	0.014 ± 0.002***	1.571 ± 0.202***	0.138 ± 0.014 ^{ns}	2.800 ± 0.200***
OP+EBr-SS	0.045 ± 0.004***	1.167 ± 0.166***	0.160 ± 0.007 ^{ns}	2.400 ± 0.400***
OP+ECh-SS	0.015 ± 0.002***	1.286 ± 0.184***	0.140 ± 0.007 ^{ns}	1.286 ± 0.184***
OP+EAc-SS	0.026 ± 0.002***	1.429 ± 0.202***	0.148 ± 0.016 ^{ns}	1.429 ± 0.202***
OP+EAq-SS	0.030 ± 0.001 ***	1.444 ± 0.175***	0.157 ± 0.017 ^{ns}	1.500 ± 0.223***
OP+EBr-LA	0.044 ± 0.002***	1.800 ± 0.200***	0.133 ± 0.011 ^{ns}	3.000 ± 0.189***
OP+ECh-LA	0.017 ± 0.001***	1.014 ± 0.014***	0.104 ± 0.011*	3.286 ± 0.285**
OP+EAc-LA	0.016 ± 0.002***	1.500 ± 0.223***	0.117 ± 0.015*	2.714 ± 0.184***
OP+EAq-LA	0.057 ± 0.002*	2.333 ± 0.210***	0.122 ± 0.020 ^{ns}	2.571 ± 0.202***

Les valeurs sont les moyennes ± SD (n = 8 à 9). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au groupe OP ; *** : p ≤ 0.001.

Les extraits de LA diminuent d'une façon significative les taux sériques de la créatinine et de l'urée. Cependant, les meilleurs extraits hypouricémiants, l'EAc-LA et l'ECh-SS, ont présenté un effet protecteur supérieur à celui de l'allopurinol. Les EAq des deux plantes ont montré une faible activité hypouricémiante, mais un effet protecteur important en diminuant significativement le taux d'urée et de créatinine.

III.4 Tests d'activité antioxydantes *in vitro*

III.4.1 Test d'activité anti-radicalaire (DPPH)

Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de RLs, et se réduit en 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazine (Burits et Bucar, 2000).

Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante (Tepe *et al.*, 2005).

L'activité antioxydante de différentes fractions des deux plantes SS et LA *vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical. Les résultats de cinétique d'inhibition de DPPH montrent que tous les fractions ont une activité anti-radicalaire dose dépendante (Figure 17).

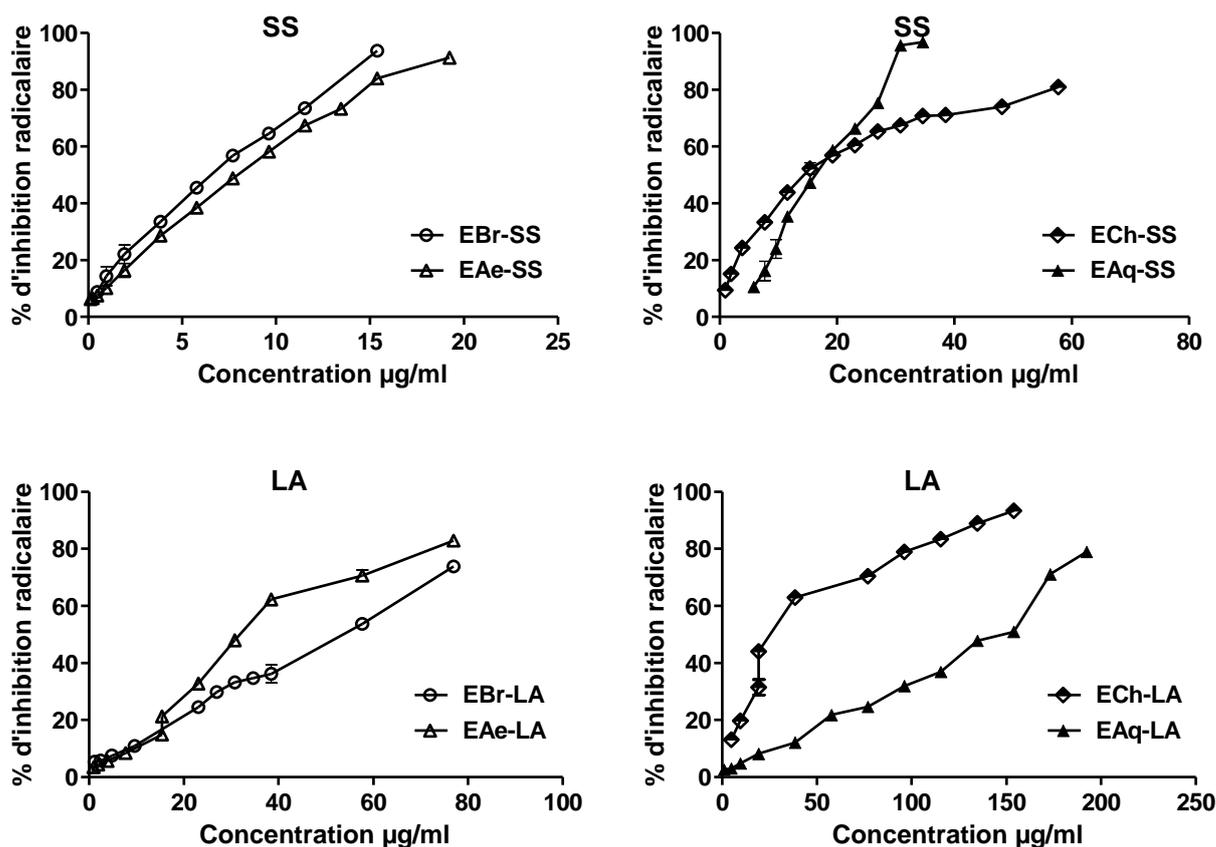


Figure 17. Cinétique d'activité anti-radicalaire des fractions de SS et LA. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

Le tableau 22 représente les IC_{50} des différents extraits et standards, c'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Boumarfegue *et al.*, 2012). À des fins comparatives plusieurs antioxydants standards sont utilisés ; la quercétine, la rutine, l'acide gallique et le BHT (Annexe 4).

Tableau 22. IC₅₀ d'activité anti-radicalaire *vis-à-vis* le DPPH des extraits de SS et LA.

Extrait	IC ₅₀ (µg/ml)		
	SS	LA	Standards
EBr	7.09 ± 0.12***	51.38 ± 0.08***	BHT 0.087 ± 0.001
ECh	15.02 ± 0.33***	52.15 ± 0.21***	Acide gallique 1.26 ± 0.01
E Ae	8.41 ± 0.08***	35.44 ± 0.24***	Quercétine 5.82 ± 0.20
E Aq	17.73 ± 0.23***	134.42 ± 1.20***	Rutine 5.58 ± 0.40

Chaque valeur présente la moyenne ± SD (n=3). La comparaison est réalisé contre le BHT, *** : $p \leq 0.001$.

SS représente deux extraits très actifs, l'EBr et l'E Ae, avec une IC₅₀ proche à celle de quercétine et rutine, suivi par l'ECh et l'E Aq qui présentent une activité deux fois plus inférieure. La comparaison entre ces résultats et les résultats de dosage où l'E Ae présente la concentration la plus élevée en flavonoïdes et polyphénols totaux, mais il ne présente pas l'activité anti-radicalaire la plus forte. L'ECh aussi, présente une teneur en flavonoïdes supérieure à celle de l'EBr mais l'activité anti-radicalaire a été mentionnée pour l'EBr, l'activité de ce dernier est peut être due à la synergie moléculaire car toutes les fractions séparées à partir de cet extrait présentent une activité inférieur à son activité, où a d'autres molécules non polyphénoliques.

Liu *et al.* (2008), ont testé l'effet synergétique entre plusieurs antioxydants en utilisant le test de DPPH. Ils ont montré l'existence de plusieurs facteurs qui influence l'effet synergétique d'un mélange des antioxydants dans un système biologique. La concentration et la combinaison sont les facteurs les plus importants qui influencent sur la synergie moléculaire. Il a été montré que des concentrations et des combinaisons particulières des antioxydants ont une activité supérieure à celle des molécules pures.

L'extrait le plus active de LA c'est l'E Ae, il présente une activité anti-radicalaire 1.5 fois plus supérieure à celle de l'EBr et de l'ECh. L'E Aq présente une faible activité en comparant avec les autres fractions. Pour cette plante, l'E Ae, le plus active, présente la teneur la plus élevé en polyphénols et flavonoïdes. Par contre, l'ECh présente une teneur supérieur à celle de l'EBr mais ils avaient presque la même activité. D'après ces résultats, l'activité de l'E Ae n'est pas

attribuée seulement à leur richesse en polyphénols et en flavonoïdes mais aussi à la nature des flavonoïdes présents dans cet extrait.

Popovici et ces collaborateurs (2009), ont montré que la structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les RLs. Il existe une hétérogénéité structurale au sein des composés phénoliques, hétérogénéité qui se traduit par des propriétés différentes. Ils ont montré que l'acide gallique représente le composé le plus actif, en utilisant le DPPH, le pouvoir antioxydant de l'epicatéchine n'est pas significativement différent et l'acide tannique a donné les valeurs environ 5 fois plus faibles.

Les résultats obtenus des deux plantes ne présente pas une corrélation linéaire entre la teneur en polyphénols ou flavonoïdes et l'activité anti-radicalaire.

III.4.2 Test d'effet scavenger du superoxyde produit par la XO (Cytochrome c)

Dans ce système, le cytochrome c a été utilisé pour déterminer la quantité de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) produit par la XO. L'interaction d' $O_2^{\bullet-}$ avec le cytochrome c conduit à la réduction de ce dernier donnant naissance au cytochrome c réduit qui absorbe à 550 nm (Selloum *et al.*, 2001). Ce système aurait pu être très utile pour la détermination de l'effet piègeur d' $O_2^{\bullet-}$ par les différents extraits des deux plantes.

Dans les conditions expérimentales, la quantité d' $O_2^{\bullet-}$ généré par la XO par minute, en l'absence d'extraits, était 10.86 ± 0.02 mM. Les résultats montre que l'activité des fractions de SS diminué dans l'ordre EBr, ECh et EAe et EAq. Où, la EBr présente une IC_{50} de 0.063 ± 0.005 mg/ml, suivie par l'ECh (0.173 ± 0.014 mg/ml), EAe (0.425 ± 0.002 mg/ml) et finalement l'EAq (0.502 ± 0.017 mg/ml).

Les valeurs d' IC_{50} pour le piégeage d' $O_2^{\bullet-}$ par les fractions de LA ont montré que l'EAe est l'extrait le plus puissant avec une IC_{50} de 0.035 ± 0.001 mg/ml, ce qui est environ 2 fois plus élevées que celle de l'EAq (0.062 ± 0.001 mg/ml). Alors que l'ECh et l'EBr ont été présentés à peu près la même activité (0.240 ± 0.008 et 0.282 ± 0.012 mg/ml, respectivement). L'effet

piégeur des RLs par les différents constituants des plantes peut être dû à des acides phénoliques et des flavonoïdes.

Les différents extraits des deux plante SS et LA ont un effet inhibiteur sur la XO, ce qui rend difficile de savoir, dans le teste du Cyt-c⁺³, si ces extraits ont un effet scavenger d'O⁻² ou un effet inhibiteur sur l'enzyme (Figure 18).

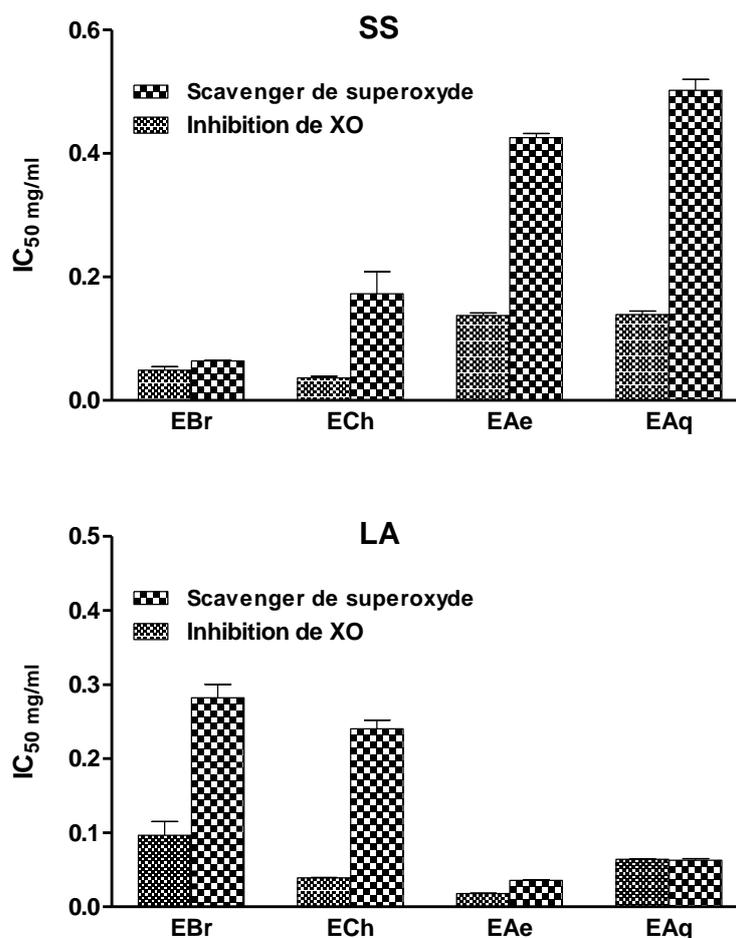


Figure 18. IC₅₀ d'inhibition de la XO en suivant la production d'acide urique et en suivant la réduction de Cyt c des extraits de SS et LA. Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 mesures ± SD.

La comparaison entre les IC₅₀ des fractions de LA ; EAe, EBr et ECh pour l'inhibition de la XO en suivant la production d'acide urique à partir de l'oxydation de la xanthine est de près de 2, 3 et 6 fois inférieure à celle de l'inhibition de la réduction de Cyt c, respectivement. Cependant, l'EAq présente presque la même IC₅₀. Alors que les fractions de SS ; EBr, ECh, EAe et EAq,

présente des IC_{50} d'inhibition de la XO 1.3, 4.7, 3 et 3.6 plus inférieurs à celles de l'inhibition de la réduction de Cyt c.

Les flavonoïdes sont connus pour leur activité anti-oxydante en général et en particulier leur pouvoir piègeur du radical $O_2^{\cdot-}$. L'effet piègeur des flavonoïdes dépend de leur structure, les exigences structurales pour l'activité l'anti-radicalaire des flavonoïdes diffèrent de celles de l'inhibition de la XO. Le cycle B est essentiel pour l'activité anti-radicalaire tandis que le cycle A y contribue faiblement. Ces deux moitiés (Cycles A et B) dans les polyphénols complexes peuvent donc réagir indépendamment pour une activité antioxydante maximum (Cotelle, 2001).

III.4.3 Test d'activité scavenger du superoxyde produit par NADH-PMS (NBT)

Le pouvoir piègeur d' $O_2^{\cdot-}$ par les différents extraits de SS et LA a été évalué spectrophotométriquement en suivant la diminution de la réduction de NBT (Nitroblue tetrazolium) en formazan ($\lambda_{max}= 560$ nm) par le superoxyde produit chimiquement dans le système PMS-NADH.

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits, des deux plants, piègent l' $O_2^{\cdot-}$ d'une manière dose dépendante (Figure 19).

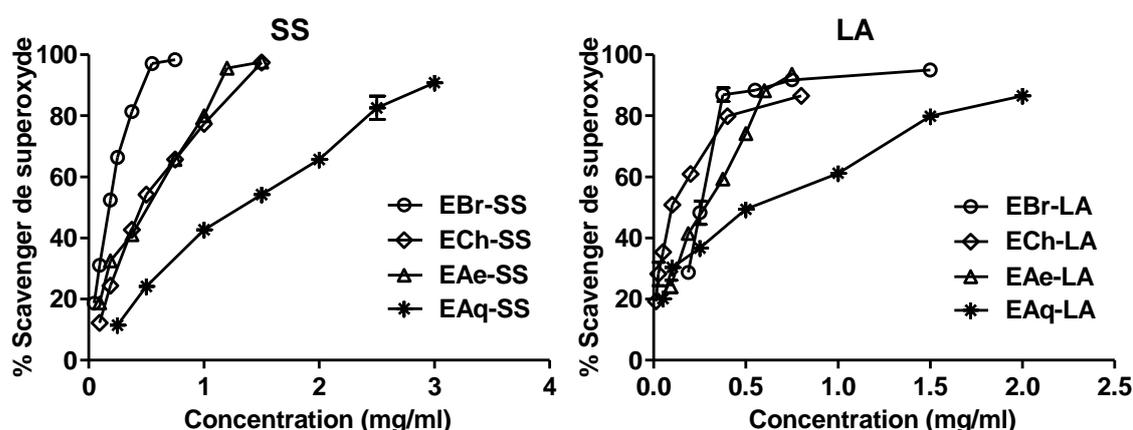


Figure 19. Effet piègeur du superoxyde produit dans le système (PMS-NADH-NBT) par les extraits de SS et LA (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

Les résultats des IC_{50} (Figure 19) de SS montre que l'EBr présente l'effet scavenger le plus puissant (0.178 ± 0.001 mg/ml) suivi par l'ECh et EAe (0.505 ± 0.005 et 0.515 ± 0.004 mg/ml, respectivement). L'extrait le moins active parmi les extraits de SS c'est l'EAq avec une IC_{50} de l'ordre 1.391 ± 0.017 mg/ml et il est 8 fois moins active que l'EBr, ces résultats sont statistiquement très significatives en comparant avec IC_{50} de quercétine (33.24 ± 0.10 μ g/ml).

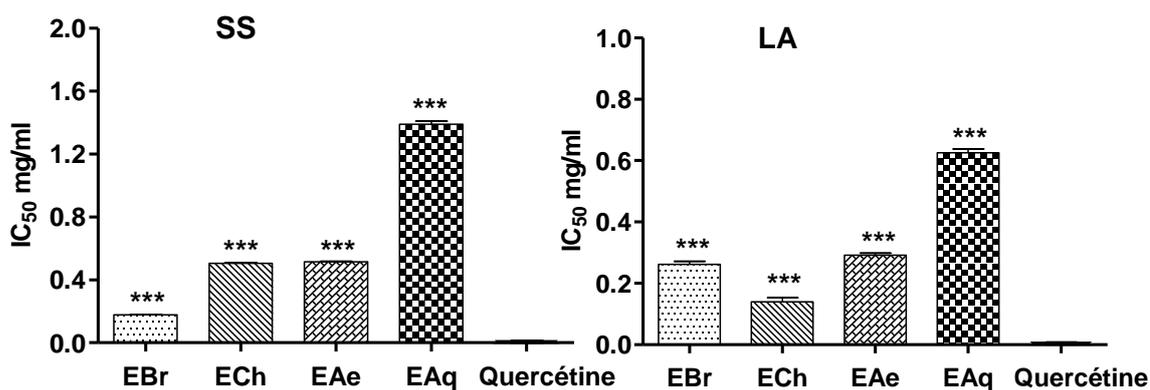


Figure 20. IC_{50} d'effet piégeur du superoxyde produit dans le système (PMS-NADH-NBT) par les extraits de SS et LA. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD ($n = 3$), *** : $p \leq 0.001$, en comparant avec le quercétine.

L'extrait le plus actif, parmi les extraits de LA, c'est l'ECh avec une IC_{50} de 0.139 ± 0.261 mg/ml suivi par l'EBr, l'EAe (0.261 ± 0.010 et 0.292 ± 0.006 mg/ml, respectivement) et l'EAq 0.625 ± 0.012 mg/ml.

Les résultats obtenus montrent une faible corrélation linéaire entre la teneur en polyphénols et le pouvoir scavenger des fractions des deux plantes (SS et LA), l'activité d'EBr-SS peut être due à la synergie moléculaire par contre l'activité d'ECh-LA peut être dû au type des flavonoïdes de cette fraction.

III.4.4 Test de blanchissement de β -carotène / acide linoléique

Le mécanisme de blanchiment de β -carotène est un phénomène à médiation des RLs résultant d'hydroperoxydes formés à partir d'acide linoléique, ces RLs vont par la suite oxyder le β -carotène, en entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie

spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les RLs dérivés de l'acide linoléique et/ou inhibé l'oxydation donc prévenir le blanchissement du β -carotène (Naidu *et al.*, 2011). La cinétique de l'activité des différents extraits de SS, LA et de BHT, le méthanol, l'eau pendant un intervalle de temps entre 1 h à 48 h présentée dans la figure 21.

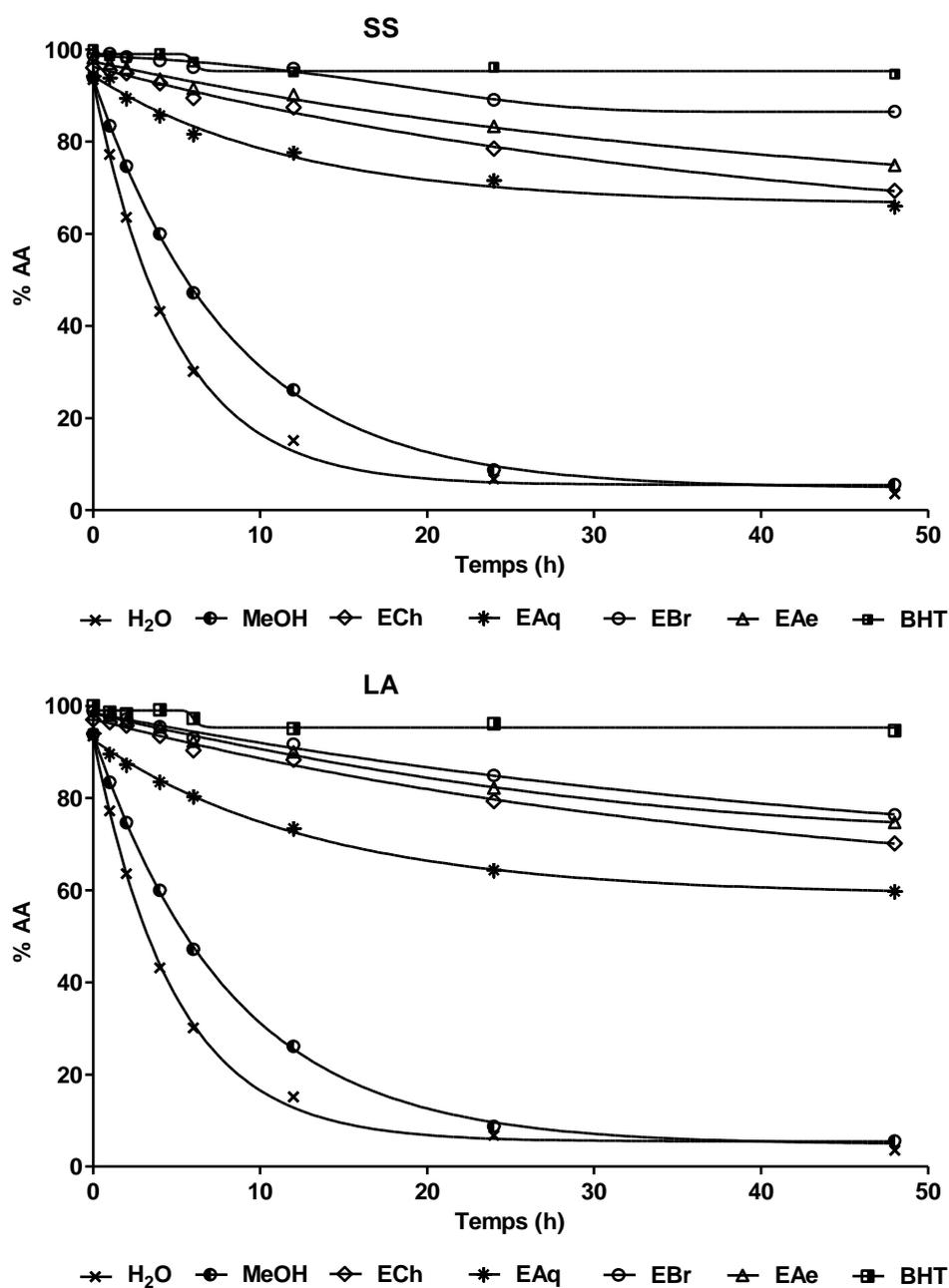


Figure 21. Cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence des extraits de SS et LA. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD, n = 3.

D'après les résultats, une activité anti-péroxydation lipidique très importante (à 24 h) a été obtenue avec tous les extraits de SS (entre 71 % et 89 %) et LA (entre 64 % et 84 %). Cette activité est peut être due à leurs capacité d'inhiber la peroxydation lipidique et/ou piéger les radicaux de l'acide linoléique (Figure 22).

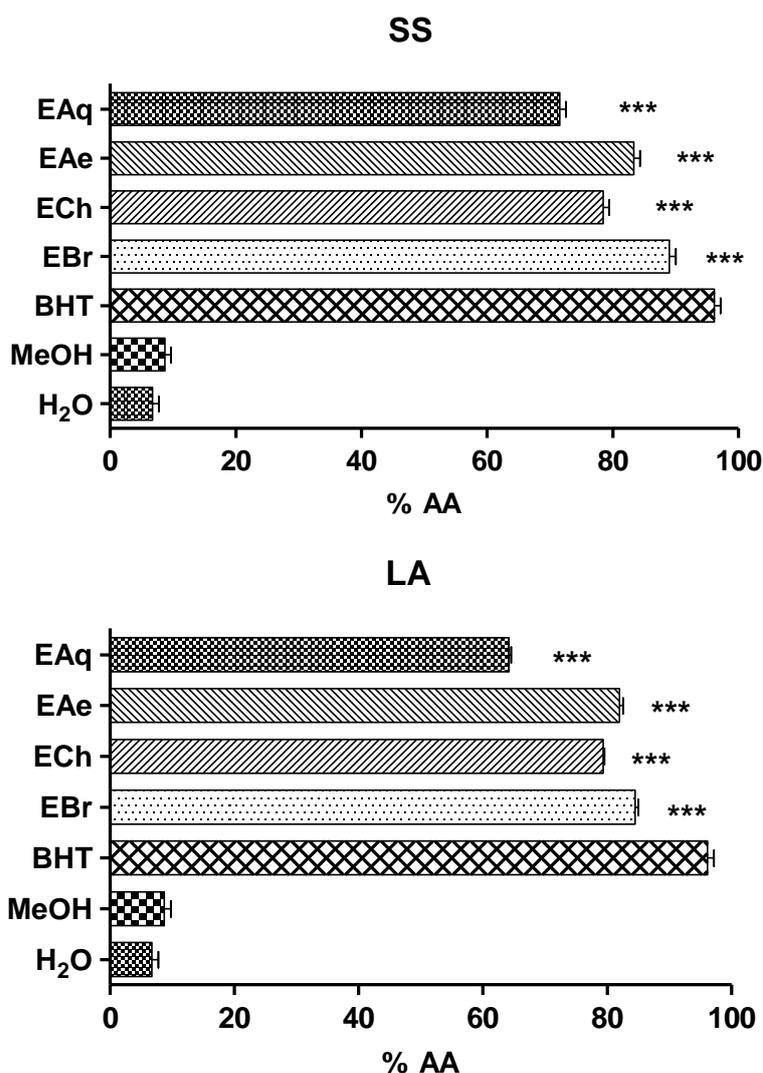


Figure 22. Activité antioxydante en présence des extraits (SS et LA) et du BHT à 24 h par le test de β -carotène / acide linoléique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3). *** : $p \leq 0.001$, comparant avec le contrôle positif BHT.

L'EBr et EAe de SS ont produits un effet important en comparant à celui du BHT (89.048 ± 1.008 % et 83.822 ± 1.006 %, respectivement), suivi par l'ECh (78.480 ± 1.009 %) et l'EAq représente l'extrait le moins actif avec une activité antioxydante égale à 71.556 ± 1.026 %

(Figure 22). Les résultats obtenus ne montrent pas une corrélation linéaire entre le pourcentage de l'activité anti-péroxydation lipidique et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes.

L'EBr et l'E Ae de LA (84.477 ± 0.534 % et 81.968 ± 0.606 %, respectivement) ont un effet très important en comparant à celui des deux autres fractions ECh et EAq qui ont donné une inhibition égale à 79.331 ± 0.257 % et 64.201 ± 0.939 %, respectivement. On constate que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs (EBr et EAe). Il existe une corrélation linéaire et significative entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-péroxydation lipidique des extraits de LA mais pas entre cette activité et la teneur en flavonoïdes.

Les flavonoïdes et autres polyphénols ont la capacité de piéger les radicaux libres et, par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides (Gao *et al.*, 2000). Ainsi, l'activité élevée de l'E Ae peut être attribuée à ses teneurs les plus élevées et la nature des flavonoïdes.

Le test du β -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, les antioxydants apolaires se concentrent à l'interface lipide-eau ce qui prévient la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène, donc ils exposent des propriétés antioxydantes importantes. Alors que les antioxydants polaires sont moins efficaces dans la protection des lipides car ils restent dans la phase aqueuse (Frankel et Meyer, 2000). D'autres chercheurs ont montré aussi que les différences de solubilité des flavonoïdes et la partition des composés entre les deux phases d'un système eau-lipidique influencent son activité (Burda et Oleszek, 2001).

SS présente une activité supérieure à celle de LA, l'inhibition de la peroxydation des lipides implique plusieurs phénomènes parmi ces phénomènes ; piégeage des radicaux et / ou la chélation des ions, c'est pour cela le test de chélation du fer ferreux a été réalisé.

III.4.5 Test de chélation des métaux (Ferrozine)

Dans cette étude, l'activité de chélation du fer ferreux a été mesurée par l'inhibition de la formation de complexe Fe^{2+} -ferrozine après l'incubation des extraits de SS et LA avec le Fe^{2+} suivant la méthode de Decker et Welch (1990) modifiée par Le et ses collaborateurs (2007).

Le Ferrozine peut quantitativement former des complexes avec Fe^{2+} . Cependant, en présence d'agents chélatants, la formation du complexe est perturbée de telle sorte que la couleur du complexe est diminuée. La mesure de la réduction de la couleur, par conséquent, permet l'estimation de l'activité de chélation de l'agent chélatant coexistante (Kaur *et al.*, 2006).

Les résultats obtenus ont montré que tous les extraits des deux plantes (SS et LA) présentent une activité de chélation dose dépendante (Figure 23).

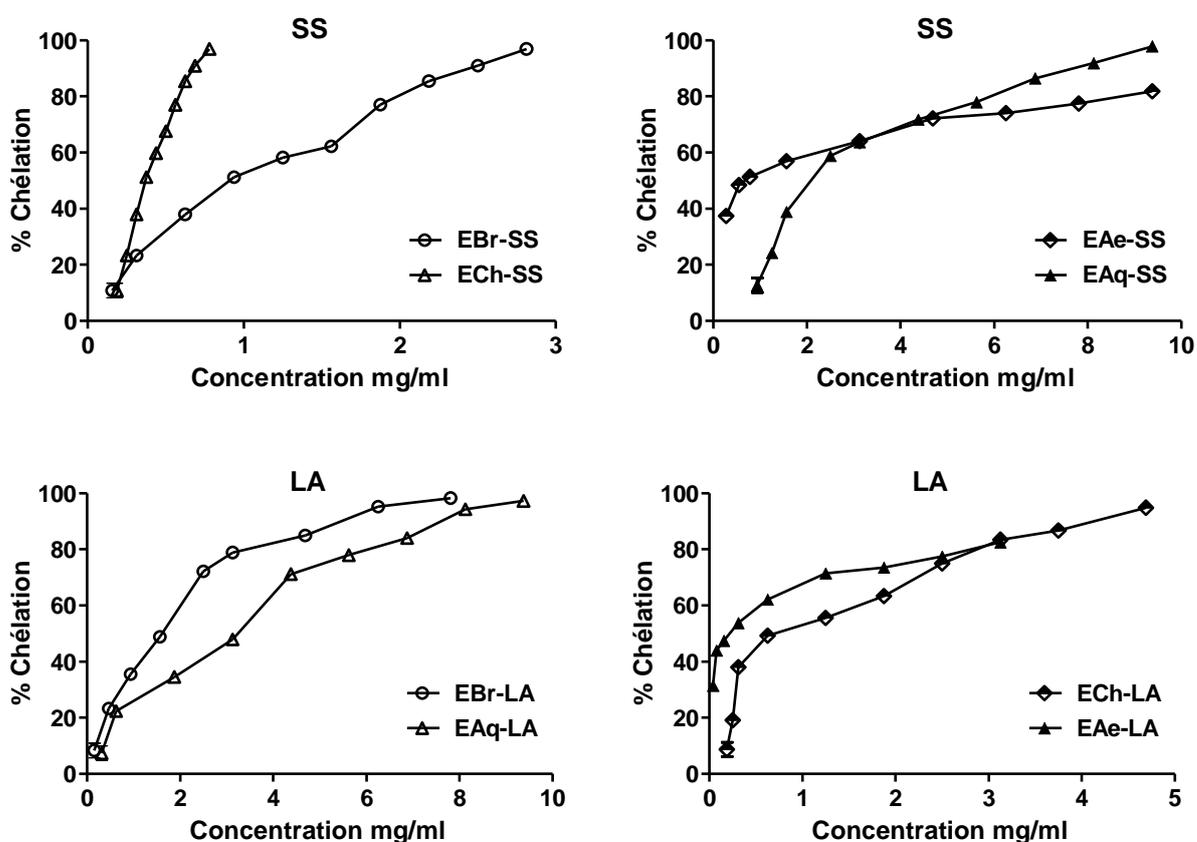


Figure 23. Chélation des ions ferreux des extraits des deux plantes (SS et LA). Les résultats exprimés en moyen \pm SD (n = 3).

Dans la nature, le Fer peut être trouvé en tant que ion ferreux ou ferrique ou d'autre, et la forme de l'ion ferrique prédominant dans les aliments. L'ions ferreux bivalents jouent un rôle important en tant que catalyseurs des processus oxydatifs, conduisant à la formation de radicaux superoxydes et d'anions hydroxyles par des réactions de Fenton. Il est rapporté que les radicaux libres générés provoqueraient la peroxydation lipidique et les dommages d'ADN. la chélation

d'ions ferreux (Fe^{2+}) peut rendre effets antioxydants importants en retardant l'oxydation catalysée par un métal (Gülçin *et al.*, 2010).

Les résultats d' EC_{50} (Figure 24), montre que les fractions de SS présente une capacité de chélation des ions de Fe^{2+} avant le ferrozine. L'extrait le plus actif c'est l'ECh avec une EC_{50} de l'ordre 0.397 ± 0.002 mg/ml suivi par l'EAE, EBr et EAQ qui présentent des EC_{50} de l'ordre 0.526 ± 0.081 mg/ml, 0.985 ± 0.012 mg/ml et 1.713 ± 0.087 mg/ml, respectivement et ils sont 1.3, 2.5 et 4.3 fois moins actifs que l'ECh.

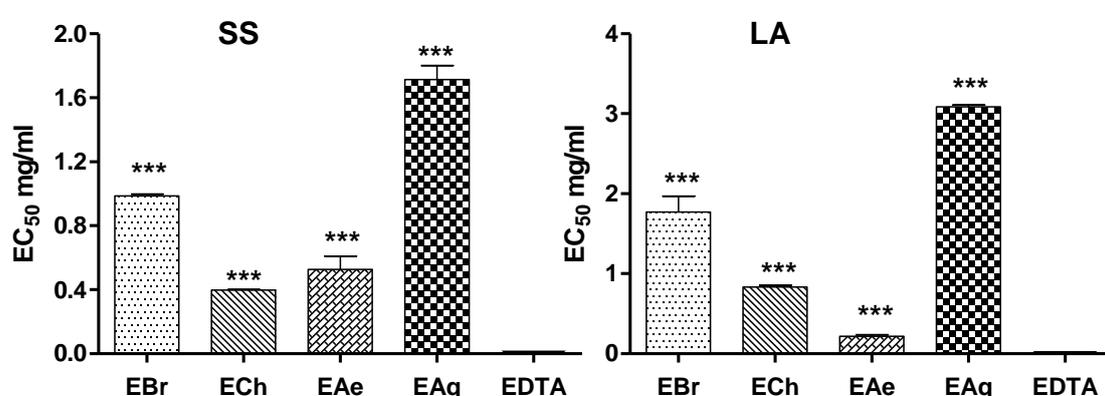


Figure 24. Concentration effective qui exprime 50% de la chélation de Fe^{2+} des fractions de SS et LA. Chaque valeur exprime la moyenne \pm SD ($n = 3$), *** : $p \leq 0.001$, en comparant avec l'EDTA.

Les résultats obtenus montrent une faible corrélation linéaire entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité chélatrice des fractions de SS ce qui donne la probabilité de l'activité des autres substances que les polyphénols, mais la corrélation linéaire entre le teneur en flavonoïdes et l'activité des extraits explique l'activité de l'ECh par la nature des flavonoïdes de cet extrait.

Pour la LA, l'EAE présentent une activité importante ($\text{EC}_{50} = 0.219 \pm 0.017$ mg/ml), suivi par l'ECh (0.836 ± 0.020 mg/ml) et la plus faible activité a été exprimée par l'EBr et l'EAQ avec une $\text{EC}_{50} = 1.775 \pm 0.195$ mg/ml et 3.085 ± 0.023 mg/ml, respectivement. Les résultats d' EC_{50} ne présente pas une linéarité entre l'activité et la teneur en polyphénols de LA mais une linéarité

significative avec la teneur en flavonoïdes donc la teneur et la nature des flavonoïdes peuvent présenter un facteur qui influence la capacité de chélation des extraits.

Les flavonoïdes peuvent également agir comme des antioxydants en chélatant les ions métalliques tel que Fe^{2+} (Engelmann *et al.*, 2005). Ainsi, des agents chélatants peuvent inactiver les ions métalliques et potentiellement inhiber les processus métal-dépendantes (Andjelkovic *et al.*, 2006).

L'EDTA a été utilisé comme témoin (Annexe 5), $\text{EC}_{50} = 5.887 \pm 0.004 \mu\text{g/ml}$, à cause de sa structure unique, il possède deux atomes d'azote et quatre atomes d'oxygène portant au fragment carboxyle, qui peut chélater les ions ferreux dans le centre et bloquer la formation d'un complexe Fe^{2+} -Ferrozine (Luo *et al.*, 2011).

L'EAE-LA et l'ECh-SS contient une teneur élevée, mais pas la plus élevée, de polyphénols donc ses fortes activités pourraient être expliquées par la nature de ses flavonoïdes. La capacité des fractions de SS et LA de piéger les radicaux libres et chélation des métaux confirme leurs grands effets comme des agents qui inhibe le blanchissement du β -carotène.

III.4.6 Test de pouvoir réducteur (FRAP)

Pour mieux évaluer l'effet antioxydant des extraits de SS et LA, et à côté de leur pouvoir antioxydant par le piégeage des RLs, leur capacité d'inhiber la peroxydation lipidique et leur pouvoir de chélation des ions de fer ferreux, un autre aspect a été visé ; le pouvoir réducteur des extraits des deux plantes par la technique FRAP. Cette technique permet de mesurer la réduction du Fe^{3+} (fer ferrique) en Fe^{2+} (fer ferreux) en présence d'un antioxydant (Ou *et al.*, 2002).

La figure 25 montre la cinétique de la réduction du TPTZ- Fe^{3+} en TPTZ- Fe^{2+} par les extraits de SS. Comme il peut être observé, l'absorbance continue à augmenter après 4 minutes de réaction et même double à 30 minutes. Par contre, la réaction de l'acide ascorbique est stable sans changement apparent dans l'absorbance après les premières quatre minutes (Figure 26).

L'ordre croissant de pouvoir réducteur des extraits de SS est comme suivant ; EAq, ECh, EAe et EBr (Annexe 6).

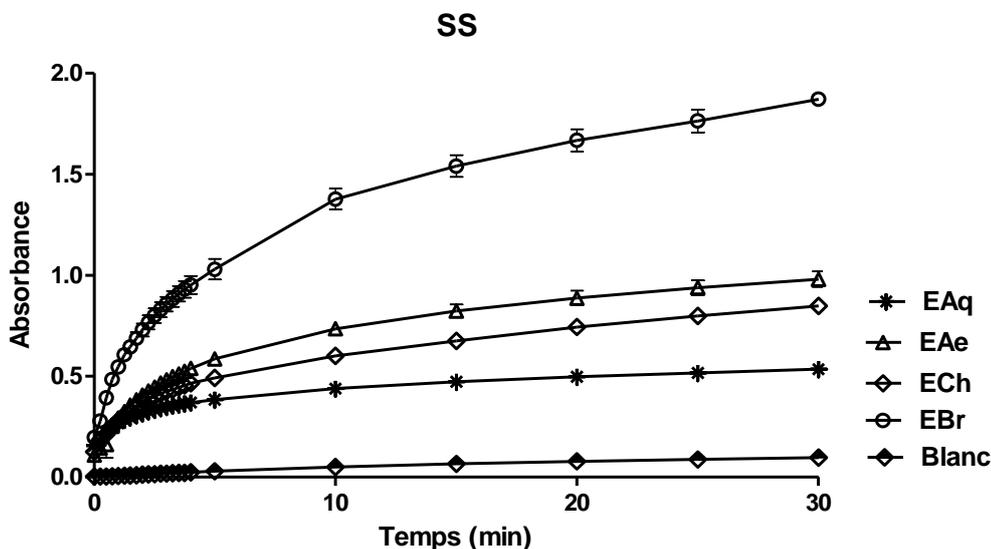


Figure 25. Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par les extraits de SS (27.75 µg/ml). Chaque valeur présente la moyenne ± SD (n=2).

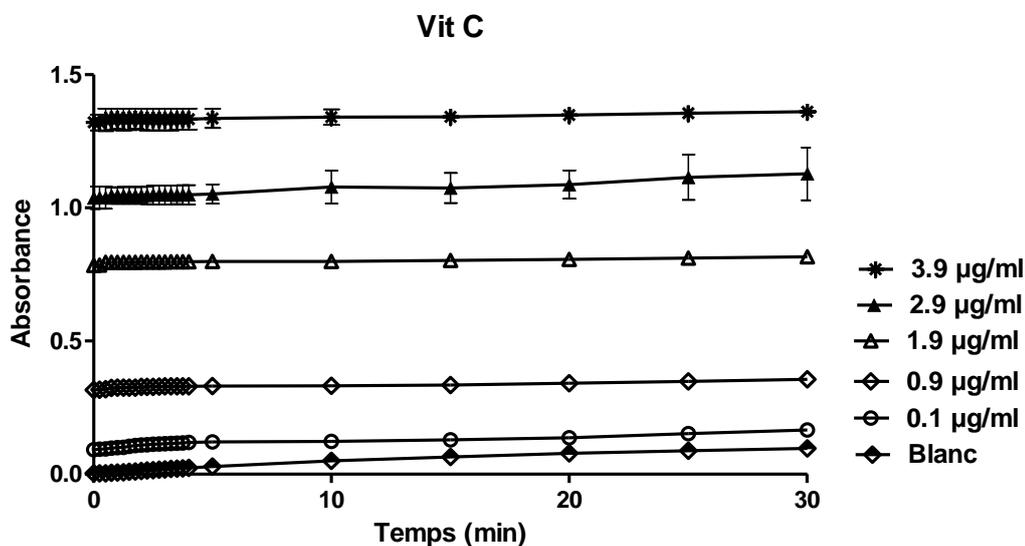


Figure 26. Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par la Vit C. Chaque valeur présente la moyenne ± SD (n=2).

Les extraits de LA présentent également des cinétiques (Figure 27) où l'absorbance continue à augmenter avec le temps de l'expérience (30 minutes). L'ordre décroissant de l'activité des extraits de LA est comme suivant ; ECh, EAq, EAe et EBr (Annexe 7).

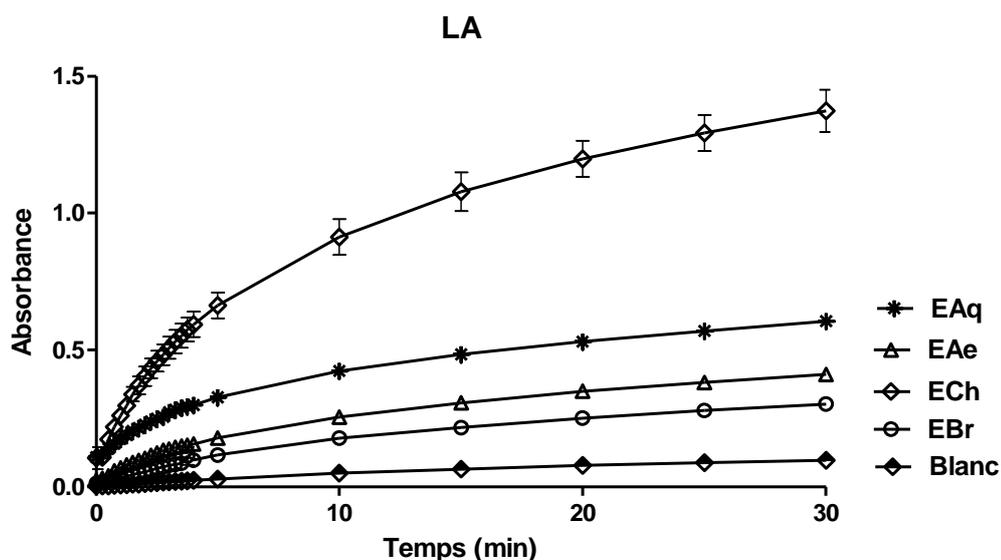


Figure 27. Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par les extraits de LA (55.55 µg/ml). Chaque valeur présente la moyenne \pm SD (n = 2).

L'activité de tous les extraits des deux plantes SS et LA est d'une manière concentration dépendante, et la relation absorbance-concentration suit un model linéaire (Tableau 23).

Tableau 23. Equation de régression des extraits de SS et LA et Vit C, et leurs coefficients de corrélation.

Extrait	Intervalle de concentration (µg/ml)	4 min		30 min	
		Equation de régression	R ²	Equation de régression	R ²
EBr-SS	1-30	y = 40.780 x + 0.017	0.996	y = 71.840 x + 0.075	0.997
ECh-SS	7-55	y = 15.944 x + 0.008	0.995	y = 24.210 x + 0.125	0.992
EAe-SS	7-55	y = 14.870 x + 0.055	0.979	y = 25.030 x + 0.165	0.981
EAq-SS	2-70	y = 10.680 x + 0.098	0.978	y = 13.080 x + 0.195	0.983
EBr-LA	55-665	y = 0.548 x + 0.063	0.979	y = 0.906 x + 0.235	0.993
ECh-LA	7-85	y = 9.070 x + 0.116	0.992	y = 18.290 x + 0.359	0.993
EAe-LA	55-555	y = 1.201 x + 0.105	0.996	y = 2.237 x + 0.320	0.993
EAq-LA	30-445	y = 0.369 x + 0.265	0.972	y = 0.369 x + 0.478	0.972
Vit C	0.1-4	y = 335.0 x + 0.057	0.988	y = 336.7 x + 0.093	0.987

Les équations sont calculées avec cinq à six concentrations différentes extrait et suivent toutes un modèle de régression linéaire. R² est le coefficient de corrélation. y = absorbance, x = concentration (µg/ml).

Dans la méthode originale de Benzie et Strain (1996), test des liquides biologiques tel que le plasma, la réaction de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ est conduite pendant 4 minutes

puisque la réaction se stabilise. Pulido *et al.* (2000) ont observé que la réaction de réduction ne se stabilise pas au cours des 4 minutes en utilisant les polyphénols, et de ce fait ils ont prolongé le temps de la réaction à 30 minutes tout en gardant la lecture à 4 minutes à des fins comparatives.

Le paramètre EC1 (concentration de l'antioxydant ayant un pouvoir réducteur du TPTZ équivalent à celui de 1 mM du FeSO₄), proposé par Pulido *et al.* (2000) a été calculé pour les extraits de SS et l'acide ascorbique à 4 et à 30 minutes (Tableau 24). L'EC1 est inversement proportionnel au pouvoir réducteur. Le pouvoir réducteur (TAP) est également exprimé en micromoles d'équivalents du FeSO₄ par milligramme d'extrait ou de standard (µmole d'équivalents FeSO₄/mg extrait) (Tableau 24).

Tableau 24. Valeurs d'EC1 et TAP de SS à 4 min et 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP.

Extrait	EC1 (µg/ml)		TAP (µmole FeSO ₄ /mg d'E)	
	4 min	30 min	4 min	30 min
EBr	17.289 ± 1.128**	9.085 ± 0.476 <i>ns</i>	57.963 ± 3.784***	110.214 ± 5.782***
ECh	42.274 ± 0.678***	24.079 ± 0.261***	23.658 ± 0.379***	41.530 ± 0.450***
EAc	43.224 ± 0.784***	22.092 ± 0.879**	23.138 ± 0.419***	45.299 ± 1.802***
EAq	53.280 ± 4.165***	34.635 ± 5.888***	18.8250 ± 1.471***	29.295 ± 4.980***
Vit C	1.920 ± 0.046	0.183 ± 0.003	520.733 ± 12.601	544.360 ± 10.114

Chaque valeur présente la moyenne ± SD (n=3). La comparaison est réalisé contre le Vit C, *ns* : non significative, ** : $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

Les extraits de SS se sont des "antioxydants à effet prolongé", dont la réduction continue même après trente minutes (temps de la réaction) contrairement aux standards (acide ascorbique) "à action rapide" dont l'absorbance n'augmente pas significativement ($p > 0.05$) après les premières quatre minutes de la réaction.

Parmi les extraits de SS, l'EBr est le plus important comme réducteur, l'ECh et l'EAc sont des fractions assez complexes dans leur composition et peuvent contenir différents composés agissant indépendamment ou en synergie. Ces deux extraits forment une bonne source d'antioxydants. La capacité antioxydante de l'EAq estimée par la technique FRAP est la plus faible.

La réaction chimique dans la technique FRAP implique un transfert d'électrons d'un donneur (antioxydant) vers le TPTZ-Fe³⁺ et la réduction de ce dernier en TPTZ-Fe²⁺. Benzie et ses collaborateurs (1996) ont considéré l'antioxydant comme toute molécule capable de réduire les espèces oxydantes qui peuvent endommager les structures biologiques. Ces auteurs ont donc interprétée l'activité antioxydante comme la capacité réductrice.

Cependant, le pouvoir antioxydant d'un antioxydant n'est pas nécessairement égal à sa capacité de réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺, le glutathion par exemple ne réagit pas (Cao et Prior, 1998) ou réagit très lentement dans cet essai parce que son potentiel de réduction est inférieur à celui du couple Fe³⁺/Fe²⁺ (Ou *et al.*, 2002).

Les résultats d'EC1 et TAP de LA (Tableau 25), montre que l'ECh est le plus active suivi par l'E Ae, l'activité de l'ECh et l'E Ae peut être due à la nature des flavonoïdes aglycone et glycosylé. Les EBr et EAq présente une faible activité en comparant avec les autre extraits.

Chen *et al.* (2011), ont montré que la fraction des polysaccharides purifiés d'*Acauthopanax santicoso* a une activité réducteur très importante en utilisant le test de FRAP. Autre étude, confirme que le pouvoire réducteur dépend sur la concentration en polyphénols totaux (Paixao *et al.*, 2007).

Tableau 25. Valeurs d'EC1 et TAP de LA à 4 min et 30 min de réaction en utilisant le test de FRAP.

Extrait	EC1 (mg/ml)		TAP (µmole FeSO ₄ /mg d'E)	
	4 min	30 min	4 min	30 min
EBr	11.142 ± 0.018**	0.519 ± 0.001 <i>ns</i>	0.870 ± 0.006***	1.926 ± 0.004***
ECh	0.061 ± 0.004***	0.018 ± 0.002***	16.136 ± 0.130***	54.510 ± 8.082***
E Ae	0.486 ± 0.001***	0.172 ± 0.001**	2.054 ± 0.007***	5.793 ± 1.802***
EAq	1.088 ± 0.087***	0.646 ± 0.050***	0.921 ± 0.074***	1.551 ± 0.120***
Vit C	1.920 ± 0.046	0.183 ± 0.003	520.733 ± 12.601	544.360 ± 10.114

Chaque valeur présente la moyenne ± SD (n=3). La comparaison est réalisé contre le Vit C ; *ns* : non significatif, ** : $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

III.4.7 Test d'activité anti-hémolytique

La capacité anti-hémolytique des fractions a été mesurée en suivant le protocole décrit par Takebayashi *et al.* (2010), ce test consiste à soumettre l'échantillon du sang total à une agression radicalaire. Tous les systèmes enzymatiques et chimiques de l'échantillon se mobilisent pour protéger l'intégrité des érythrocytes afin de résister à cette agression, jusqu'à ce que la membrane cellulaire soit modifiée au point de libérer leurs contenu cellulaires.

La cinétique d'hémolyse obtenue pour les fractions de SS (Figure 28), montre que l'inhibition de l'hémolyse a été remarqué pour toutes les fractions (EBr, ECh, EAe et EAq) d'une manière dose dépendante.

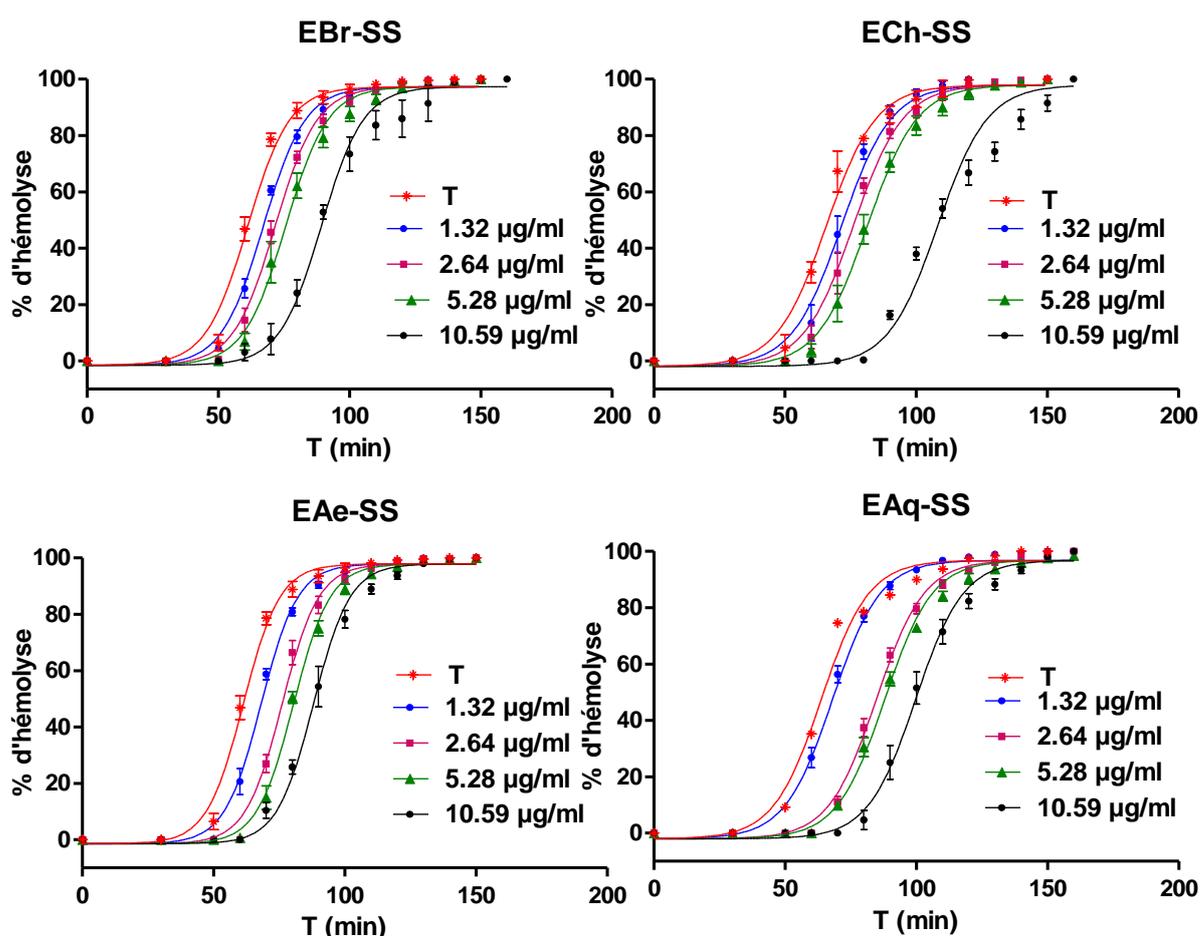


Figure 28. Cinétique d'hémolyse des globules rouges en absence (T) et en présence des extraits de SS. Chaque valeur représente la moyenne de 6 essais \pm SEM.

L'hémolyse est la destruction ou l'enlèvement des globules rouges dans la circulation avant leur durée de vie normale (120 jours). Il existe deux mécanismes d'hémolyse : l'hémolyse extravasculaire est l'élimination et la destruction des globules rouges avec des altérations de la membrane par les macrophages, de la rate et du foie. L'hémolyse intravasculaire, qui est la destruction des globules rouges dans la circulation avec la libération du contenu des cellules dans le plasma, des agents infectieux peuvent provoquer une dégradation de la membrane et destruction directe des cellules (Dhaliwal *et al.*, 2004), parmi ces agents c'est les radicaux libres (Liu *et al.*, 2002).

Les résultats de LA présente une forte activité anti-hémolytique (Figure 29), cette activité est dose dépendante. Le standard utilisé c'est le Vit C, il présente une activité d'une manière dose dépendante, avec des concentrations de 1.32 à 48.87 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 30).

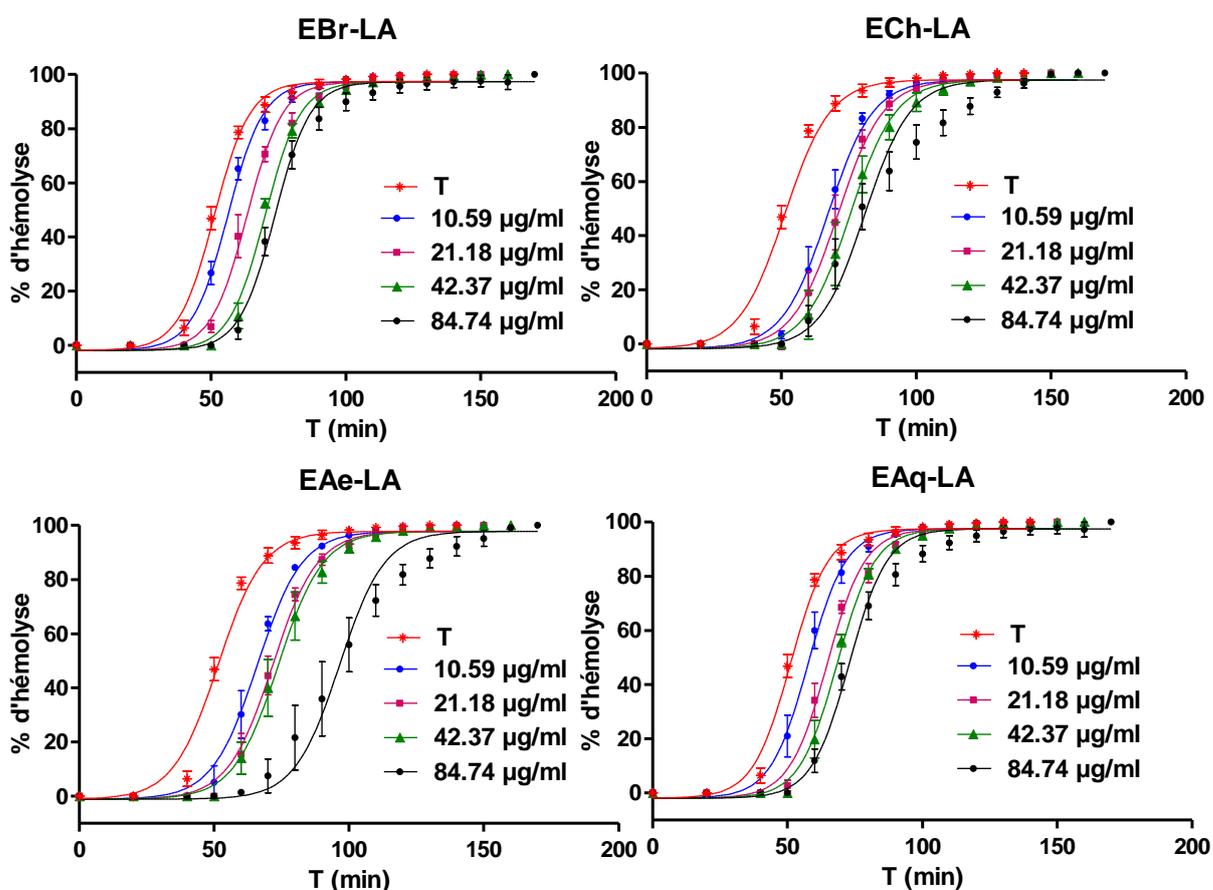


Figure 29. Cinétique d'hémolyse des globules rouges en absence (T) et en présence des extraits de LA. Chaque valeur représente la moyenne de 6 essais \pm SEM.

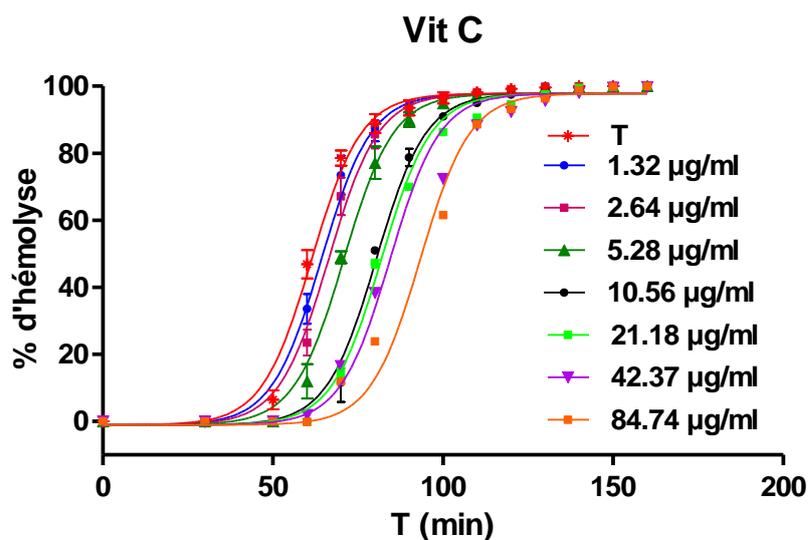


Figure 30. Cinétique d'hémolyse des globules rouges en absence (T) et en présence du Vit C. Chaque valeur présente la moyenne de 6 essais \pm SEM.

Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydant. En raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en l'hémoglobine, ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs (Arbos *et al.*, 2008 ; Çimen, 2008).

Le *t*-BHP est un oxydant de modèle bien caractérisé utilisé pour l'étude *in vitro* de l'oxydation de la membrane. Dans l'érythrocyte, le *t*-BHP a été rapporté pour augmenter la perméabilité membranaire aux sucres de faible poids moléculaire et causer la déformabilité cellulaire (Liu *et al.*, 2002).

La décomposition thermique du *t*-BHP produit un RL qui attaque les lipides polyinsaturés dans la membrane ce qui provoque la peroxydation lipidique (Dwight et Hendry, 1995). Il existe plusieurs antioxydants tels que la vitamine E, la vitamine C et les flavonoïdes qui inhibent l'hémolyse (Tabart *et al.*, 2009).

À partir des cinétiques d'hémolyses obtenues, les valeurs d' HT_{50} ont été calculé pour chaque fraction, le temps de demi-hémolyse de témoin (absence de l'extrait) est 50.83 ± 0.82 min, les résultats d' HT_{50} des fractions de SS sont mentionné dans le tableau suivant :

Tableau 26. Temps de demi-hémolyse (HT₅₀ min) pour les fractions de SS.

Extrait	1.32 µg/ml	2.64 µg/ml	5.28 µg/ml	10.56 µg/ml
EBr-SS	67.29 ± 0.43***	71.64 ± 01.14***	75.94 ± 1.97***	92.65 ± 3.47***
ECh-SS	71.52 ± 1.55***	75.59 ± 1.61***	81.15 ± 2.05***	108.80 ± 3.27***
E Ae-SS	67.90 ± 0.69***	76.16 ± 1.09***	80.42 ± 0.87***	86.40 ± 0.69***
EAq-SS	68.13 ± 1.09***	86.28 ± 1.07***	87.62 ± 1.24***	99.54 ± 2.44***
Vit C	54.15 ± 01.46 ns	56.28 ± 0.78***	60.65 ± 0.53***	69.40 ± 0.42***

Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n = 6). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle négative (T) ; *** : $p \leq 0.001$, ns : non significatif.

Toutes les fractions de SS, dans toutes les doses, ont provoqué un retardement d'hémolyse par rapport au témoin, et cette augmentation d'HT₅₀ est statistiquement significative. Cette activité a été déjà présentée par un décalage d'une manière considérable des sigmoïdes d'hémolyse vers la droite et donc l'augmentation de l'HT₅₀ (voire la figure 28). Tous les extraits de SS présentent une activité anti-hémolytique supérieure à celle du Vit C et l'ECh présente la fraction la plus active et cette activité peut être due à sa capacité antioxydante. Par contre, LA présente une activité inférieure à celle de Vit C et des extraits de LA (Tableau 27).

Tableau 27. Temps de demi-hémolyse (HT₅₀ min) pour les fractions de LA.

Extrait	10.59 µg/ml	21.18 µg/ml	42.37 µg/ml	84.74 µg/ml
EBr-LA	56.65 ± 0.06**	63.68 ± 1.74***	69.68 ± 0.53***	73.56 ± 1.45***
ECh-LA	67.11 ± 2.19***	70.51 ± 2.48***	78.93 ± 1.13***	85.35 ± 3.21***
E Ae-LA	65.28 ± 1.75*	70.98 ± 1.78***	79.43 ± 3.04***	94.61 ± 5.39***
EAq-LA	58.00 ± 0.83**	64.81 ± 1.34***	68.26 ± 0.76***	72.83 ± 1.47***
Vit C	69.40 ± 0.42***	81.70 ± 0.39***	86.48 ± 0.01***	92.72 ± 0.18***

Les valeurs sont les moyennes ± SEM (n = 6). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle négative (T) ; * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$.

Les résultats des courbes de cinétiques d'hémolyse et d'HT₅₀ ont montré que l'hémolyse a été décalée même en l'absence totale des antioxydants exogènes (Témoin). Cela est dû à des antioxydants endogènes du plasma et des érythrocytes (la catalase, la SOD et la glutathion), ces antioxydants peut retarder l'initiation et / ou la propagation de l'attaque radicalaire en inhibant la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans la membrane des érythrocytes. Après

l'épuisement de tous les antioxydants endogènes, l'hémolyse est survenue rapidement. Le point entre la phase de latence (antioxydants endogènes) et la restauration de la courbe d'hémolyse correspond au temps de latence de l'hémolyse (t_{lag} : *lag time*) qui peut être utilisé pour évaluer l'activité antioxydante (Liu *et al.*, 2002).

En absence d'antioxydants exogènes (les extraits ou la Vit C), le temps de latence des globules rouges avec le *t*-BHP a été trouvé environ de 30 min (t_{lag} de témoin). L'addition d'un antioxydant standard (Vit C) à prolonger le temps de latence d'hémolyse de 5 à 35 min avec des concentrations de 1.32 $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à 84.74 $\mu\text{g/ml}$, mais l'addition des extraits de SS prolonge le t_{lag} jusqu'à 45 min dans le cas d'ECh (10.56 $\mu\text{g/ml}$), cette plante présente une activité anti-hémolytique très importante supérieure à celle de Vit C, les résultats de t_{lag} ont été mentionnés dans le tableau 28.

Tableau 28. Temps de latence (t_{lag} en min) des fractions de SS, LA et Vit C.

	Concentration $\mu\text{g/ml}$					Concentration $\mu\text{g/ml}$			
	SS	1.32	2.64	5.28		10.59	LA	10.59	21.18
EBr-SS	40	50	55	65	EBr-LA	35	40	45	50
ECh-SS	50	55	60	75	ECh-LA	35	45	50	55
EAe-SS	45	50	60	65	EAe-LA	35	40	45	65
EAq-SS	40	45	55	65	EAq-LA	35	40	45	50
Vit C	35	40	45	50	Vit C	50	55	60	65

Tous les fractions de LA, à la plus faible concentration, prolongent le t_{lag} 5 min seulement mais en augmentant la concentration le t_{lag} va se prolonger variablement entre les fractions, où il peut prolonger jusqu'à 35 min dans le cas de l'EAe (84.74 $\mu\text{g/ml}$).

Le temps de latence est expliqué par l'activité des antioxydants endogène pour le témoin, mais les résultats des extraits c'est le temps d'activité des antioxydants endogène et exogène (extraits), donc c'est peut être l'activité en synergie, des antioxydants endogènes et les extraits, pour prolonger l'initiation de l'hémolyse et l'activité des extraits se présente au cours de la courbe d'hémolyse (après l'initiation).

Pour comparer entre les activités des extraits des deux plantes ΔT (min) a été calculé, HT_{50} (extrait) - HT_{50} (témoin). Les résultats obtenue pour SS (Tableau 29), montre que le prolongement de phase de latence ne signifié pas l'augmentation de l'activité car il existe des fractions qui prolongent la phase de latence mais juste après cette phase l'hémolyse aura lieu rapidement et vis vers sa, par exemple l'EAq de SS leur t_{lag} est inférieur à celle d'EAe mais ce dernier présente une activité anti-hémolytique inférieurs à celle d'EAq (ΔT EAq > ΔT EAe).

Tableau 29. ΔT des fractions de SS et Vit C.

Extrait	1.32 $\mu\text{g/ml}$	2.64 $\mu\text{g/ml}$	5.28 $\mu\text{g/ml}$	10.56 $\mu\text{g/ml}$
EBr-SS	16.46 \pm 0.43***	20.81 \pm 1.14***	24.72 \pm 1.97***	41.83 \pm 3.47***
ECh-SS	20.69 \pm 1.55***	24.76 \pm 1.61***	30.32 \pm 2.05***	57.95 \pm 3.27***
EAe-SS	17.07 \pm 0.69***	25.34 \pm 1.09***	29.60 \pm 0.87***	35.66 \pm 0.69***
EAq-SS	17.31 \pm 1.09***	35.45 \pm 1.07***	36.80 \pm 1.24***	48.71 \pm 2.44***
Vit C	3.32 \pm 0.46	5.45 \pm 0.78	9.82 \pm 0.53	18.58 \pm 0.42

Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 6). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au Vit C ; *** : $p \leq 0.001$.

LA présente une activité anti-hémolytique par fois statistiquement non significative en comparant avec le Vit C (Tableau 30). La relation entre ΔT et les concentrations d'extraits montre une bonne linéarité pour tous les extraits de SS et de LA.

Tableau 30. ΔT des fractions de LA et Vit C.

Extrait	10.59 $\mu\text{g/ml}$	21.18 $\mu\text{g/ml}$	42.37 $\mu\text{g/ml}$	84.74 $\mu\text{g/ml}$
EBr-LA	5.82 \pm 0.06***	12.54 \pm 1.74***	18.85 \pm 0.53***	22.73 \pm 1.45***
ECh-LA	16.28 \pm 2.19 ns	19.68 \pm 2.48***	28.10 \pm 1.13**	34.52 \pm 3.21 ns
EAe-LA	14.45 \pm 1.75 ns	20.16 \pm 1.78***	28.60 \pm 3.04*	43.79 \pm 5.39 ns
EAq-LA	7.17 \pm 0.83***	13.98 \pm 1.34***	17.44 \pm 0.76***	22.01 \pm 1.47***
Vit C	18.58 \pm 0.42	30.87 \pm 0.39	35.65 \pm 0.01***	41.89 \pm 0.18

Les valeurs sont les moyennes \pm SEM (n = 6). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au Vit C ; * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$, ns : non significatif.

Selon la littérature, les extraits des plantes médicinale peuvent présentées un effet hémolytique, ce dernier est attribué à la présence des saponosides. Ces composés, connus depuis très longtemps pour leur propriété tensioactive (solution moussante dans l'eau) ou encore leur

capacité à lyser les globules rouges, sont des métabolites secondaires de nature amphiphile. Cette propriété lytique a conduit à la mise en place de tests hémolytiques permettant la détection de saponines dans les drogues ou les extraits de plantes (Sparg *et al.*, 2004). De même, elle est actuellement utilisée dans les laboratoires d'analyses hématologiques afin de détruire les globules rouges du sang et effectuer les numérations leucocytaires (Chwalek, 2004).

III.5 Test de toxicité aiguë (DL₅₀)

Les résultats de la DL₅₀ chez les souris traités par voie intrapéritonéale des EBr de SS et LA montrent l'effet toxique des deux fractions (Annexe 8). La DL₅₀ de SS a été estimée de $379.10 \pm 58,30$ mg/Kg comme montré le tableau 31.

Tableau 31. Détermination de la DL₅₀ d'EBr-SS par l'analyse en suivant la méthode de probits -méthode de moindres carrés (distribution normale).

Dose (mg/Kg)	Nombre des souris	% de morts par SS
0	10	0
100	10	10
200	10	30
300	10	40
400	10	50

SS présente une toxicité supérieure à celle de LA car la DL₅₀ de LA est de 636.26 ± 70.72 mg/Kg (Tableau 32).

Tableau 32. Détermination de la DL₅₀ d'EBr-LA par l'analyse en suivant la méthode de probits - méthode de moindres carrés (distribution normale).

Dose (mg/Kg)	Nombre des souris	% de morts par LA
0	10	0
300	10	10
400	10	30
600	10	40
700	10	60

La mort survient à partir de 24 h et 14 jours après, les animaux survivants ont retrouvé un comportement normal comparable à celui des témoins. Cependant, jusqu'à la dose 300 mg/Kg de traitement aigue.

III.6 Test d'activité antioxydante *in vivo*

III.6.1 Test d'activité anti-hémolytique *in vivo*

Les résultats de cinétique d'hémolyse montrent que l'injection intrapéritonéal des deux plantes SS, LA et de Vit C pendant 21 jours entraîne une amélioration et une augmentation du statut antioxydant et protège les érythrocytes contre l'attaque radicalaire de *t*-BHP (Figure 31).

L'activité de LA a été trouvée supérieure à celle de SS et cette activité est peut être due à leurs richesse en polyphénols en comparant avec SS.

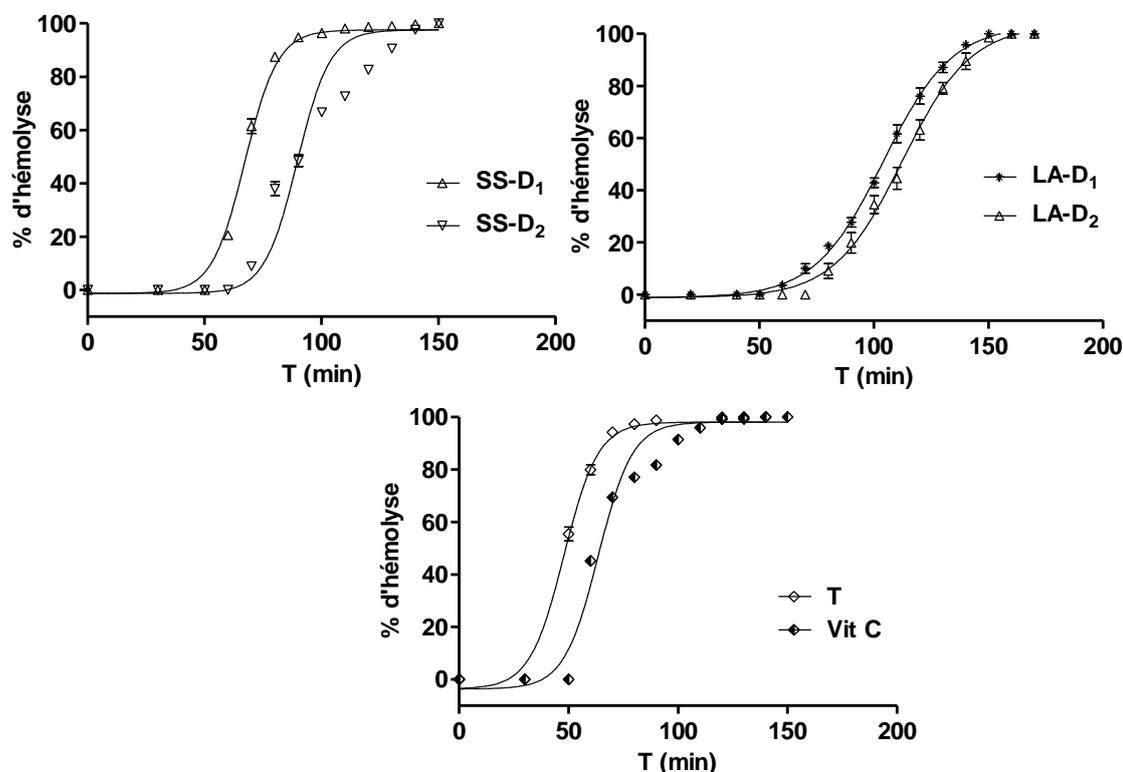


Figure 31. Cinétique de l'hémolyse provoquée par le *t*-BHP des groupes traités par l'EBr-SS ; D₁ et D₂ (25 et 50 mg/Kg), l'EBr-LA ; D₁ et D₂ (50 et 100 mg/Kg), le groupe non traité (T) et le groupe traité avec le Vit C (50 mg/Kg).

Zhang *et al.*, (1997), ont examiné les polyphénols de thé vert *in vitro* et *in vivo*, et ils ont trouvé des résultats qui confirment l'activité anti-hémolytique des polyphénols. L'injection des deux EBr de SS et LA augmente la résistance des globules rouges et / ou la capacité antioxydante de sang. Par contre, d'autres études ont montré l'activité hémolytique de quelques fractions d'une injection des plantes médicinales largement utilisées (Xue-Sai-Tong) (De-Quiang *et al.*, 2010).

Pour le groupe qui reçoit uniquement l'eau physiologique (Témoin : T), il présente un HT_{50} de 48.81 ± 1.65 min, après l'addition de *t*-BHP, donc cette activité anti-hémolytique présente la capacité des antioxydants endogènes (enzymatique ou non enzymatique). L'injection de Vit C (50 mg/Kg) prolonge la phase de latence ($t_{lag} = 35$ min) avec un HT_{50} de 60.85 ± 0.59 min, mais la Vit C présente l' HT_{50} le plus faible en comparant avec les groupes de tests des deux plantes (Figure 32).

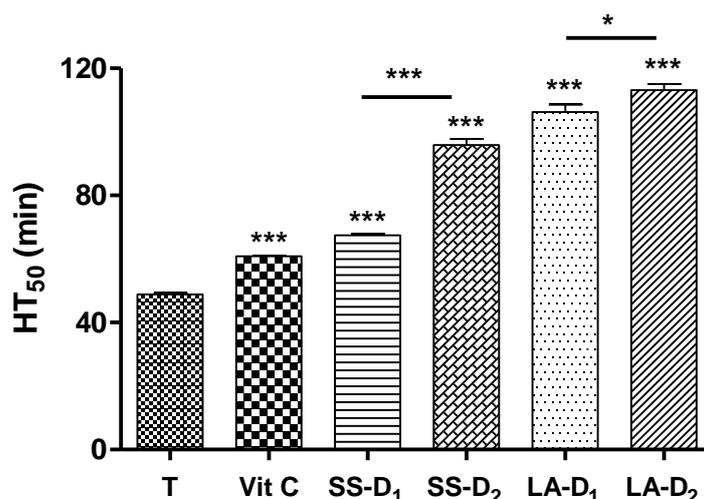


Figure 32. Temps de demi-hémolyse (HT_{50} min) de sang des groupes ; non traité (T), traité avec Vit C (50 mg/Kg), traité avec l'EBr-SS (D_1 : 25 et D_2 : 50 mg/Kg) et traité avec l'EBr-LA (D_1 : 50 mg/Kg et D_2 : 100 mg/Kg), Les valeurs présentent les moyennes \pm SEM ($n = 8$ à 10). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle négative (T) ; * : $p \leq 0.05$, *** : $p \leq 0.001$.

L'EBr-SS inhibe l'hémolyse d'une manière dose dépendante où D_2 c'est la dose la plus active en comparant avec D_1 (95.85 ± 1.84 et 67.41 ± 0.50 min, respectivement). L'injection de deux doses de LA ; D_1 (50 mg/Kg) et D_2 (100 mg/Kg) conduit aussi à l'augmentation des valeurs

d'HT₅₀ d'une manière dose dépendante avec les valeurs suivants ; 106.3 ± 2.34 min et 113.1 ± 1.94 min, respectivement.

L'activité anti-hémolytique *in vitro* des deux plantes SS et LA a été démontré *in vivo* et reste supérieure à celle de Vit C. Mais l'EBr-SS présente une activité supérieure à celle d'EBr-LA *in vitro*, a diminué son activité *in vivo*, cela est peut être expliqué par la métabolisation de l'extraits injecté ce qui conduit à la diminution de son activité.

Les temps de latence (t_{lag}) des groupes traités, confirme les résultats de l'HT₅₀. L'injection d'EBr-SS prolonge cette phase pour les deux dose D₁ et D₂ (40 et 70 min, respectivement) et le t_{lag} de D₁ et D₂ de LA est 60 min et 65 min, respectivement. Donc l'augmentation de concentration de SS et LA dans le sang conduit l'inhibition de l'hémolyse efficacement.

Le ΔT a été calculé entre les groupes traités et le groupe témoin (Figure 33), a montré que les deux doses de LA (D₁ et D₂) présentes les ΔT les plus élevé (57.48 ± 2.34 min et 64.32 ± 1.92 min, respectivement) suivi par D₁ et D₂ de SS avec 18.60 ± 0.50 min et 47.04 ± 1.84 min, respectivement.

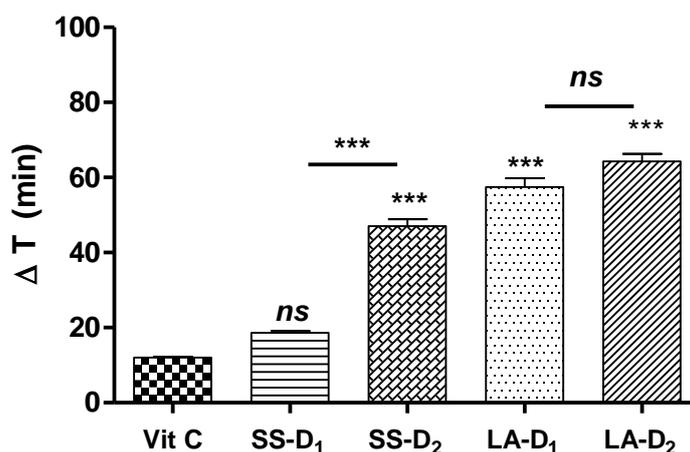


Figure 33. ΔT (min) des groupes ; traité avec Vit C (50 mg/Kg), traité avec l'EBr-SS (D₁ : 25 et D₂ : 50 mg/Kg) et traité avec l'EBr-SS (D₁ : 50 mg/Kg et D₂ : 100 mg/Kg). Les valeurs présentent les moyennes \pm SEM (n = 8 à 10). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle positif (Vit C) ; ns : non significatif, *** : $p \leq 0.001$.

Cette activité est dose dépendante mais statistiquement non significatif pour les deux doses de LA et très significatif pour les deux doses de SS. Les deux EBr des deux plantes présente une activité *in vivo* supérieur à celle de Vit C (12.04 ± 0.24 min).

Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse (% IH) a été calculé selon la formule suivante ;

$$\text{HT}_{50}(\text{test}) - \text{HT}_{50}(\text{T}) / \text{HT}_{50}(\text{T})$$

où le groupe témoin a présenté 0 % d'inhibition de l'hémolyse. Le résultat obtenu (Figure 34) montre que le groupe traité par l'EBr de SS-D₁ présente l'activité inhibitrice de l'hémolyse la plus faible (38.10 ± 1.03 %).

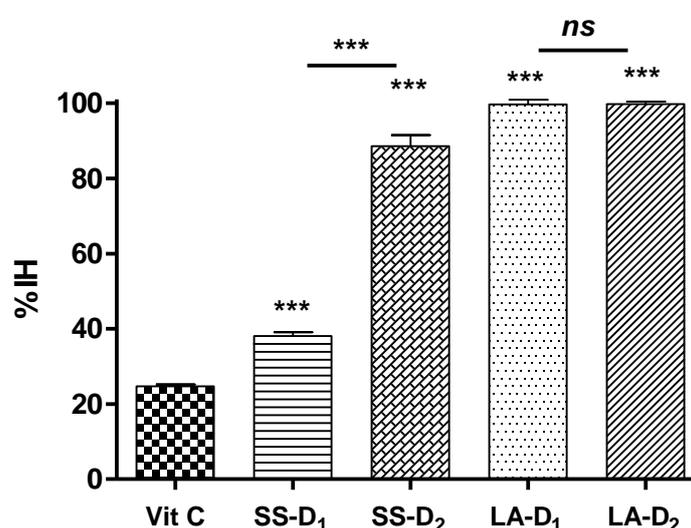


Figure 34. % IH des groupes ; traité avec Vit C (50 mg/Kg), traité avec l'EBr-SS (D₁ : 25 et D₂ : 50 mg/Kg) et traité avec l'EBr-LA (D₁ : 50 mg/Kg et D₂ : 100 mg/Kg). Les valeurs présentent les moyennes \pm SEM (n = 8 à 10). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle positif (Vit C) ; *ns* : non significatif, *** : $p \leq 0.001$.

III.6.2 Test de capacité antioxydante plasmatique (DPPH *in vivo*)

Le plasma a été récupéré à partir des souris des groupes traités, il a été utilisé pour déterminer la capacité anti-oxydante plasmatique (CAP) pour chaque groupe. Les résultats montre que l'administration des EBr de SS et LA augmente la capacité antioxydante plasmatique. Les % CAP déduit que la capacité de plasma de groupe témoin est 22.88 ± 0.75 %, l'administration de 50 mg/Kg de Vit C augmente la capacité plasmatique jusqu'à 44.33 ± 1.36

%. L'administration d'EBr-SS (D₁ et D₂) augmente aussi la CAP et d'une manière dose dépendante (36.41 ± 0.91 % et 45.36 ± 0.40 %, respectivement). Pour les groupe traité avec les deux doses (D₁ et D₂) de LA présentent une très grande capacité de piégeage de radicale DPPH, 45.61 ± 0.19 % et 50.29 ± 0.50 %, respectivement (Figure 35).

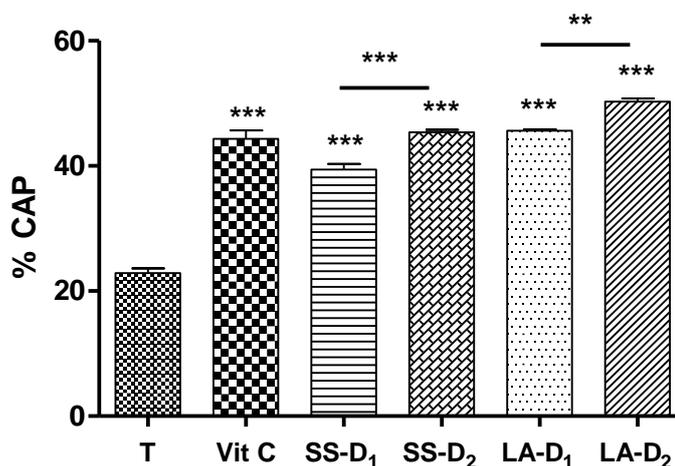


Figure 35. % CAP des groupes ; non traité (T), traité avec Vit C (50 mg/Kg), traité avec l'EBr-SS (D₁ : 25 et D₂ : 50 mg/Kg) et traité avec l'EBr-LA (D₁ : 50 mg/Kg et D₂ : 100 mg/Kg). Les valeurs présentent les moyennes \pm SEM (n = 8 à 10). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle négatif (T) ; *** : $p \leq 0.001$.

L'administration des deux plantes conduit à l'augmentation de capacité anti-oxydante sérique mais la CAP des groupes traités par LA est supérieure à celle des groupes traité par SS, ce qui confirme la capacité anti-hémolytique *in vivo* de sang totale des groupes traités avec LA.

La CAP comprend l'action des composés antioxydants de l'alimentation et d'autres composés endogènes, et en même temps est modulé par la production des RLs. Les antioxydants non enzymatiques endogènes tels que l'albumine, la bilirubine, l'acide urique et la glutathion constituent une contribution pertinente aux défenses antioxydants (Pincemail *et al.*, 2007).

La CAP totale est dû aux composés antioxydants présents dans le plasma et à leur effet synergique susceptible d'entre eux. Par exemple, les molécules qui n'ont pas directement une activité antioxydants, tels que le lycopène, peut néanmoins maintenir d'autres antioxydants sous

forme réduite, ainsi assurer indirectement une protection accrue contre le stress oxydant (Fernandez-panchon *et al.*, 2008), cette théorie explique l'activité de l'EBr-LA.

III.6.3 Test de pouvoir réducteur plasmatique

Le pouvoir réducteur de plasma a été testé après l'administration des EBr des deux plante, et les résultats obtenues montre que les EBr de SS et LA augmentent le pouvoir réducteur de plasma d'une manière dose dépendante. La cinétique de réduction est présentée dans la figure 36, montre que le groupe le plus active est SS-D₂.

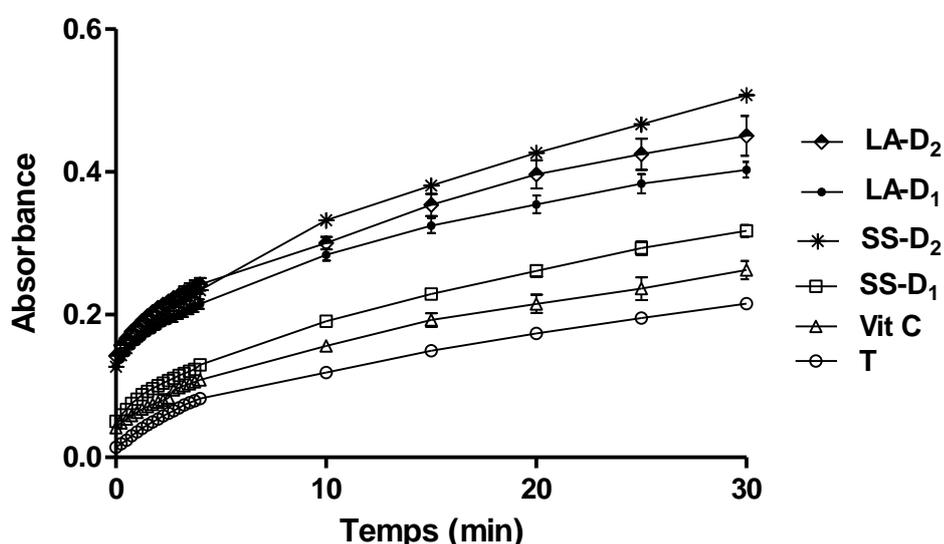


Figure 36. Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ des groupes ; non traité (T), traité avec la Vit C (50 mg/Kg), traité avec l'EBr-SS (D₁ : 25 et D₂ : 50 mg/Kg) et traité avec l'EBr-LA (D₁ : 50 mg/Kg et D₂ : 100 mg/Kg). Les valeurs présentent les moyennes \pm SEM (n = 8 à 10).

Tous les doses testés ont augmenté le pouvoir réducteur de plasma (FRAP) d'une manière dose dépendante et significative en comparant avec le groupe témoin, qui présente des valeurs de FRAP à 4 et 30 min de 3.830 ± 0.189 et 9.987 ± 0.167 mmole Fe²⁺ /ml de plasma, respectivement. Les deux doses de SS augmentent ce pouvoir de plasma en augmentant la valeur de FRAP, D₁ (6.598 ± 0.146 et 16.080 ± 0.489 mmole Fe²⁺ /ml de plasma à 4 et 30 min, respectivement) et D₂ (12.700 ± 0.267 et 27.450 ± 0.108 mmole Fe²⁺ /ml de plasma à 4 et 30

min, respectivement). LA renforce aussi le pouvoir réducteur de plasma, D₁ (11.570 ± 0.382 et 21.200 ± 0.666 mmole Fe²⁺ /ml de plasma à 4 et 30 min, respectivement) et D₂ (13.200 ± 0.503 et 25.870 ± 1.870 mmole Fe²⁺ /ml de plasma à 4 et 30 min, respectivement) (Figure 37).

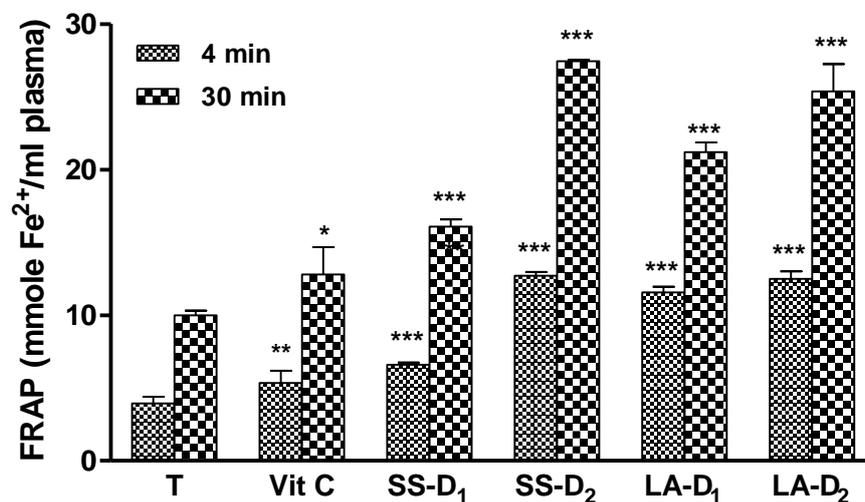


Figure 37. Valeurs de FRAP des groupes ; non traité (T), traité avec Vit C (50 mg/Kg), traité avec l'EBr-SS (D₁ : 25 et D₂ : 50 mg/Kg) et traité avec l'EBr-LA (D₁ : 50 mg/Kg et D₂ : 100 mg/Kg). Les valeurs présentent les moyennes \pm SEM (n = 8 à 10). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle négatif (T) ; * : $p \leq 0.05$, *** : $p \leq 0.001$.

La capacité d'antioxydants *in vivo* est déterminée par de nombreux facteurs qui devraient être pris en considération dans son évaluation, l'un de ces facteurs est la biodisponibilité. Les antioxydants doivent être absorbés, transportés, distribués et conservés correctement dans les fluides biologiques, les cellules et les tissus. La biodisponibilité de divers antioxydants et de l'effet de la dose et la durée ont été étudiés par analyse de fluides biologiques et les tissus des humains et des animaux de laboratoire après la prise d'antioxydants (Haj Mouhamed *et al.*, 2012). Pour certains antioxydants, une capacité très différente est observée *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, PMC (2,2,5,7,8-pentaméthyl-6-chromanol) exerce une activité plus puissante que la α -tocophérol contre la peroxydation lipidique des membranes, et à l'oxydation hémolyse des érythrocytes *in vitro*, mais l'efficacité de PMC *in vivo* est très faible, car il n'est pas conservé mais plutôt rapidement excrété (Niki *et al.*, 1991).

III.7 Test d'activité anti-inflammatoire

L'œdème de l'oreille induit par le PMA chez la souris qui est un modèle d'inflammation aigue, a été utilisé pour évaluer l'effet anti-œdémateux de l'EBr de SS et LA. L'œdème de l'oreille induit par le PMA est un modèle expérimental reproductible et concède une bonne valeur prédictive pour le criblage des agents anti-inflammatoires (Lu *et al.*, 2005).

La différence de l'épaisseur et de poids de l'oreille des souris avant et après l'application topique du PMA a été exploitée dans la présente étude pour évaluer l'effet anti-œdémateux des extraits des deux plantes.

Les résultats ont montré que le poids de l'œdème du groupe témoin positif (reçu uniquement le PMA) était de 7.26 ± 0.15 mg, il a été réduit par le diclofénac (DCF) à 4.44 ± 0.13 mg et il a été également réduit par les extraits des deux plantes SS et LA (Figure 38).

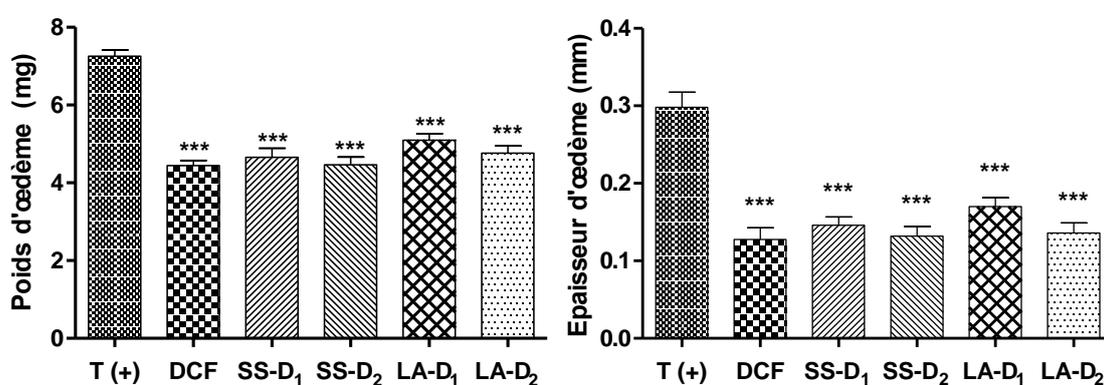


Figure 38. Poids et épaisseur d'œdème d'oreille provoqué par le PMA des groupes ; non traité (T₍₊₎), traité avec le diclofénac (10 mg/Kg), traité avec l'EBr-SS (D₁ : 12.5 et D₂ : 25 mg/Kg) et traité avec l'EBr-LA (D₁ : 50 mg/Kg et D₂ : 100 mg/Kg). Les valeurs présentent les moyennes \pm SEM (n = 6 à 8). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au contrôle positif (T₍₊₎) ; *** : $p \leq 0.001$.

L'EBr-SS présente une activité anti-œdémateuse comparable à celle de diclofénac à les deux dose ; D₁ (12,5 mg/Kg) et D₂ (25 mg/Kg), où le poids d'œdème à réduit jusqu'à 4.66 ± 0.23 et 4.46 ± 0.20 mg, respectivement. L'injection de d'EBr-LA à deux dose ; D₁ (50 mg/Kg) et D₂

(100 mg/Kg), présente une activité inférieure à celle de SS, avec un poids de 5.10 ± 0.16 et 4.76 ± 0.18 mg, respectivement.

L'application topique de PMA induit une réponse inflammatoire de longue durée, résultant de l'activation de la protéine kinase C (PKC) associée à une augmentation de la production de prostanoïdes et l'afflux cellulaire (Kang *et al.*, 2007). Cette réaction passe par un maximum de 6 h et s'abaisse à 24 h, ils ont montré que les multiples applications de PMA produisent une réponse inflammatoire plus prolongée caractérisée par l'œdème de l'oreille, l'afflux de cellules et cellules épidermiques hyperplasie inflammatoire (Malaviya *et al.*, 2006).

Les résultats d'épaisseur d'œdème confirment les résultats précédentes, où le PMA a provoqué au bout de 6 h une augmentation d'épaisseur de l'oreille gauche (0.30 ± 0.01 mm), et l'injection de diclofénac a provoqué une réduction significative de l'inflammation (0.12 ± 0.01 mm). L'injection de l'EBr des deux plantes provoque une diminution significative par rapport au groupe témoin.

Le pourcentage d'inhibition d'œdème a été calculé par rapport au groupe témoin (0 % d'inhibition), les résultats ont été résumés dans le tableau suivant :

Tableau 33. % d'inhibition d'œdème des groupes traités avec le diclofénac, les EBr de SS et LA.

Groupes	% d'inhibition d'œdème (%)	
	Poids	Epaisseur
DCF	38.84 ± 1.87	57.89 ± 4.92
SS-D ₁	35.81 ± 3.18	55.26 ± 4.36
SS-D ₂	38.57 ± 2.80	56.58 ± 4.08
LA-D ₁	29.75 ± 2.22	44.08 ± 3.75
LA-D ₂	34.44 ± 2.59	51.97 ± 3.54

Les valeurs sont les moyennes \pm SD (n = 6 à 8). Les comparaisons ont été effectuées par rapport au groupe DCF et tous les résultats ont été trouvés non significatifs.

Les résultats obtenus n'ont pas une corrélation avec la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des deux plantes, l'EBr-SS présente une activité anti-inflammatoire supérieure à celle d'EBr-LA malgré son faible teneur en polyphénols et flavonoïdes.

Ces résultats ont été confirmés par une évaluation histologique, les coupes ont montré que toutes les oreilles droites qui ont reçu que le véhicule (DMSO) ne présentent aucun signe d'inflammation. Cependant l'examen histologique des oreilles gauches a révélé un recrutement important des leucocytes polynucléaires (PNN) (Figure 39). L'anti-inflammatoire standard (diclofénac) a conduit à une diminution importante des leucocytes en diminuant la réponse inflammatoire (Figure 40).

Le traitement par l'EBr-SS a provoqué une diminution significative de l'infiltrat inflammatoire (Figure 41), par contre l'EBr-LA entraîne une diminution légère non significative de l'infiltrat inflammatoire et la persistance de l'œdème a été remarquée (Figure 42).

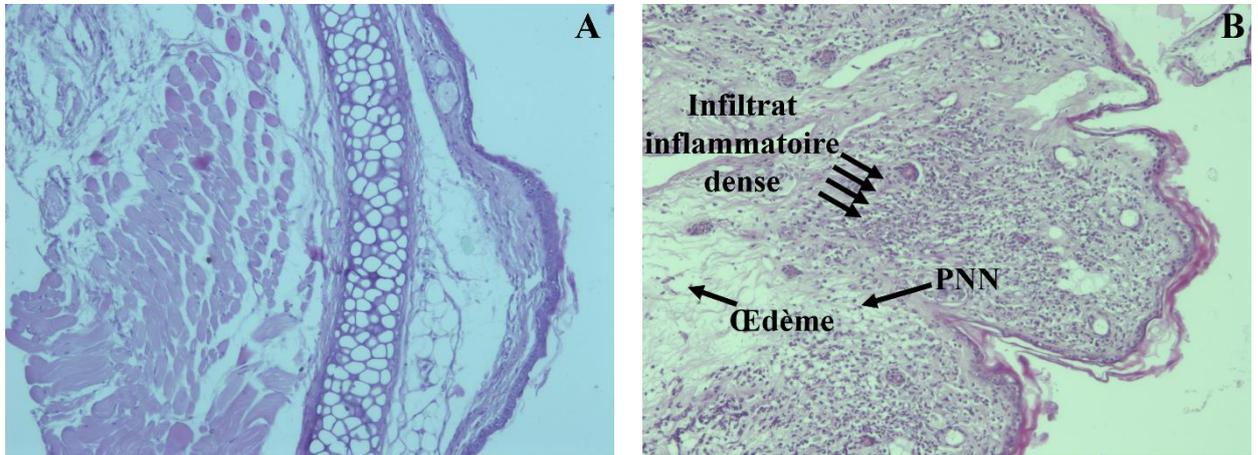


Figure 39. Coupe histologiques des oreilles de groupe témoin. A : Oreille droite qui a reçu le véhicule (DMSO), B : oreille gauche qui reçoit du PMA. Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 20X. PNN : polynucléaire neutrophile.

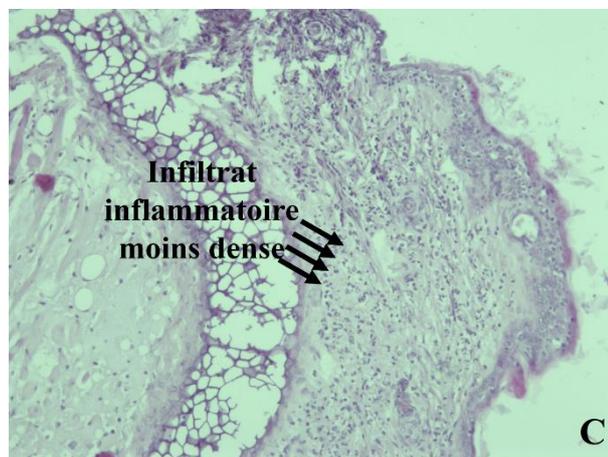


Figure 40. Coupe histologiques d'oreilles gauche de groupe traité avec le diclofénac. Coloration éosine hématoxyline/Grossissement 20X.

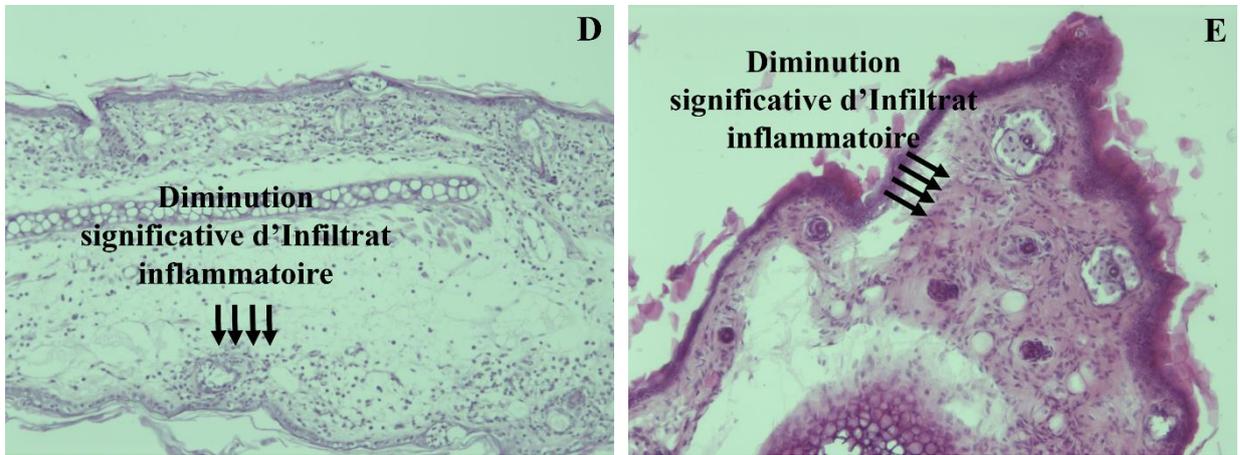


Figure 41. Coupe histologiques des oreilles gauche des groupes traités avec l'EBr de SS. D : traité avec D₁ (12.5 mg/Kg), E : traité avec D₂ (25 mg/Kg). Coloration éosine hématoxyline/ Grossissement 20X.

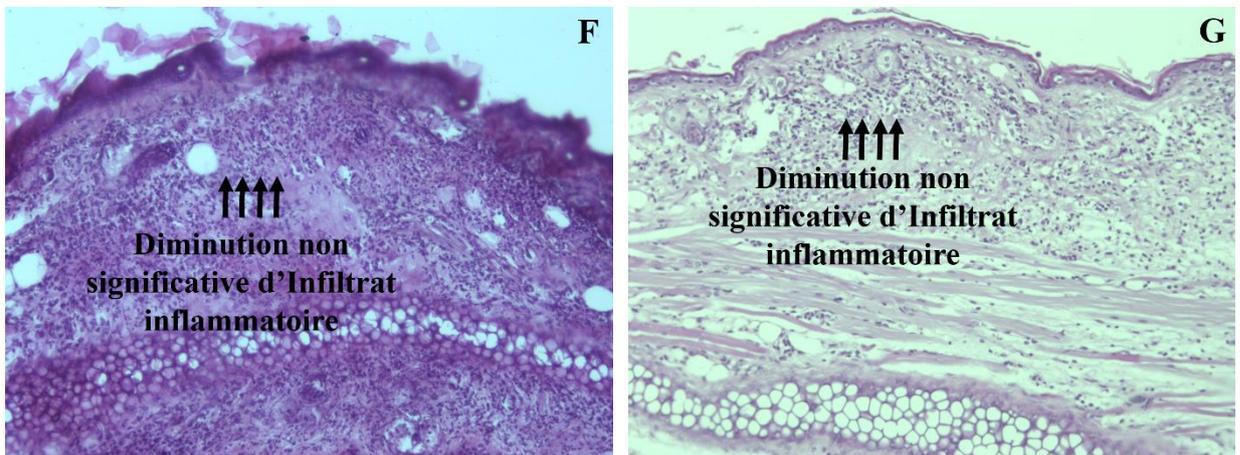


Figure 42. Coupe histologiques des oreilles gauches des groupes traités avec l'EBr de LA. F : traité avec D₁ (50 mg/Kg), E : traité avec D₂ (100 mg/Kg). Coloration éosine hématoxyline/ Grossissement 20X.

***DISCUSSION
GÉNÉRALE***

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir thérapeutique des plantes médicinales n'a cessé d'augmenter durant ces dernières années dans le but de rechercher des alternatives aux substances chimiques qui présentent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement. Le présent travail s'est intéressé aux effets antioxydant et anti-inflammatoire de deux plantes ; *Sedume sediforme* (SS) et *Lycium arabicum* (LA) largement utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies dont l'inflammation et les maladies rhumatismales.

L'extraction hydro-alcoolique des broyats des parties aériennes des deux plantes, montre que LA contient une quantité de biomolécules solubles 10 fois supérieure à celle de SS. Les extraits bruts (EBr) des deux plants ont été fractionnés afin d'étudier l'activité des fractions chloroformique (ECh), acétate d'éthyle (EAe) et aqueuse (EAq). Les EAe des deux plantes (renfermant les flavonoïdes glycosylés) sont les fractions les plus riches en polyphénols et flavonoïdes.

L'évaluation des activités antioxydantes a été effectuée par des méthodes enzymatiques utilisant la XO, purifiée à partir du lait bovin frais, comme source productrice des RLs. Les résultats ont montré que l'ECh-SS possède l'effet inhibiteur le plus puissant (inhibition mixte). La fraction EAe de LA (flavonoïdes glycosylés) est la plus active, avec une inhibition compétitive. Cette activité peut être due non seulement à leur teneur en polyphénols mais à leur nature. La capacité des extraits des deux plantes d'inhiber la XO *in vitro* a été confirmée *in vivo*, en injectant 50 mg/Kg de toutes les fractions à des souris hyperuricémiques. Les résultats obtenus ont montré un effet hypouricémique et inhibiteur de la XO de même ordre *in vivo* pour les fractions de SS. Les extrait de LA ont présenté un

effet inhibiteur de la XO sérique supérieur à celui des extraits de SS qui ont un effet remarquable sur la XO hépatique.

Les résultats du test scavenger de DPPH et d' $O_2^{\bullet-}$ produit par le système NADH-PMS et l' $O_2^{\bullet-}$ produit par le système XO/xanthine ont montré que l'EBr-SS représente la fraction la plus active. Par contre, l'E Ae (flavonoïdes glycosylés) et ECh (flavonoïdes aglycones) de LA ont montré le pouvoir scavenger le plus puissant. Les ECh de LA et SS présentent un effet piègeur de DPPH inférieur à celui des EAe, inversement pour l' $O_2^{\bullet-}$, ce qui confirme que l'action des flavonoïdes diffère d'un radical à l'autre. Le test de blanchissement du β -carotène a montré que les EBr de SS et LA présentent les activités les plus élevées.

La chélation de métaux est un moyen très important dans l'évaluation de l'activité antioxydante puisqu'elle montre une activité indirecte sur les RLs en agissant sur un facteur provoquant leur production. Les résultats de ce test ont montré que l'ECh-SS et l'E Ae-LA sont plus actifs. Le test de FRAP a été réalisé pour évaluer la capacité des extraits de réduire le complexe TPTZ- Fe^{+3} , de neutraliser un radical et/ou protéger une molécule. Les résultats ont montré que l'ECh-SS et l'EBr-LA possèdent le pouvoir réducteur le plus puissant, alors que l'E Aq-SS est le moins actif.

Le test d'hémolyse *in vitro* a été réalisé pour tester l'effet des extraits vis-à-vis l'attaque radicalaire sur les globules rouges. Dans ce test plusieurs modes d'action sont à l'origine de l'effet observé puisque les extraits qui présentent un effet anti-hémolytique sont capables de neutraliser le radical *t*-BHP, de protéger les lipides membranaire et/ou de renforcer le système antioxydant endogène. Il était attendu que l'extrait qui présente l'effet piègeur vis-à-vis les RLs le plus puissant (EAe) présente l'activité anti-hémolytique la plus élevée, mais les résultats ont montré que l'ECh-SS est la plus active et suivi par l'E Aq qui est le moins active. Cette activité peut être due à la synergie entre cette fraction et les antioxydants

endogène de sang (enzymatique ou non enzymatique), théorie prouvée par les calculs de t_{lag} et le ΔT .

La capacité antioxydante des EBr des deux plantes a été testée *in vivo*. Les résultats ont montré que les EBr des deux plantes augmentent significativement la capacité antioxydante en améliorant la capacité antioxydante totale du sang et la capacité antioxydante plasmatique chez les souris traitées. La comparaison globale a montré que l'EBr-SS est le plus actif dans tous les tests réalisés *in vitro*, malgré sa faible teneur en polyphénols et flavonoïdes. Cette activité peut être due non seulement à des molécules autres que les polyphénols ou à la nature des polyphénols. Cette activité a été diminuée *in vivo*, où l'EBr-LA a présenté une activité anti-hémolytique et un pouvoir piègeur supérieur à ceux d'EBr-SS. Cet effet peut être expliqué par la métabolisation et/ou le changement structural des composés pendant les étapes d'absorption, de distribution et de métabolisme. Egalement, l'EBr-SS a exprimé une activité anti-inflammatoire supérieure à celle d'EBr-LA. Ce qui peut être interprété par son important effet piègeur des radicaux car l'application de PMA conduit à la génération des RLs notamment l' $O_2^{\bullet-}$.

Des études complémentaires approfondies sont envisagées pour mieux comprendre les molécules impliquées dans chacune des activités observées et les mécanismes par lesquels ces composés agissent. Ces investigations peuvent être résumées dans les points suivants : (1) isolement et caractérisation des composés actifs dans les extraits des deux plantes par des méthodes plus spécifiques, (2) études de la pharmacocinétique des principes actifs pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques et (3) étude approfondie de la toxicité chronique des deux plantes afin de déterminer la sécurité de leurs utilisations comme médicaments.

RÉFÉRENCES

REFERENCES

- Abu Sitta K., Shomah M.S. and Salhab A.S. (2009) Hepatotoxicity of *Teucrium polium* L. tea: supporting evidence in mice models. *Australian Journal of Medical Herbalism*, 21(4); 106-107.
- Afanas'ev I.B. (2009) Signaling mechanisms of oxygen and nitrogen free radicals. *CPC Press*. pp: 1-71.
- Aggarwal B.B. and Shishodia S. (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 71; 1397-1421.
- Andjelkovic M., van Camp J., De Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M. and Verhe R. (2006) Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 98; 23-31.
- Ani V., Varadaraj M.C. and Akhilender Naidu K. (2006) Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *European food Research and technology*, 224; 109-115.
- Anzai T., Yashikawa T., Kaneko H., Maekawa Y., Iwanag S., Asakura Y. and Ogawa S. (2004). Association between serum C-reactive protein elevation and left ventricular thrombusformation after anterior myocardial infection. *Chest journal*, 125; 384-389.
- Arbos K.A., Claro L.M., Borges L., Santos C.A.M. and Weffort-Santos A.M. (2008) Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28; 457-463.
- Ashley T.N., Weil Z.M. and Nelson R.J. (2012) Inflammation: mechanisms, costs and natural variation. *Annual Review*, 43; 385-406.
- 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 pulla*. *Pharmacal Biology*, 44; 247-252.
- Avis P.G., Bergel F. and Bray R.C. (1956) 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.
- Baghiani A., Ameni D., Boumerfeg S., Adjadj M., Djarmouni M., Charef N., Khennouf S. and Arrar L. (2012) Studies of antioxidants and xanthine oxidase inhibitory potentials of root and aerial parts of medicinal plant *Capparis Spinosa* L.. *American Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2(1); 25-32.

- 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. Flavins and flavoproteins. *Agency for Scientific Publications, Berlin*, pp: 837-844.
- Baghiani A., Boumerfeg S., Adjadj M., Ameni D., Djermouni M., Khelifi-Touhami F., Charef N., Khennouf S. and Lekhmici Arrar (2011) Antioxidants, free radicals scavenging and xanthine oxidase inhibitory potentials of *Ajuga iva* L. extracts. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4); 21-30.
- Baghiani A., Boumerfeg S., Adjadj M., Ameni D., Djermouni M., Khelifi-Touhami F., Charef N., Khennouf S. and Arrar L. (2011) antioxidants, free radicals scavenging and xanthine oxidase inhibitory potentials of *Ajuga iva* L. extracts. *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4); 21-30.
- Baghiani A., Boumerfeg S., Belkhiri F., Khennouf S., Charef N., Harzallah D., Arrar L., Attia M.A.W. (2010) Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L extracts grow wild in Algeria flora. *Comunicata Scientiae*, 1(2); 128-136.
- 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., Pinkas M., Luycky M., Gazin M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46; 1086-1089.
- Barriere C., Centeno D., Lebert A., Leroy-Setrin S., Berdague J.L. and Talon R. (2001) Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters*, 201; 181-185.
- Battelli M.G., Bolognesi A. and Polito L. (2014a) Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842; 1502–1517.
- Battelli M.G., Polito L. and Bolognesi A. (2014b) Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: not only oxidative stress. *Atherosclerosis*, 237 ; 562-567.
- Benzie I.F. and Strain J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal of Biochemistry*, 15, 239(1); 70-6.
- Berboucha M., Ayouni K., Atmani D., Atmani D. and Benboubetra M. (2009) Kinetic study on the inhibition of xanthine oxidase by extracts from two selected algerian plants traditionally used for the treatment of inflammatory diseases. *Journal of Medicinal Food*, 13(4);1-9.

-
- Bonnefont-Rousselot D. and Collin F. (2010) Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*, 278; 55-67.
- Borges F., Fernandes E. and Rolivera F. (2002) Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 9; 195-217.
- Botting R.M. and Botting J.H. (2000) Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: an overview. *Clinical Drug Investigation*, 19; 1 -7.
- Boueiz A., Damarla M. and Hassoun P. (2008) Xanthine oxidoreductase in respiratory and cardiovascular disorders. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 294; 830-840.
- Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S. and Arrar L. (2012) Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts. *Chinese Medicine*, 3; 30-41.
- 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.
- Boussoulim N., Trabsa H., Krache I., Arrar L., Khennouf S. and Baghiani A. (2014) Anti-bacterial and β -Lactamase inhibitory effects of *Anchusa azurea* and *Globularia alypum* extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(1); 742-749.
- Bray R.C. (1975) Molybdenum iron-sulfer flavin hydroxylase and related enzymes. In: *The enzymes*. 3^{ème} Ed. Vol 12. PD Boyer Ed. Academic Press, New York, pp; 299-419.
- Burda S. and Oleszek W. (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49; 2774-2779.
- Burits M. and Bucar F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapeutic Research*, 14; 323-328.
- Burton G. and Jauniaux E. (2011) Oxidative stress. *Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology*, 25; 287-299.
- Cai H. (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms and consequences. *Cardiovascular Research*, 68(1); 26-36.
- Cai Z. and Yan Y., (2007) Pathway and mechanism of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Medical Colleges of PLA*, 22; 320-325.
- Calhau C. and Santos A. (2009) Oxidative stress in the metabolic syndrome. In: Soares R. and Costa C. Oxidative stress, inflammation and angiogenesis in the metabolic syndrome. *Springer*, pp; 33-63.
-

-
- Cantu-Medellin N. and Kelley E.E. (2013) Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*, 1; 353–358.
- Cao G. and Prior R.L. (1998) Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44; 1309-1315.
- Chalouhi N., Ali M.S., Starke M.R., Jabbour P.M., Tjoumakaris S.I., Gonzalez L.F., Rosenwasser R.H., Koch W.J. and Dumont A.S. (2012) Cigarette smoke and inflammation: role in cerebral aneurysm formation and rupture. *Mediators of inflammation*, ID 271582; 1-12.
- Charbon G., Bjorn L., Mendoza-Chamizo B., Frimodt-Moller J. and Lobner-Olesen A. (2014) Oxidative DNA damage is instrumental in hyperreplication stress-induced inviability of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 42(21); 13228-13241.
- Chen R., Liu Z., Zhao J., Chen R., Meng F., Zhang M. and Ge W. (2011) Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from *Acanthopanax senticosu*. *Food Chemistry*, 127; 434–440.
- Chung W.J. (2014) Management of portal hypertensive gastropathy and other bleeding. *Clinical and Molecular Hepatology*, 20; 1-5.
- Çimen M.Y.B. (2008) Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 39; 1-11.
- Cohen G. (2002) Oxidative stress and Parkinson's disease. In: Gilbert D.L. and Colton C.A. Reactive oxygen species in biological systems: an interdisciplinary approach. *New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers*, pp; 593-608.
- Comhair S.A.A., Erzurum S.C. (2002) Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American Journal Physiology Lung Cell. Molecular Physiology*, 283; 246-255.
- Cotelle N. (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1; 569-590.
- Cotticelli M.G., Crabbe A.M., Wilson R.B. and Shchepinov M.S. (2013) Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox Biology*, 1; 398-404.
- Cour M., et Argaud L. (2010) Ischémie-reperfusion et protection cellulaire. *Réanimation*, 19; 185-190.
- Cui Y., You Z., Li X., Wang X., Ma Y., Wang C. and Zhang C. (2010) Synthesis, crystal structures and xanthine oxidase inhibitory activities of two copper(II) complexes with Schiff bases. *Transition Metal Chemistry*, 35; 159-163.
-

-
- Das K., Tiwari R.K.S. and Shrivastava D.K. (2010) Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2); 104-111.
- Davoine F. and Lacy P. (2014) Eosinophil cytokines, chemokines and growth factors: emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology Molecular Innate Immunity*, 5(570); 1-17.
- De Marco F. (2013) Oxidative stress and HPV Carcinogenesis. *Viruses*, 5; 708-731.
- Decker E.A. and Welch B. (1990) Role of ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38; 674-677.
- DeJong J.W., Schoemaker R., Jonge R., Bernocchi P., Keijzer E., Harrison R., Sharma H.S. and Ceconi C. (2000) Enhanced expression and activity of xanthine oxidoreductase in the failing heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32; 2083-2089.
- De-Qianga D., Zheng X., Guanga Y., Jian-Feng Z., Ying-Kun Q., Jing-Xian Y. and Ting-Guo K. (2011) Prediagnostic methods for the hemolysis of herbal medicine injection. *Journal of Ethnopharmacology*, 138: 445-450.
- Dhaliwal G., Cornett P.A. and TIERNEY L.M. (2004) Hemolytic Anemia. *American Family Physician*, 69(11) 2599- 2606.
- Diegelman, R.F., Evans, M.C. (2004) Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed. *Frontiers in Bioscience* 9,283-289.
- Djarmouni M., Boumerfeg S., Baghiani A., Boussoualim N., Zerargui F., Trabsa H., Belkhiri F., Khennouf S. and Arrar L. (2012) evaluation of antioxidant and antibacterial properties of *Peaganum Harmala* seed extracts. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3(4); 1109- 1119.
- 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.
- Dorward D.A., Lucas C.D., Rossi A.G., Haslett C., Dhaliwal K. (2012) Imaging inflammation: molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology and Therapeutics*, 135; 182-199.
- Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82; 47-95.
- Důračková Z. (2008) Oxidants, antioxidants and oxidative stress. *In: Mitochondrial medicine. Springer Science and Business Media*, pp; 19-54.
-

- Dwight J.F.St.J. and Hendry B.M. (1996) The effects of tert-butyl hydroperoxide on human erythrocyte membrane ion transport and the protective actions of antioxidants. *Clinica Chimica Acta*, 249; 167-181.
- Egert S. and Rimbach G. (2011) Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements?. *Advances in nutrition*, 2; 8-14.
- Engelmann M.D., Hutcheson R. and Cheng I.F. (2005) Stability of ferric complexes with 3-hydroxyflavone (flavonol), 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) and 3',4'-dihydroxyflavone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53; 2953-2960.
- Ennabili A., Gharnit N. and EL Hamdouni E.M. (2000) Inventory and social interest of medicinal, aromatic and honey-plants from mokrisset region (nw of morocco). *BIBLID Fecha de aceptación del artículo*, 19; 57-74.
- Evans W.J. (2000) Vitamin E, vitamin C and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72; 647-652.
- Favier A. (2003) Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, 108-115.
- Feidovich I. (1965) The competitive inhibition of uricase by oxonate and by related derivatives of s-Triazines. *Journal of biological biochemistry*, 240(6); 2491-2494.
- Fernandez-Panchon M.S., Villano D., Troncoso A.M. and Garcia-Parrilla M.C. (2008) Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48; 649-671.
- Fontaine E. (2007) Radicaux libres. In: *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer-Verlag France, pp; 251-257.
- Foyer C.H., Trebst A. and Noctor G. (2008) Signaling and integration of defense functions of tocopherol, ascorbate and glutathione. In: *photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*. Springer Science Business Media, pp; 241-268
- Franco Ro., Sánchez-Olea R., Reyes-Reyes E.M. and Panayiotidis M.I. (2009) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis. *Mutation Research*, 674; 3-22.
- Frankel E.N. and Meyer A.S. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80; 1925-1940.
- Gadave K.S., Panda S., Singh S., Kalra S., Malakar D., Mohanty A.K. and Kaushik J.K. (2014) Structural and functional insights into the catalytic inactivity of the major fraction of buffalo milk xanthine oxidoreductase. *PLOS ONE*, 9(1); 1-11.

- Garrido G., González D., Lemus Y., García D., Lodeiro L., Quintero G., Delporte C., Núñez-Sellés A.J. and Delgado R. (2004) *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). *Pharmacology Research*, 50 (2); 143-149.
- Georgen J. and Struthers A.D. (2009) Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vascular Health and Risk Management*, 5; 265-272.
- Gilroy D. and Lawrence T. (2008) The resolution of acute inflammation: a 'tipping point' in the development of chronic inflammatory diseases. In: Rossi A.G. and Sawatzky D.A. The resolution of inflammation; progress in inflammation research. *Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin*, pp; 1-4.
- Ginger L.A., Kosila N., Elkins N. D., Essary B., McManaman J.L. and Repine J.E. (2004) Mononuclear phagocyte xanthine oxidoreductase contributes to cytokine-induced acute lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 30; 479-490.
- Goetz M.E. and Luch A. (2008) Reactive species: a cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer letters*, 266; 73-78.
- Gonçalves A.E., (2005) Solanaceae. In: Pope G.V., Polhill R.M. and Martins E.S. Flora Zambesiaca. Volume 8, part 4. *Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, United Kingdom*, pp; 124.
- Grivennikova V.G. and Vinogradov A.D. (2013) Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, 78(13); 1490-1511.
- Gülçin 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.
- Gutowski M. and Kowalczyk S. (2013) A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *ACTA biochimica polonica*, 60(1); 1-16.
- Guzik T.G. (2010) Functional studies of NADPH oxidases in human vasculature. In: studies on cardiovascular disorders, oxidative stress in applied basic research and clinical practice. *Springer Science Business Media*, pp; 149-167.
- Haj Mouhamed D., Ezzaher A., Neffati F., Douki W., Gaha L., et Najjar M.F. (2012) Etude d'un marqueur du stress oxydant chez les fumeurs: le malondialdéhyde. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 27 ; 153-158.
- Hart H. (2003) *Sedum* of Europe. *Swets and Zeitlenger*, pp; 194.
- Hasani P., Yasa N., Vosough-Ghanbari S., Mohammadirad A., Dehghan G., Abdollahi M. 2007. *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharmaceutica*, 57; 123-127.

- Hashimoto S. (1974) A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Analytical biochemistry*, 62; 426-435.
- Henzen C. (2003) Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum médical suisse*, 19; 442-446.
- Hitchon C.A. and El-Gabalawy H.S. (2004) Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 6; 265-278.
- Huang D., Ou B. and Prior R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53; 1841-1856.
- Huang J., Wang S., Zhu M., Chen J. and Zhu X. (2011) Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49; 1943-1947.
- Hunt J. and Massey V. (1992) Purification and properties of milk xanthine deshydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267; 21479-21485.
- Ichida K., Amaya Y., Noda K., Minoshima S., Hosoya T., Sakai O., Shimizu N. and Nishino T. (1993) Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene*, 133; 279-284
- Jacquot J.P., Dietz K.J., Rouhier N., Meux E., Lallement P.A., Selles B. and Hecker A. (2013) Redox regulation in plants: glutathione and “redoxin” related families. *In: Oxidative stress and redox regulation. Springer Science Business Media Dordrecht*, pp; 213-291.
- Jauzein P. (1995) Flore des champs cultivé. pp: 286-289.
- Jetanalin P. and Lee S.J. (2013) Gout. *In: Challenging cases in rheumatology and diseases of the immune system. Springer Science Business Media*, pp; 35-53.
- Kang J.Y., Khan M.N.A., Park N.H., Cho J.Y., Lee M.C., Fujii H. and Hong Y.K. (2007) Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of the seaweed *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 116; 187–190.
- Kaur G., Alam M. S. Jabbar Z., Javed K. and Athar M. (2006) Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, **108**: 340–348.
- Kessel L., Tendal B., Jorgensen K.J., Erngaard D., Flesner P. andresen J.L. and Hjortdal J. (2014) Post-cataract prevention of inflammation and macular edema by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory eye drops. *Ophthalmology*, 121(10); 1915-1924.
- Kumar S. and Pandey A.K. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The ScientificWorld Journal*, ID: 162750; 1-16.

- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 680-685.
- Lagouge M. and Larsson N.G. (2013) The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of internal medicine*, 273; 529-543.
- Lamy E., Rawel H., Schweigert F.J., Silva F.C., Ferreira A., Costa A.R., Antunes C., Almeida A.M., Coelho A.V. and Sales-Baptista E. (2014) The effect of tannins on mediterranean ruminant ingestive behavior: the role of the oral cavity. *Molecules*, 16; 2766-2784.
- Lee B., Toledo A., Anaya-Prado R., Roach R. and Toledo-Pereyra L. (2009) Allopurinol, xanthine oxidase and cardiac ischemia. *Journal of investigative medicine*, 57(8); 902-909.
- Lespade L. and Bercion S. (2010) Theoretical study of the mechanism of inhibition of xanthine oxydase by flavonoids and gallic acid derivatives. *Journal of Physical Chemistry B*, 114; 921-928.
- Li A.N., Li S., Zhang Y.J., Xu X.R., Chen Y.M. and Li H.B. (2014) Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6; 6020-6047.
- Li H., 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 J.M., Zhang X., Wang X., Xie Y.C. and Kong L.D. (2011) Protective effects of cortex fraxini coumarines against oxonate-induced hyperuricemia and renal dysfunction in mice. *European Journal of Pharmacology*, 666; 196-204.
- Libetta C., Sepe V., Esposito P., Galli F. and Dal Canton A. (2011) Oxidative stress and infammation: implications in uremia and hemodialysis. *Clinical Biochemistry*, 44; 1189–1198.
- Limbach S. and Guillard J.C. (2007) Vitamines. *Dans: Traité de nutrition artificielle de l'adulte. 2^{eme} éd, France, Springer- Verlag*, pp; 127-143.
- 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; 167-172.
- Liu D., Shi J., Ibarra A.C., Kakuda Y., Xue S.J. (2008) The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C and b-carotene mixtures on the DPPH free radical. *Food Science and Technology*, 41; 1344–1349.
- Liu Z., Han K., Lin Y. and Luo X. (2002) Antioxidative or prooxidative effect of 4-hydroxyquinoline derivatives on free-radical-initiated hemolysis of erythrocytes is due to its distributive status. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1570; 97–103.

-
- Lonn M.E., Dennis J.M., Stocker R. (2012) Actions of ‘antioxidants’ in the protection against atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53; 863-884.
- Lullmann-Rauch R. (2008) Histologie. *De Boeck edition Bruxelles*, pp; 627-630.
- Luo W., Zhao M., Yang B., Ren J., Shen G. and Rao G. Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from *Phyllanthus emblica* L. fruit. *Food Chemistry*, 126; 277-282.
- Maccarrone M. (2008) Lipoxygenases, apoptosis and the role of antioxidants. *In: Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment*. Springer Science Business Media, pp; 321-332.
- Madhuri V., Darshan S.K. and Kent L.E. (2008) Health effects of foods rich in polyphenols. *In: Wild-type food in health promotion and disease prevention*. Humana Press Inc., Totowa, pp; 393-412.
- Malaviya R., Ansell J., Hall L., Fahmy M., Argentieri R.L., Olini J.G.C., Pereira D.W., Sur R. and Cavender D. (2006) Targeting cytosolic phospholipase A2 by arachidonyl trifluoromethyl ketone prevents chronic inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*, 539; 195-204.
- Male D. (2005) Immunologie: aide-mémoire illustré. 4^{ème} éd, *De Boeck, Bruxelles*, pp; 79-83.
- Mandal S.M., Chakraborty D. and Dey S. (2014) Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling and Behavior*, 5(4); 359-368.
- Maritim A.C., Sanders R.A. and Watkins III J.B. (2003) Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17; 24-38.
- Markham K.R. (1982) Techniques of flavonoid identification (Chapitre 1 et 2). *London: Academic Press*, pp; 1-113.
- Martin H.M., Hancock J.T., Salisbury V. and Harrison R. (2004) Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infection and Immunity*, 72; 4933-4939.
- Mena S., Ortega A. and Estrela J.M. (2009) Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research*, 674; 36-44.
- Meneshian A. and Bulkley G.B. (2002) The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation*, 9; 161-175.
- Menon R. (2014) Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. *Frontiers in Immunology*, 5(567); 1-14.

- Merksamer P.I., Liu Y., He W., Hirschey M.D., Chen D. and Verdin E. (2013) The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, 5 (3); 144-150.
- Migliore L. and Coppedè F. (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research*, 674; 73-84.
- Mittal A., Phillips A.R.J., Loveday B. and Windsor J.A. (2008) The potential role for xanthine oxidase inhibition in major intra-abdominal surgery. *World Journal of Surgery*, 32; 288-295.
- Miwa S., Muller F.L. and Beckman K.B. (2008) The basics of oxidative biochemistry. *In: Oxidative stress in aging. Aging Medicine*, pp; 11-35.
- Mo S., Zhou F., Lv Y., Hu Q., Zhang D. and Kong L. (2007) Hypouricemic action of selected flavonoids in mice: structure-activity relationships. *Biology Pharmaceutical Bulletin*, 30(8); 1551-1556.
- Naidu M.M., Shyamala B.N., Naik J.P., Sulochanamma G. and Srinivas P. (2011) Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 44; 451-456.
- Nakamura M. and Yamazaki I. (1982) Preparation of bovine milk xanthine oxidase as dehydrogenase form. *The Journal of Biochemistry*, 92; 1279-1286.
- Nessar A., Dawson M., Smith C. and Wood D. (2007) Biology of disease. *UK: Taylor and Francis*, pp; 204-208.
- Neyestani T.R. (2008) Polyphenols and immunity. *In: Wild-type food in health promotion and disease prevention. Humana Press Inc., Totowa*, pp; 413-434.
- Niki E., Yamamoto Y., Komuro E. and Sato K. (1991) Membrane damage due to lipid oxidation¹2. *American journal of Clinical Nutrition*, 53; 1S-5S.
- O'Mahony J.A., Fox P.F. and Kelly A.L. (2013) Indigenous enzymes of milk advanced dairy chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects. *4th Edition, Springer Science Business Media New York*, pp; 337-385.
- Oduola T., Adeniyi F., Ogunyemi E., Bello I.S., Idowu T. and Subair H. (2007) Toxicity studies on an unripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in wistar albino rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(1); 001-004.
- Okuda T. and Ito H. (2011) Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16; 2191-2217.
- Orbán-Gyapai O., Lajter I., Hohmann J., Gusztáv J. and Vasas A. (2014) Xanthine oxidase inhibitory activity of extracts prepared from *Polygonaceae* species. *Phytotherapy Research*, DOI: 10.1002/ptr.5275; 1-7.

- Ortega N., Doña I., Moreno E., Audicana M.T., Barasona M.J., Berges-Gimeno M.P., Blanca-Lopez N., Lobera T., Padial A., Rosado A. and Torres M.J. (2014) Practical Guidelines for Diagnosing Hypersensitivity Reactions to Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 24(5); 308-323.
- Ortiz G.G., Pacheco-Moisés F.P., Bitzer-Quintero O.K., Ramírez-Anguiano A.C., Flores-Alvarado L.J., Ramírez-Ramírez V., Macias-Islas M.A. and Torres-Sánchez E.D. (2013) Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013; 1-14.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K. (2002) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50; 3122-3128.
- Ouellet C., Bilodeau G. et Cantin A.M. (2007) Stress oxydatif, tabagisme et CFTR: est-ce que le tabagisme peut conduire à la mucoviscidose. *Nouvelle médecine*, 1(23); 1-2.
- Özyürek M., Bektaşoğlu B., Güclü K. and Apak R. (2009) Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Analytica Chimica Acta*, 636; 42-50.
- 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.
- Paixao N., Perestrelo R., Marques J.C., Camara J.S. (2007) Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry*, 105; 204–214.
- Papa L., Manfredi G. and Germain D. (2014) SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes and Cancer*, 5 (1-2); 15-21.
- Parks D.A. and Granger D.N. (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiologica Scandinavica*, 548; 87-99.
- Pauff J.M. and Hille R. (2009) Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin and curcumin. *Journal of Natural Products*, 72(4); 725-731.
- Peng C., Wang X., Chen J., Jiao R., Wang L., Li Y.M., Zuo Y., Liu Y., Lei L., Ma K.Y., Huang Y. and Chen Z.Y. (2014) Antioxidants biology of ageing and role of dietary. *BioMed Research International*, ID 831841; 1-13.

-
- Pickering A.M., Vojtovich L., Tower J. and Davies J.A. (2013) Oxidative stress adaptation with acute, chronic and repeated stress. *Free radical biology and medicine*. 55; 109-118.
- Polies J.M. (2007) Encyclopédie visuelle des plantes sauvages. *Edition Artémis*, pp: 93.
- Popovici C., Saykova I., et Tylkowski B. (2009) Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4; 25-39.
- Psotová J., Lasovsky J. and Vicar J. (2003) Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomedical Papers*, 147(2); 147-153.
- Pulido R., Bravo L. and Saura-Calixto F. (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48; 3396-3402.
- Quezel P. and Santa S. (1963) Nouvelle flore de l' Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. *Centre National de la Recherche Scientifique*, pp; 797-860.
- Qusti S.Y., Abo-khatwa A.N. and Bin Lahwa M.A. (2010) Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the holly quran. *European Journal of Biological Sciences*, 2(1); 40-51.
- Radi R., Tan S., Prodnov E., Evans R.A., Parks D.A. (1992) Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochem Biophys Acta*, 1122; 178-182.
- Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S. and Dhama K. (2014) Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International*, V2014 ; 1-14.
- Rankin J.A. (2004) Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues*, 15; 3-17.
- Rankin J.A. (2004) Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues*, 15; 3 -17.
- Redondo L.M., Chacana P.A., Dominguez J.E. and Miyakawa M.E.F. (2014) Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Frontiers in microbiology*, 5(118); 1-7.
- Richard M. and John E. (2007) Methods of modulating inflammatory reactions by modulating xanthine oxidoreductase activity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 60; 505-922.
- Ríos-Arrabal S., Artacho-Cordón F., León J., Román-Marinetto E., Salinas-Asensio M.M., Calvente I. and Núñez M.I. (2013) Involvement of free radicals in breast cancer. *Springerplus*, 2(404); 1-12.
-

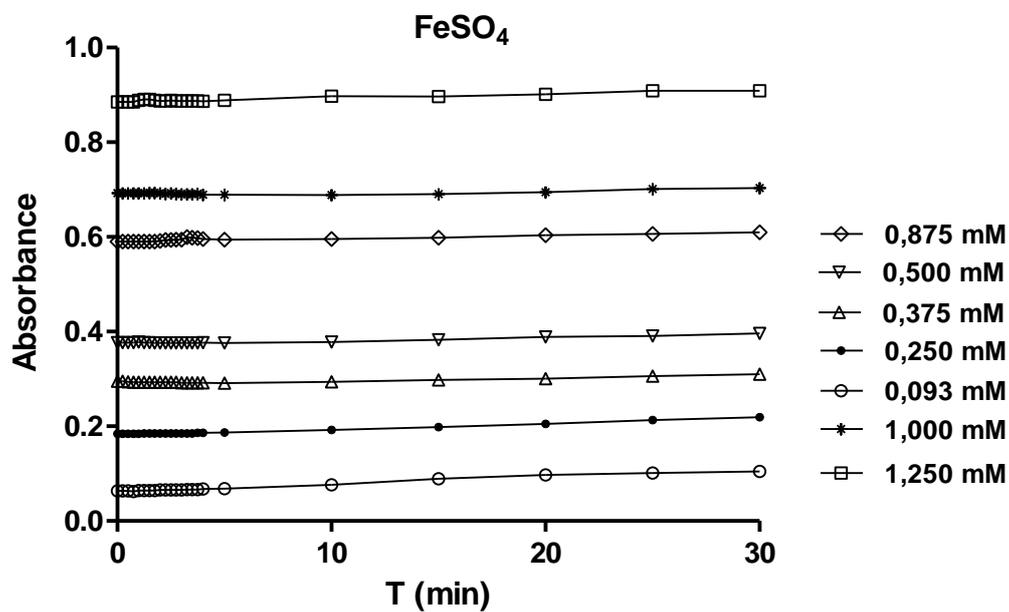
-
- Salido M. and Rosado J.A. (2009) Apoptosis: involvement of oxidative stress and intracellular Ca^{2+} homeostasis genes. *Springer Science and Business Media*, pp: 1-17.
- Sandalio L.M., Rodriguez-serrano M., Romero-puertas M. and Ddel rio L. (2013) Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. *In: peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism, subcellular biochemistry. Springer Scienceec Business Media Dordrecht*, pp; 233-249
- Sanders S.A., Eisenthal R. and Harrison R. (1997) Oxidation of NADH by human xanthine oxidoreductase: generation of superoxide anion. *European Journal of Biochemistry*, 245; 541-548.
- Sankari S.L., Babu N.A., Rani V. and Priyadharsini C. (2014) Flavonoids: clinical effects and applications in dentistry: a review. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 6(1); S26-S29.
- Schmelzer G.H., Gurib-Fakim A., Arroo R., Bosch C.H., Ruijter A. et Simmonds M.S.J. (2008) Ressources végétales de l'Afrique tropicales, plantes médicinal 1. *PROTA Network Office Europe*, pp; 408.
- Selloum L., Reichl S., Müller M., Sebihi L. and Arnhold J. (2001) Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 395; 49-56.
- Serhan C.N., Ward P.A., Gilroy D.W. (2010) Fundamentals of inflammation. *Hardback, USA*, pp; 13-14.
- Shi-Fu M., Feng Z., Yao-Zhong L.V., Qing-Hua H., Dong-Mei Z. and Ling-Dong K. (2007) Hypouricemic action of selected flavonoids in mice: structure–activity relationships. *Biology Pharmaceutical Bulletin*, 30(8); 1551-1556.
- Siu Y.P., Leung K.T., Tong M.K.H. and Kwan T.H. (2006) Use of allopurinol in slowing the progression of renal disease through its ability to lower serum uric acid level. *American Journal of Kidney Diseases*, 47(1); 51-59.
- Skibo E.B. (1986) Non competitive and irreversible inhibition of xanthine oxidase by benzimidazole analogues acting at functional flavin adenine dinucleotide cofactor. *Biochemistry*, 25; 4189-4194.
- Sorg O. (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, 327; 649-662.
- Sparg S.G., Light M.E. and Van Staden, J. (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94; 219-243.

-
- Stevens C.D. (2010) Clinical immunology and serology. *Therd edition, F.A. Davis Company Philadelphia*, pp; 2-10.
- Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.O. and Dommessa J. (2009) Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113; 1226-1233.
- Takahama U., Koga Y., Hirota S. and Yamauchi R. (2011) Inhibition of xanthine oxidase activity by an oxathiolanone derivative of quercetin. *Food Chemistry*, 126; 1808-1811.
- Takebayashi J. and Chen J. and Tai A. (2010) A method for evaluation of antioxidant activity based on inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis. *In: Armstrong D. Advanced protocols in oxidative stress ii, methods in molecular biology*, vol. 594, pp; 287-296.
- Tanumihardjo S.A. (2013) Carotenoids and Human Health. *Humana Press, Springer. USA*.
- 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.
- Tokarz P., Kaarniranta K. and Blasiak J. 2013 Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology*, 14; 461-482.
- Touaibia M. and Chaouch F.Z. (2014) Evaluation of the antioxidant activity of aqueous, methanolic and ethanolic extracts of the Sahara-endemic species *Myrtus nivellei* Batt and Trab. (Myrtaceae). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 6(3); 407-413.
- Touyz R.M., Chignalia A. and Sedeek M. (2010) Reactive oxygen species, oxidative stress and hypertension. *In: Studies on cardiovascular disorders, oxidative stress in applied basic research and clinical practice, Springer Science Business Media*, pp; 281-315.
- Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2; 1231-1246.
- Vijaya Lakshmi S.V., Padmaja G., Kuppusamy P. and Kutala V.K. (2009) Oxidative stress in cardiovascular diseases. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 46; 421-440.
- Vonkeman H.E., Braakman-Jansen L.M., Klok R.M., Postma M.J., Brouwers J.R. and Van de Laar M.A. (2008) Incremental cost effectiveness of proton pump inhibitors for the prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug ulcers: a pharmacoeconomic analysis linked to a case-control study. *Arthritis Research Therapy*, 10(6); 1-7.
- Vorbach C., Harrison R. and Mario R. (2003) Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Journal of Immunology*, 24; 512-517.
-

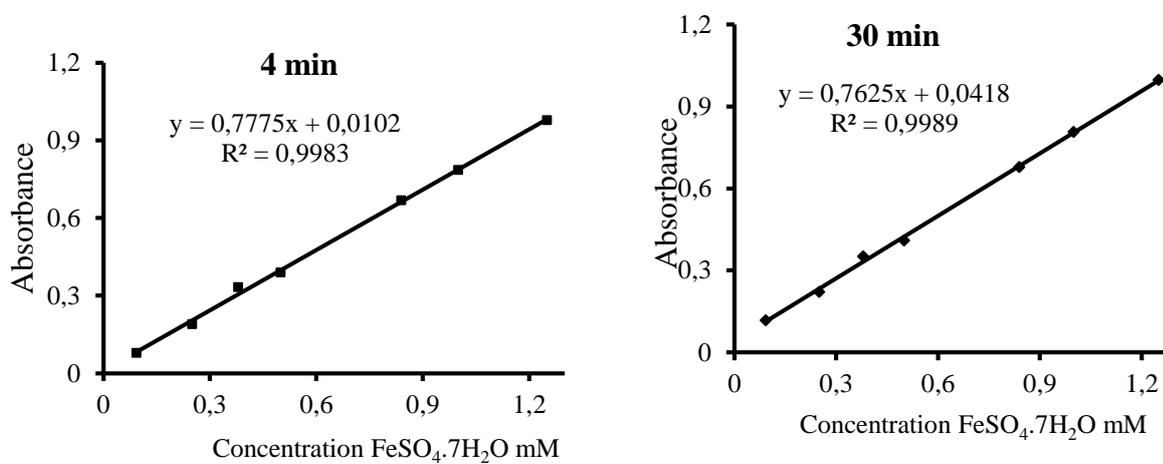
-
- Wages P.A., Silbajoris R., Speen A., Brighton L., Henriquez A., Tong H., Bromberg P.A., Simmons S.O. and Samet J.M. (2014); Role of H₂O₂ in the oxidative effects of zinc exposure in human airway epithelial cells *Redox Biology* 3 47–55.
- Wagner J.G. and Roth R.A. (2000) Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacological Reviews*, 52; 349-374.
- Yan J., Zhang G., Hu Y., Ma Y. (2013) Effect of luteolin on xanthine oxidase: inhibition kinetics and interaction mechanism merging with docking simulation. *Food chemistry*, 141(4); 3766-3777.
- Yan L.J. (2014) Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerances. *Redox Biology*, 2; 165-169.
- Zhang A., Zhu Q. Y., Luk Y. S., Ho K. Y., Fung K. P. and Chen Z. (1997) Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life sciences*, 61(4); 383-394.
- Zhang D.X. and Gutterman D.D. (2007) Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292; 2023-2031.
- Zhou Y., Yan H., Guo M., Zhu J., Xiao Q. and Zhang L. (2013) Reactive oxygen species in vascular formation and development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013V; 1-14.
- Ziech D., Franco R., Georgakilas A.G., Georgakila S., Malamou-Mitsi V., Schoneveld O., Pappa A. and Panayiotidis M.I. (2010) The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental and carcinogenesis and biomarker development. *Chemico-Biological Interactions*, 188; 334-339.

Annexes

ANNEXE 1

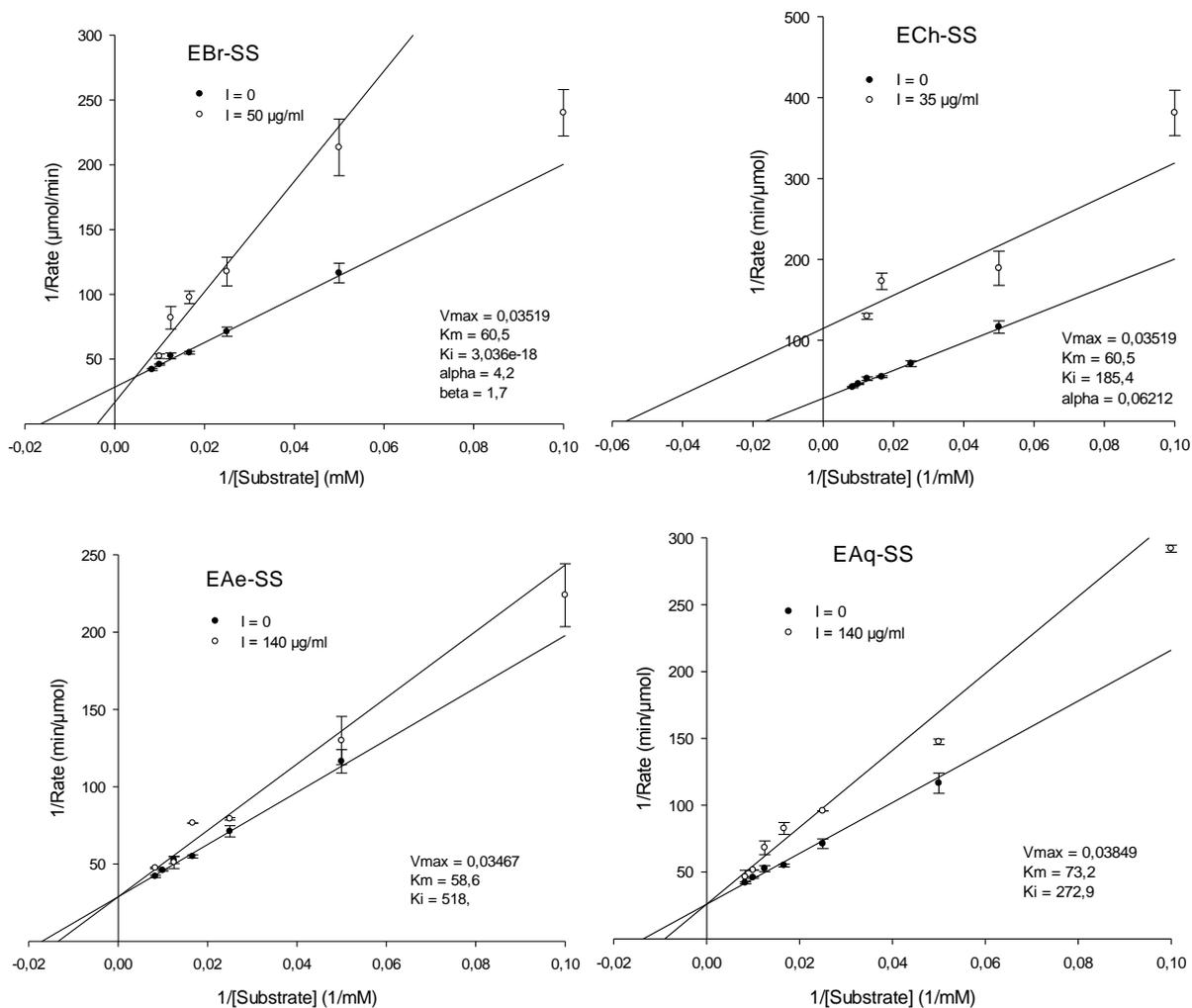


Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par Fe SO₄.



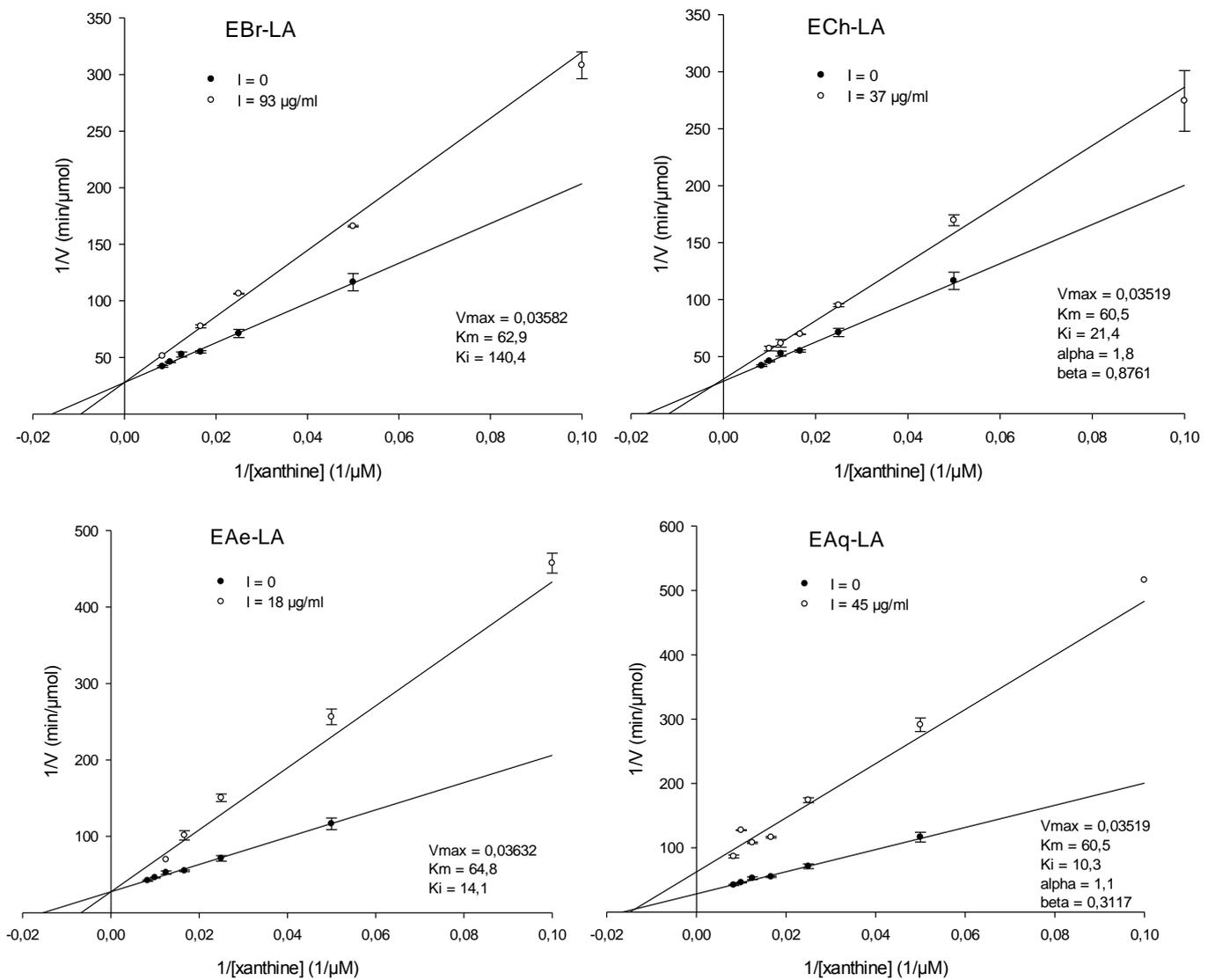
Les courbes d'étalonnage de FeSO₄.7H₂O.

ANNEXE 2



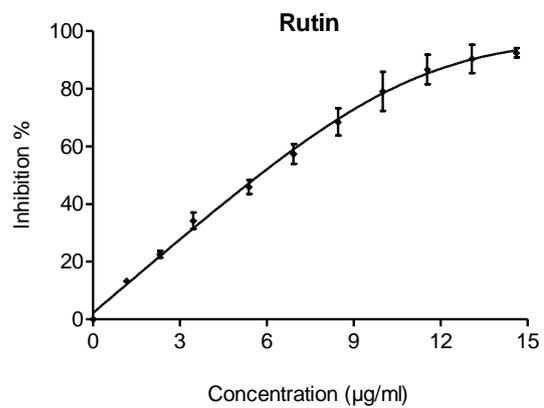
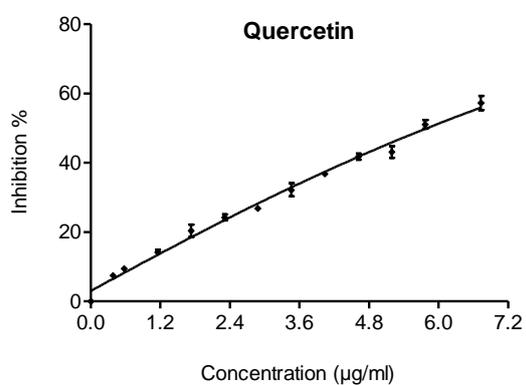
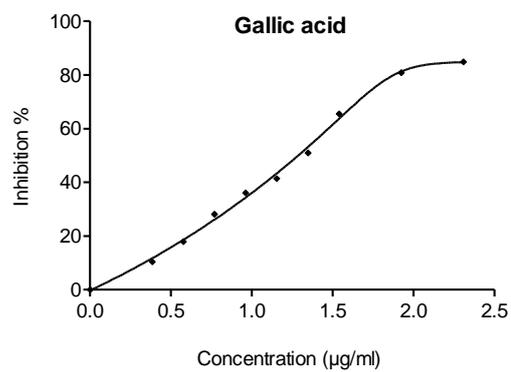
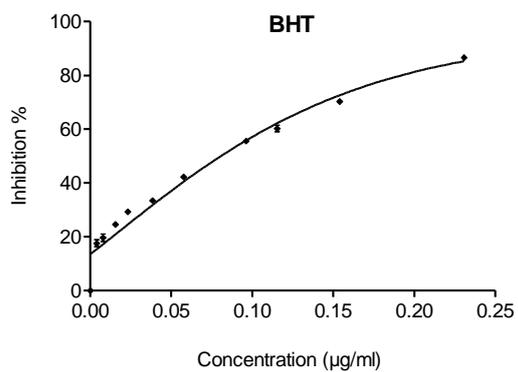
Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de des extraits de SS.

ANNEXE 3



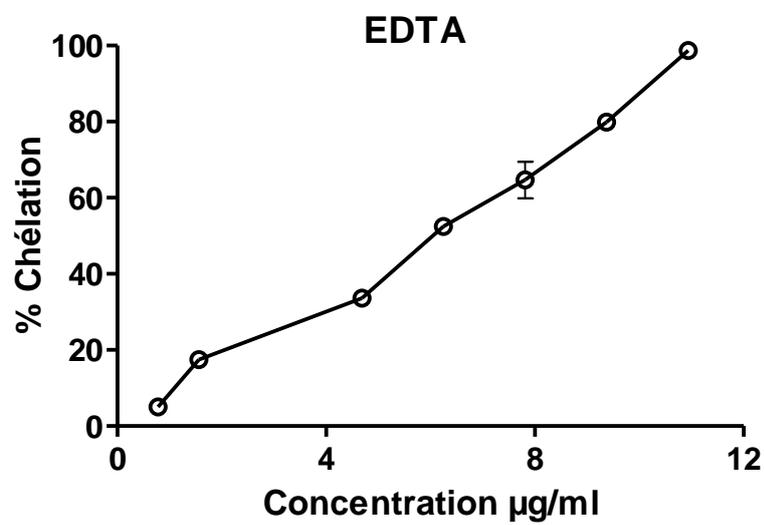
Représentation de Lineweaver-Burk en présence et en absence de des extraits de LA.

ANNEXE 4



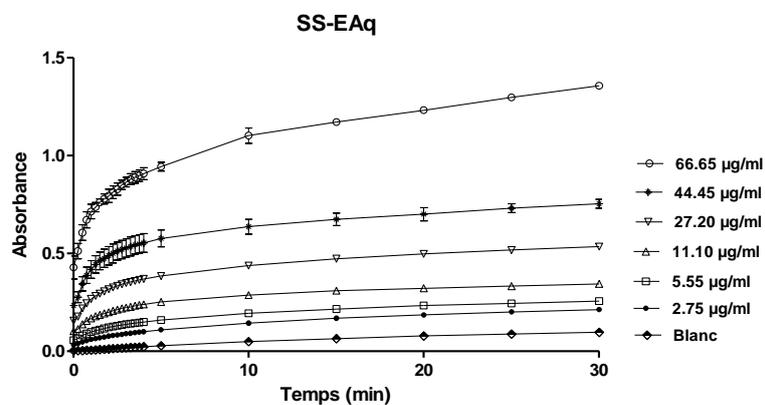
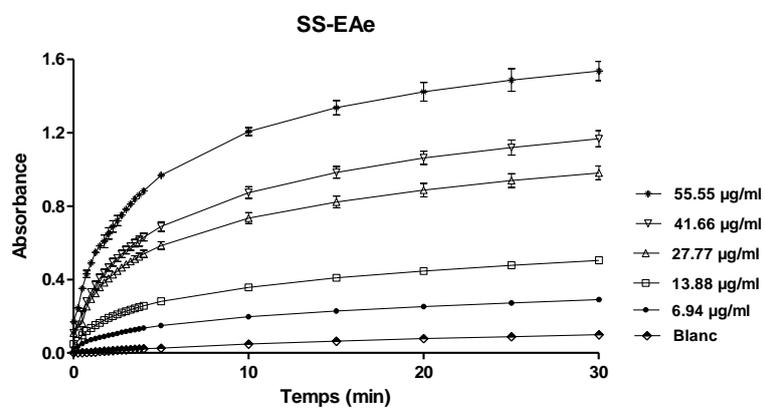
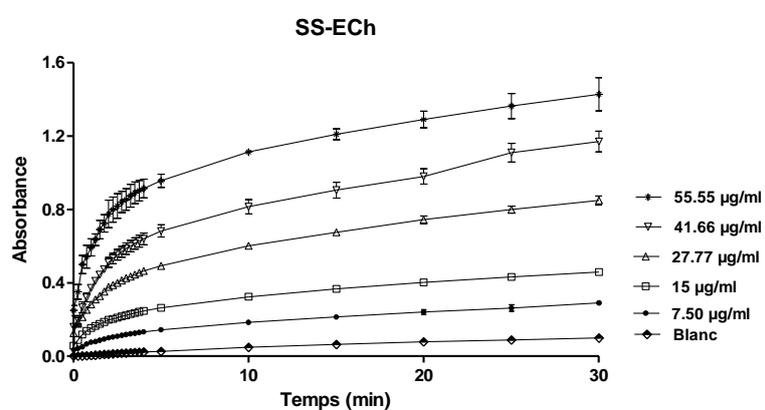
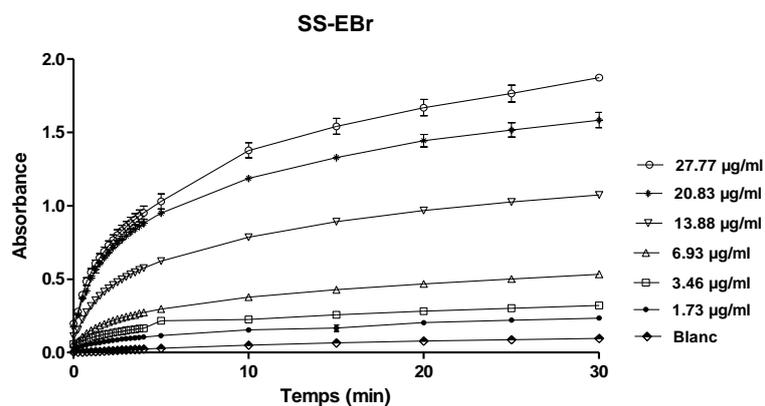
Cinétique d'activité anti-radicalaire (DPPH) des standards.

ANNEXE 5



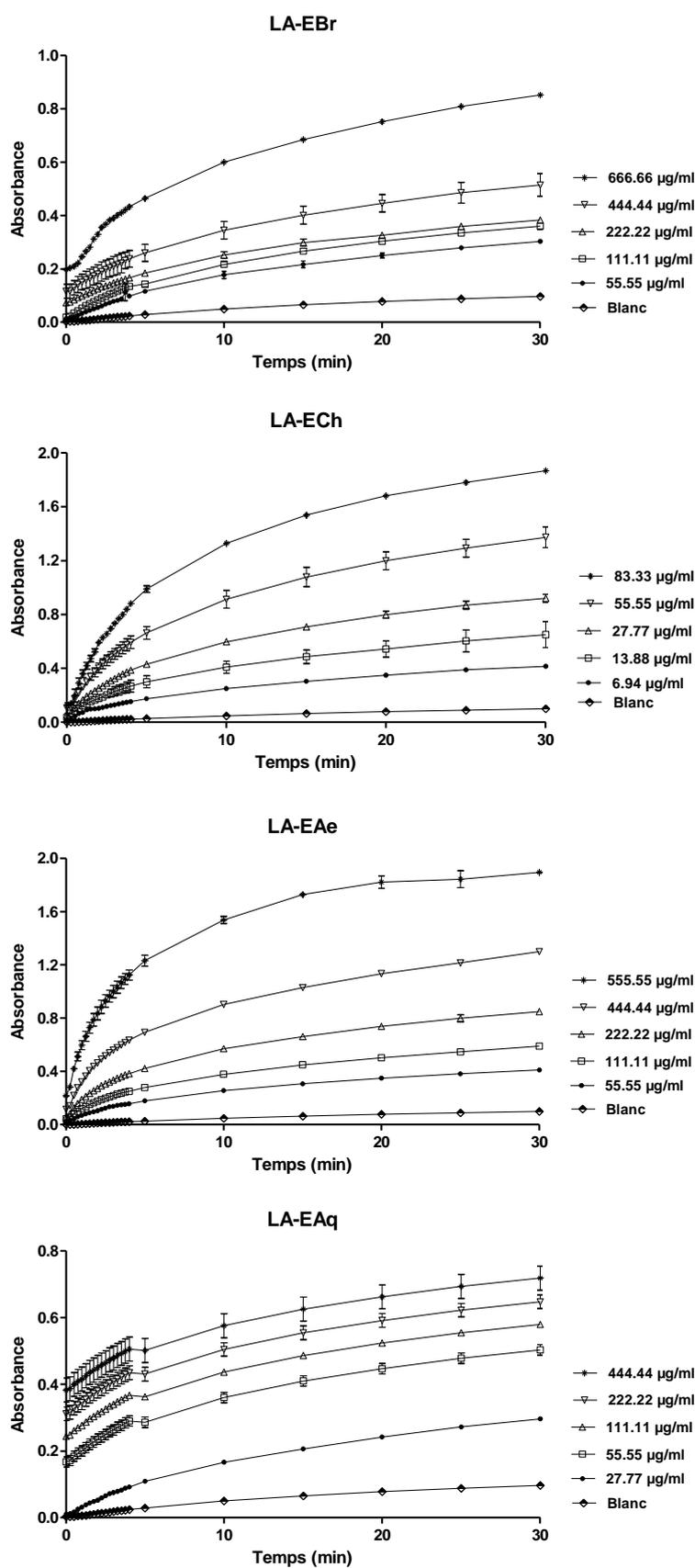
Chélation des ions ferreux d'EDTA.

ANNEXE 6



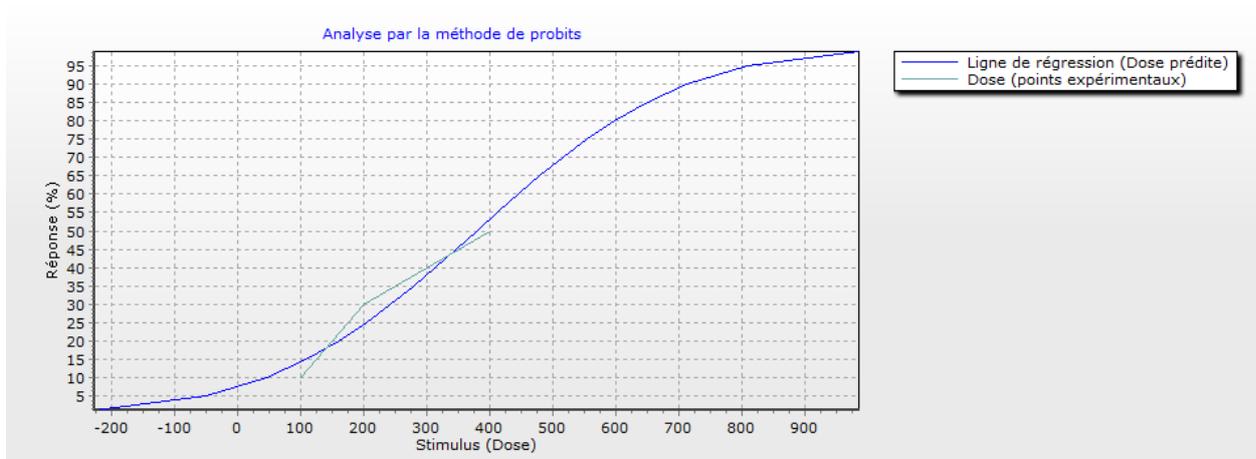
Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par les extraits de SS.

ANNEXE 7

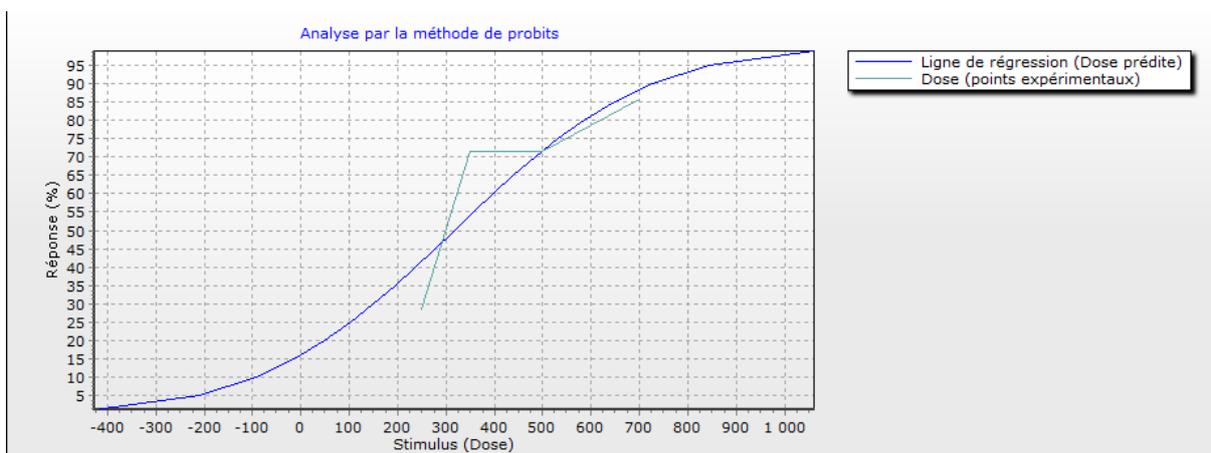


Cinétique de la réduction du TPTZ-Fe³⁺ en TPTZ-Fe²⁺ par les extraits de LA.

ANNEXE 8



Estimation de la DL_{50} chez les souris males traitées par voie intra péritonéale par l'extrait brut méthanolique de SS.



Estimation de la DL_{50} chez les souris males traitées par voie intra péritonéale par l'extrait brut méthanolique de LA.

RESUME

Le but de cette étude est d'évaluer les activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits des parties aériennes de *Sedum sediforme* (SS) et *Lycium arabicum* (LA) utilisées en médecine traditionnelle. Les broyats ont été soumis à une extraction et fractionnement pour avoir quatre extraits : l'extrait brut (EBr), extrait chloroformique (ECh), extrait d'acétate d'éthyle (EAe) et l'extrait aqueux (EAq). La quantité en polyphénols et en flavonoïdes la plus élevée a été présente dans EAe des deux plantes. Des méthodes enzymatiques et non-enzymatiques ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits. La xanthine oxydase (XO) a été purifiée du lait bovin avec un rendement de 23 mg/l, une activité spécifique de 2261 nmole/min/mg, un rapport protéine / flavine de 5.23, et avec une bande majeure d'environ 150 KDa, en SDS-PAGE, indiquant une bonne pureté de l'enzyme. Les extraits EAe-LA et ECh-SS ont révélé l'inhibition de la XO la plus puissante ($IC_{50} = 17.92 \pm 0.19$ et 36.37 ± 2.68 $\mu\text{g/ml}$, respectivement). Une étude *in vivo* a été réalisée par l'injection de 50 mg/Kg de chaque fraction à des souris hyperuricémiques. Toutes les fractions injectées ont montré un effet hypouricémique où l'EAe-LA a provoqué une forte inhibition de la XO sérique (75.15 ± 1.05 %) et l'ECh-SS sur la XO hépatique (67.52 ± 0.97 %). Le test scavenger du DPPH a montré que l'EBr-SS et l'EAe-LA présentent l'effet le plus puissant avec une IC_{50} de 7.09 ± 0.12 et 35.44 ± 0.24 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. L'EBr-SS a montré l'effet le plus élevé dans le test du cytochrome c et le test du NBT avec une IC_{50} de 0.170 ± 0.001 mg/ml et 0.063 ± 0.005 mg/ml, respectivement. Tous les extraits inhibent remarquablement le blanchissement de β -carotène où l'EBr-SS et l'EBr-LA ont exercé l'effet le plus élevé (% I = 89.04 ± 1.008 % et 84.477 ± 0.534 %, respectivement). Les extraits ECh-SS et EAe-LA ont montré une activité chélatrice du Fe^{+2} modérée. Le pouvoir réducteur des extraits a été évalué en utilisant la technique de FRAP. Les extraits ont exercé un pouvoir réducteur remarquable surtout l'EBr-SS (TAP à 30 min = 110.214 ± 5.782 $\mu\text{M Fe}^{+2}/\text{mg}$ d'extrait). Cette activité a été confirmée *in vivo* où l'injection d'EBr-SS (25 et 50 mg/Kg) et d'EBr-LA (50 et 100 mg/Kg) a conduit à l'augmentation de la capacité antioxydante totale du sang et de plasma. De plus, l'effet anti-hémolytique le plus élevé a été observé avec l'EBr-LA (% d'inhibition d'hémolyse = 99 %). L'activité anti-inflammatoire chez les souris en utilisant le PMA a montré que l'EBr-SS (12.5 et 25 mg/Kg) et l'EBr-LA (50 et 100 mg/Kg) ont réduit significativement le poids et l'épaisseur de l'œdème de l'oreille (38.57 ± 1.87 %, 56.58 ± 4.08 % et 34.44 ± 2.59 %, 55.26 ± 4.36 %, respectivement). Ces résultats peuvent être considérés comme point de départ pour des applications de ces plantes en santé pour le traitement de certaines maladies où l'inhibition de la XO est nécessaire.

Mots clés : Anti-hémolytique, Anti-inflammatoire, Antioxydant, Flavonoïdes, Hyperuricémie, Polyphénols, Xanthine oxydase, *Sedum sediforme*, *Lycium arabicum*.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للأوكسدة والمضاد للإلتهاب لنبتتي *Sedum sediforme* (SS) و *Lycium arabicum* (LA) المستعملة في الطب الشعبي. تم استخلاص الأجزاء الهوائية للحصول على أربعة مستخلصات: المستخلص الخام (EBr) ومستخلص الكلوروفورم (ECh) ومستخلص إيثيل الأسيتات (EAe) والمستخلص المائي (EAq). أظهر تقدير كمية عديدات الفينول والفلانويويدات أن EAe للنبتتين يحتوي على أكبر كمية. استعملت طرق إنزيمية وغير إنزيمية لتقييم النشاط المضاد للأوكسدة للمستخلصات. تمت تنقية الإنزيم المؤكسد للكربونين (XO) من حليب البقر بمردود 23 مغ/ل، ونشاطية نوعية 2261 نانومول/دقيقة/مغ، وقدرت نسبة البروتين إلى الفلافين بـ 5.23، كما أظهر الفصل الكهربائي SDS-PAGE شريطا رئيسيا واحدا في حدود 150 كد، مما يدل على النقاوة العالية للإنزيم. أعطى EAe-LA و EBr-SS تثبيطا عاليا ضد إنزيم XO ($IC_{50} = 17.92 \pm 1.05$ و 36.37 ± 2.68 ميكروغ/مل، على الترتيب). بينت دراسة في الكائن الحي (*in vivo*) على فئران مصابة بفرط إنتاج حمض اليوريا، عن طريق حقن 50 مغ/كغ من كل مستخلص، أن كل المستخلصات أدت إلى خفض حمض اليوريا. وقد أعطى EAe-LA تثبيطا عاليا ضد XO في البلازما بنسبة 75.15 ± 1.05 % و SS-ECh ضد XO في الكبد بنسبة 67.52 ± 0.97 %. بين اختبار إزاحة جذر DPPH أن المستخلصين SS-EBr و EAe-LA يملكان أعلى قدرة إزاحية ($IC_{50} = 7.09 \pm 0.12$ و 35.44 ± 0.24 ميكروغ/مل، على الترتيب). كما بينت أن SS-EBr يملك أعلى قدرة إزاحية لجذر $O_2^{\cdot-}$ سواء باختبار cytochrome c أو باختبار NBT ($IC_{50} = 0.170 \pm 0.001$ و 0.063 ± 0.005 مغ/مل، على الترتيب). أما نتائج اختبار تبيض البيتاكاروتين فقد أثبتت أن المستخلصات تملك نشاطا معتبرا مضادا للأوكسدة حيث أظهر EBr للنبتتين SS و AL النشاط الأكبر بنسبة (89.04 ± 1.00 % و 84.47 ± 0.53 %، على الترتيب). أظهر كل من SS-EBr و EAe-LA قدرة متوسطة في استخلاص أيونات الحديد الثنائي (Fe^{2+}). من جهة أخرى، بين تقدير القدرة الإرجاعية لمختلف المستخلصات بتقنية FRAP أن المستخلصات تملك قدرة إرجاعية جد معتبرة خاصة SS-EBr (TAP في 30 د = 110.21 ± 5.78 ميكرومول Fe^{2+} / مغ من المستخلص). وتم إثبات هذه النشاطية *in vivo* حيث أدى حقن المستخلصات SS-EBr (25-50 مغ/كغ) و EAe-LA (50-100 مغ/كغ) إلى زيادة في النشاطية الكلية المضادة لأوكسدة الدم والنشاطية المضادة للبلانزما. أظهر SS-EBr المستخلص النشاطية المضادة لتحلل كريات الدم الحمراء بنسبة 99 %. كما أظهرت النشاطية المضادة للإلتهاب بإستعمال PMA عند الفئران أن المستخلص SS-EBr (25 مغ/كغ) و EAe-LA (100 مغ/كغ) أديا إلى خفض وزن وسمك وذمة الأذن (38.57 ± 1.87 %، 56.58 ± 4.08 % و 34.44 ± 2.59 %، 55.26 ± 4.36 %، على الترتيب). يمكن اعتبار هذه النتائج نقطة بداية لاستعمال هذه النباتات في مجال الصحة خاصة في علاج الأمراض التي تتطلب تثبيط إنزيم XO.

الكلمات المفتاحية: مضادات الإنحلال الدموي، مضادات الإلتهاب، مضادات الأوكسدة، الفينولات، إنتاج مفرط من اليوريا، عديدات الفينول، إنزيم مؤكسد للكربونين، *Sedum sediforme*، *Lycium arabicum*.