

République Algérienne Démocratique et Populaire.
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.
Université Abderrahmane Mira de Béjaia.

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
Département de Biologie Physico-Chimique.

Mémoire
Présenté en vue d'obtention du diplôme de
Magister
en Biologie
Option : Biologie Moléculaire

Thème :

Evaluation des activités anti-xanthine oxydase et anti-radicalaire
des extraits de bourgeons de *Populus nigra* et des feuilles de
Fraxinus angustifolia.

Présenté par : M^{elle} Adrar Sabah.

Devant le jury :

Président : Makhloufi L.

(Professeur, Université de Béjaia)

Promoteur : Atmani D.

(Maître de Conférences, Université de Béjaia)

Copromotrice : Debbache N.

(Maître Assistante, Université de Béjaia)

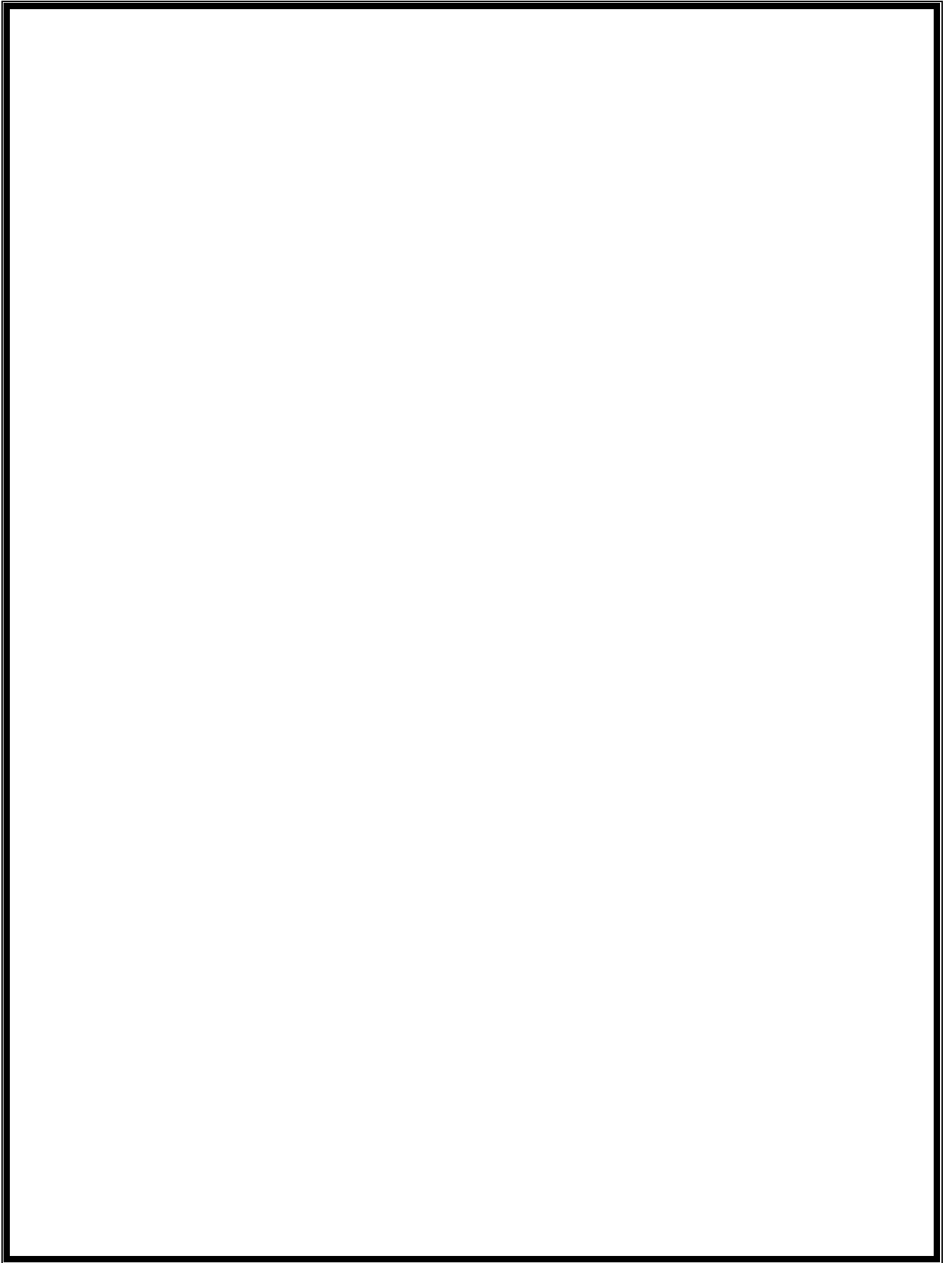
Examineurs : Benabdesselam F.

(Maître de Conférences, Université de Béjaia)

Tamendjari A.

(Maître de Conférences, Université de Béjaia)

Année 2009



Remerciements

- Je tiens à remercier en premier lieu mon promoteur, D^r Atmani D. pour avoir proposé ce thème très intéressant, pour m'avoir bien accueillie dans son laboratoire où tout nous a été fourni généreusement et pour toute son aide et ses conseils précieux qui m'ont toujours orienté vers le bon chemin.
- Je remercie infiniment ma très chère copromotrice, M^e Debbache N. pour son grand soutien tout au long de la période de préparation du mémoire de Magister. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour son aide inestimable, son sérieux et sa gentillesse, car elle a toujours su m'orienter de manière très efficace.
- Je remercie le président du jury, P^r Makhloufi L. pour m'avoir consacré de son temps en nous faisant l'honneur d'accepter de présider le jury.
- Je remercie également l'examinatrice, D^r Benabdesselam F. pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.
- Je remercie l'examineur, le D^r Tamendjary A. pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.
- Je remercie M^e Atmani pour son aide au laboratoire et pour ses conseils.
- Je remercie énormément M^e Ouehmed H. pour son grand soutien et pour tous ses bons conseils.
- Je remercie profondément M^{elle} Berboucha M. et M^{elle} Ayouni K. pour leur aide inestimable tout au long de la période de préparation du mémoire de Magister, pour leur grande générosité et leur sympathie.
- Je remercie beaucoup M^{elle} Lounis H. et M^{elle} Chaher N. pour leur aide et leurs conseils.
- Je tiens à remercier M^{elle} Tahiri W. et M^r Boukeroui D. pour leur grand soutien.
- Finalement, je remercie tous ceux qui ont pu m'apporter de l'aide pour la réalisation de ce modeste travail.

Résumé

Les radicaux libres sont des composés très réactifs, qui en s'attaquant aux molécules biologiques, ils altèrent leurs structures et leurs fonctions. La xanthine oxydoréductase (XOR) est une source importante de radicaux libres. C'est une métalloflavoenzyme qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique. Ainsi, la production excessive d'acide urique et de radicaux libres par la XOR est à l'origine de plusieurs pathologies dont : la goutte, l'ischémie reperfusion, le vieillissement et le cancer. Afin de remédier à ces maladies, les deux plantes, *Populus nigra* et *Fraxinus angustifolia*, ont été choisies sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle pour traiter les inflammations et les rhumatismes. Pour ce fait, les extraits de ces plantes ont été testés pour leur effet inhibiteur sur la XOR et pour leur activité antioxydant en relation avec leurs teneurs en composés phénoliques. Les activités antioxydants des extraits de *Populus nigra* et de *Fraxinus angustifolia* ont été faibles, en dépit de leurs teneurs élevées en composés phénoliques. Cependant, les résultats ont exhibé une très forte activité inhibitrice de la XOR par l'extrait aqueux du chloroforme des bourgeons de *Populus nigra* ($IC_{50} = 60,27 \mu\text{g/ml}$), due sans doute à sa richesse en flavonoïdes, particulièrement, la quercétine révélée par la chromatographie sur couche mince. Les fractions chromatographiques ont exhibé une activité inhibitrice de la XOR supérieure à celle de l'extrait brut de *Populus nigra*. Ces résultats plaident en faveur de l'utilisation des bourgeons de *Populus nigra* en médecine pour remédier à la goutte.

Abstract

Free radicals are reactive compounds which can alter the structure and function of biological molecules. The xanthine oxidoreductase (XOR) is an important source of free radicals. It is a metalloflavoenzyme which catalyzes the oxidation of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid. Thus, the excessive production of free radicals and uric acid by XOR make it the cause of many diseases, such as, gout, ischemia reperfusion, aging and cancer. In order to remedy these illnesses, two local plants, *Populus nigra* and *Fraxinus angustifolia*, were chosen on the basis of their use in traditional medicine in the treatment of inflammation and rheumatism. This is why plant extracts were tested for their xanthine oxidase inhibitory effect and antioxidant activity, in relation to their phenolic compounds contents. *Populus nigra* and *Fraxinus angustifolia* extracts antioxidant activities were low despite their high levels of phenolic compounds. However, *Populus nigra* aqueous extract from chloroform exhibited a high xanthine oxidase inhibitory effect ($IC_{50} = 60,27 \mu\text{g/ml}$), due to its high flavonoids amount, especially, quercetin revealed by thin layer chromatography. Finally, column chromatography fractions exhibited a better xanthine oxidase inhibitory effect than the raw extract of *Populus nigra*. This study shows the importance of *Populus nigra* buds utilization in medicine for treating pathologies whose XOR is the main cause.

ملخص

الجذور الحرة هي مركبات عالية التفاعل ، والتي بتفاعلها مع الجزيئات البيولوجية ، تغير بنيتها ووظيفتها. الكزنيتين المؤكسد المرجع (XOR) تعد مصدرا مهما للجذور الحرة و هي عبارة عن أنزيم يحفز اكسدة الايبوكزنيتين والكزنيتين الى حمض اليوريك. وهكذا ، فإن الإفراط في إنتاج حمض اليوريك ، والجذور الحرة من قبل الكزنيتين المؤكسد المرجع هو سبب العديد من الأمراض بما فيها النقرس ، الشبخوخة والسرطان. لمعالجة هذه الأمراض ، النباتات الصفصاف والدردار اختيرت على أساس استخدامها في الطب التقليدي لعلاج الروماتيزم والالتهابات. لذلك ، تم اختبارمستخلصات الصفصاف والدردار لتنشيط نشاط الكزنيتين المؤكسد المرجع و تفاعلات الاكسدة بالنسبة لمحتوياتها لمركبات الفينول. إن تثبيط تفاعلات الاكسدة من طرف براعم الصفصاف و اوراق الدردار يبقى منخفض، على الرغم من ارتفاع مستويات مركبات الفينول. أظهرت النتائج تثبيط قوي لنشاط الكزنيتين المؤكسد المرجع من طرف المستخلص المائي من الكلوروفورم لبراعم الصفصاف ($IC_{50} = 60,27 \mu\text{g/ml}$) ربما بسبب احتوائه على الفلافونويد، خاصة الكارستين التي كشفت بالتسجيل اللوني على طبقة رقيقة. التسجيل اللوني العمودي سمح بالحصول على اربعة اجزاء و التي اظهرت تثبيط نشاط الكزنيتين المؤكسد المرجع اكبر من المستخلص الخام للصفصاف الذي اشتقت منه. هذه النتائج تدعم استخدام براعم الصفصاف في الطب لعلاج النقرس.

Sommaire

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
I-Les radicaux libres.....	2
I-1-Formation des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène.....	2
I-2-Stress oxydant.....	4
I-3-Conséquences du stress oxydant.....	4
I-3-1-Peroxydation lipidique.....	4
I-3-2-Oxydation des protéines.....	6
I-3-3-Oxydation de l'ADN.....	7
II-La xanthine oxydoréductase.....	8
II-1-Structure cristalline.....	8
II-2-Réactions catalysées par la XOR.....	9
II-3-Mécanisme d'action.....	11
II-4-Conversion de la XDH en XO.....	12
II-5-Rôles physiologiques.....	14
II-5-1-Catabolisme des purines.....	14
II-5-2-Rôle antimicrobien.....	15
II-5-3-Transduction du signal.....	15
II-5-4-Rôle de la XOR dans la sécrétion du lait.....	15
II-6-Rôles pathologiques.....	16
II-6-1-Hyperuricémie.....	16
II-6-2-Syndrome d'ischémie reperfusion.....	16
III-Les composés phénoliques.....	18
III-1-Biosynthèse.....	18
III-2-Principales classes.....	19
III-3-Rôles physiologiques.....	23
III-4-Activité anti-radicalaire.....	24
III-5-Activité anti-xanthine oxydase.....	29

Partie pratique

I- Matériels et méthodes.....	36
I-1-Description des plantes.....	36
I-2-Cueillette et identification des plantes.....	37
I-3-Séchage, broyage et tamisage.....	37
I-4-Préparation des extraits.....	37
I-5-Dosage des composés phénoliques.....	38
I-6-Caractérisation des extraits.....	40
I-7-Purification de la XO.....	40
I-8-Test d'inhibition de la XO.....	42
I-9-Activités antioxydants des extraits.....	42
I-9-1-Inhibition de la formation du radical hydroxyle.....	42
I-9-2-Inhibition de la peroxydation lipidique.....	43
I-10-Fractionnement des extraits.....	44
I-11-Etude statistique.....	44
II-Résultats et discussion.....	45
II-1- Extraction.....	45
II-2-Dosage des composés phénoliques.....	46
II-3-Caractérisation des extraits.....	51
II-4-Cinétique d'inhibition de la XO.....	54
II-5-Inhibition de la formation du radical hydroxyle.....	57
II-6-Inhibition de la peroxydation lipidique.....	59
II-7-Caractérisation des fractions.....	63
Conclusion et perspectives.....	64
Références bibliographiques.....	66
Annexes	

Liste des figures

Figure 01 : activité de la NO synthase endothéliale et formation du peroxy-nitrite.....	4
Figure 02 : formation du malondialdéhyde (MDA) à partir de l'acide linoléique (A), et formation d'un chromophore entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (B).....	6
Figure 03: illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles sur une base de l'ADN, la guanine.....	7
Figure 04 : structure moléculaire du dimère de la xanthine déshydrogénase (XDH).....	8
Figure 05 : schéma montrant l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique.....	9
Figure 06: génération du NO [•] et du peroxy-nitrite catalysée par la XOR.....	10
Figure 07 : un diagramme schématique montrant l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine catalysée par la XOR.....	11
Figure 08: mécanisme d'action de la XO.....	11
Figure 09 : schéma montrant le transfert des électrons entre les domaines de la XOR.....	12
Figure 10 : stéréo représentation du changement dans la conformation montré par une boucle du site actif (Gln-423-Lys-433) dans la transition XDH à XO.....	13
Figure 11 : représentation schématique du mécanisme de la conversion de la XDH en XO.....	13
Figure 12 : un diagramme schématique de la voie de dégradation des purines.....	14
Figure 13 : mécanisme des lésions induites par les radicaux libres médiés par la XO.....	17
Figure 14 : diagramme de la voie de biosynthèse des polyphénols.....	18
Figure 15 : structures des acides phénoliques communs : (a) les dérivés d'acide benzoïque et (b) les dérivés d'acide cinnamique.....	19
Figure 16: structures chimiques des dérivés de coumarines.....	20
Figure 17: structure de base des flavonoides.....	20
Figure 18 : structures chimiques des tannins.....	23
Figure 19: les caractéristiques structurales des flavonoides avec une haute activité de piégeage du radical.....	28
Figure 20: structure chimique de l'hypoxanthine et de l'allopurinol.....	30
Figure 21: modèle moléculaire de liaison des phénylpropanoïdes au site actif de la XO.....	31
Figure 22: modèles moléculaires de la liaison des coumarines au site actif de la XO.....	32
Figure 23: modèle moléculaire de la liaison des flavonoides au site actif de la XO.....	34
Figure 24 : Photographie des bourgeons de <i>Populus nigra</i>	36

Figure 25 : Photographie des feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	36
Figure 26: schéma d'extraction.....	38
Figure 27 : protocole de purification de la xanthine oxydase.....	41
Figure 28 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits de bourgeons de <i>Populus nigra</i>	46
Figure 29 : Teneurs en phénols totaux des extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	47
Figure 30 : Teneurs en flavonoides des extraits de bourgeons de <i>Populus nigra</i>	48
Figure 31 : Concentrations en flavonoides des extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	49
Figure 32 : Concentrations en tannins des extraits de bourgeons de <i>Populus nigra</i>	50
Figure 33 : Teneurs en tannins des extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	50
Figure 34 : profile chromatographique des extraits de bourgeons de <i>Populus nigra</i> réalisé à la lumière du jour.....	51
Figure 35 : profile chromatographique de tous les extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i> réalisé à la lumière du jour.....	52
Figure 36 : profile chromatographique pour les extraits de bourgeons de <i>Populus nigra</i> obtenu après révélation par la vanilline sulfurique.....	53
Figure 37 : vue sous UV de la plaque chromatographique des extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	54
Figure 38 : Pourcentages d'inhibition de l'activité de la XO par les extraits de bourgeons de <i>Populus nigra</i>	55
Figure 39 : Inhibition de l'activité de la XO par les différentes concentrations de l'extrait aqueux du chloroforme de <i>Populus nigra</i>	56
Figure 40 : Inhibition de l'activité de la XO par différentes concentrations en allopurinol.....	57
Figure 41 : Inhibition de la formation du radical hydroxyle par les extraits de bourgeons de <i>Populus nigra</i>	57
Figure 42: Inhibition de la formation du radical hydroxyle par les extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	58
Figure 43 : Inhibition de la formation du radical hydroxyle par les différentes concentrations de catéchine.....	59
Figure 44 : Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de <i>Populus nigra</i>	60
Figure 45 : Inhibition de la peroxydation lipidique par les différentes concentrations de l'extrait aqueux du chloroforme de <i>Populus nigra</i>	61
Figure 46 : Inhibition de la peroxydation lipidique par les différentes concentrations de BHA.....	61
Figure 47 : Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de feuilles de <i>Fraxinus angustifolia</i>	62
Figure 48 : Inhibition de l'activité de la XO par les fractions éthanoliques des bourgeons de <i>Populus nigra</i>	63

Liste des tableaux

Tableau I : structures chimiques des flavonoides et quelques exemples.....	21
Tableau II : les pourcentages d'extraction des extraits de <i>Populus nigra</i> et de <i>Fraxinus angustifolia</i>	45

Introduction

Introduction

Jadis, les maladies étaient traitées par l'utilisation des plantes médicinales de différentes espèces. Cependant, le développement du domaine chimique a orienté les scientifiques vers la synthèse de principes actifs d'une manière abondante et hâtive, sans pour autant se soucier de l'action peu spécifique de ces agents. Ainsi, l'apparition de plus en plus d'anomalies au niveau de l'organisme, résultant des effets secondaires non souhaités de ces médicaments, a contraint les chercheurs à s'investir dans d'autres voies de guérison, particulièrement, celle de la phytothérapie. En effet, les plantes constituent une source naturelle de composés biochimiques doués d'une multitude de fonctions biologiques, en particulier, les composés phénoliques qui jouent le rôle d'agents antimicrobiens (Falleh et *al.*, 2008), anti-oxydants (Aberoumand et Deokule, 2008), anti-allergiques (Dykes et Rooney, 2007) et anti-athérogéniques (Borochoy-Neori et *al.*, 2008).

La xanthine oxydoréductase (XOR), une enzyme ubiquitaire dont la fonction principale réside dans le catabolisme des purines en produisant de l'acide urique, est une source importante de radicaux libres. Les radicaux libres sont des composés ayant la propriété d'oxydation des molécules biologiques, induisant ainsi l'altération de la structure et de la fonction de ces dernières (Favier, 2003). L'inhibition de la XOR peut avoir deux rôles, en plus de la diminution de la production de l'acide urique elle peut prévenir la formation des espèces réactives de l'oxygène. Ainsi la recherche d'inhibiteurs de la XOR peut être bénéfique non seulement pour traiter la goutte (Kong et *al.*, 2000) et les maladies qui lui sont associées mais aussi pour traiter d'autres pathologies provoquées par les espèces réactives de l'oxygène telle que l'inflammation (Borges et *al.*, 2002), l'ischémie-reperfusion (McCord, 1985; Granger et *al.*, 1986), le vieillissement (Ames et *al.*, 1981) et bien d'autres maladies (Martinez-Cayuela, 1995). Les antioxydants d'origine naturelle avec une activité scavenging des radicaux libres et inhibitrice des enzymes prooxydantes peuvent être impliqués dans la prévention et la thérapeutique des maladies dans lesquelles les oxydants ou les radicaux libres sont impliqués.

Les deux plantes, le peuplier noir (*Populus nigra*) et le frêne (*Fraxinus angustifolia*) sont utilisées en médecine traditionnelle pour soigner diverses pathologies dont: les maladies inflammatoires et les rhumatismes (Häne et Dobbertin, 2006 ; Baba Aïssa, 1991), sans pour autant s'intéresser à isoler, purifier et à connaître leurs constituants biochimiques auteurs de ces effets recherchés. Ainsi, la capacité antioxydant *in vitro* des extraits préparés à partir des deux plantes médicinales a été testée, en évaluant les activités inhibitrices de la xanthine oxydase, de la peroxydation lipidique et de la formation du radical hydroxyle. Des dosages de composés phénoliques et une caractérisation des extraits ont été réalisés afin d'établir des corrélations entre les différentes activités étudiées et les composés phénoliques.

Synthèse bibliographique

I-Les radicaux libres

Un radical libre est un atome ou une molécule qui contient un ou plusieurs électrons non appariés, comme conséquence de la perte d'un ou plusieurs électrons de l'orbite externe, aboutissant à la formation d'une demi-liaison qu'il faut satisfaire par un pillage local d'électrons (Berger, 2006). Les radicaux libres sont des composés caractérisés par une structure électronique déséquilibrée qui leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires (Aurousseau, 2002).

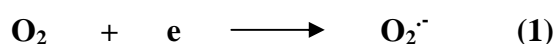
En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électrons à partir de l'oxygène (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Les espèces prooxydantes sont représentées par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives du nitrogène (ERN) (Groussard, 2006), qui sont les produits du métabolisme cellulaire normal et à des concentrations faibles à modérées elles sont connues de posséder des rôles physiologiques variés allant de la transduction du signal cellulaire à la défense contre les pathogènes (Dastmalchi et *al.*, 2007).

Les radicaux libres les plus courants sont le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). D'autres molécules, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ion peroxydrite ($ONOO^{\cdot}$) ne sont pas des radicaux libres mais ils peuvent en générer par différentes réactions chimiques (Ré et *al.*, 2005).

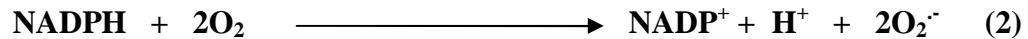
I-1-Formation des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène

I-1-1-L'anion superoxyde

Un des sites de production du plus simple des radicaux libres oxygénés, l'anion superoxyde, est la mitochondrie, dans l'organisme au repos (Aurousseau, 2002). La formation d'anion superoxyde par la chaîne respiratoire mitochondriale est un événement physiologique correspondant à une fuite d'électrons au niveau des complexes I et III, qui ne dépasse pas 3 à 5% de la production mitochondriale (Beaudeau et *al.*, 2006). Alors que la majorité de l'oxygène consommé par la mitochondrie est converti en eau au niveau du complexe IV (cytochrome C oxydase), l'oxygène peut récupérer les électrons directement à partir du site de l'ubiquinone dans le complexe III et à partir du groupement de la flavine mononucléotide du complexe I pour générer l' $O_2^{\cdot-}$ (Ballinger, 2005 ; Ré et *al.*, 2005).



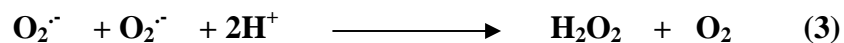
La source principale de l' $O_2^{\cdot-}$ au niveau des cellules phagocytaires activées est l'enzyme NADPH oxydase réduite, localisée à la surface externe de la membrane plasmique, selon la réaction suivante (Mohazzab et *al.*, 1994).



Plusieurs enzymes produisent le $\text{O}_2^{\cdot-}$, dont la xanthine oxydase, la glucose oxydase... (Rashba et *al.*, 1990).

I-1-2-Le peroxyde d'hydrogène

Le radical superoxyde est peu réactif, il ne traverse pas les membranes cellulaires et il est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène lors de la réaction suivante, catalysée par un des membres de la famille des superoxydes dismutases (SOD) (Ré et *al.*, 2005 ; Afonso et *al.*, 2007).



La xanthine oxydoréductase produit également le peroxyde d'hydrogène par plusieurs réactions (Lin et *al.*, 2008).

I-1-3-Le radical hydroxyle

Une espèce hautement réactive, qui peut être générée durant la réaction de Haber-Weiss/Fenton qui consiste en une étape de réduction du fer par le $\text{O}_2^{\cdot-}$ et une étape de génération de OH^{\cdot} via la réaction de Fenton (Nunoshiba et *al.*, 1999).

Le peroxyde d'hydrogène est également peu réactif mais il a la capacité de traverser les membranes cellulaires et, en présence de métaux de transition tel que le Fe^{2+} , de se transformer en un puissant oxydant, le radical hydroxyle, selon la réaction suivante (ou réaction de Fenton) (Ré et *al.*, 2005) :



Le radical superoxyde peut réduire le Fe^{3+} et régénérer le Fe^{2+} , selon la réaction:



Le bilan de ces deux dernières réactions (ou réaction d'Haber-Weiss) est donc :



I-1-4-Le radical oxyde nitrique

La principale source de NO^{\cdot} endogène chez les mammifères est la voie métabolique de la L-arginine qui est constitutivement active dans une variété de types cellulaires via l'action des différentes isoformes de NO synthase (NOS) (figure 01) (Pipenbaher et *al.*, 2009).

En outre, la xanthine oxydoréductase génère le radical oxyde nitrique en réduisant le nitrite (Martin et al., 2004).

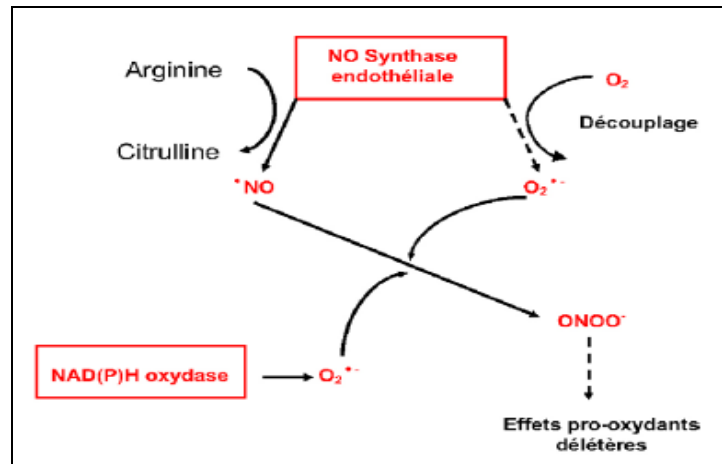


Figure 01 : activité de la NO synthase endothéliale et formation du peroxyde d'azote (Beaudeau et al., 2006).

I-2-Stress oxydant

Un stress oxydant est un déséquilibre profond entre antioxydants et prooxydants en faveur de ces derniers (Pincemail et al., 2002).

In vivo, plusieurs systèmes biochimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue d'ERO. L'altération de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie est une première cause de l'augmentation du stress oxydant (Edeas, 2005). En outre, l'inflammation est un facteur important dans la génération du stress oxydant (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

D'autres systèmes entrent en ligne de compte dans la production massive d'ERO comme l'activation de la xanthine oxydase, l'oxydation de l'hémoglobine, la libération du fer libre, le métabolisme accru des prostaglandines ou encore l'activation des cellules endothéliales. L'environnement dans lequel nous vivons mais aussi notre mode de vie sont à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans notre organisme. En voici quelques exemples :

exposition prolongée au soleil, exposition aux radiations, contacts avec des agents cancérogènes (amiante), tabagisme, prise de médicaments, pilule contraceptive, pratique trop intense ou mal gérée d'un sport, consommation excessive d'alcool, stress intellectuel, stress thermique, ozonothérapie, pollution, agents infectieux....(De Goursac, 2006).

I-3-Conséquences du stress oxydant

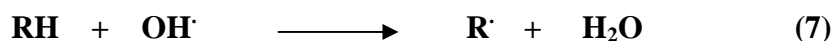
I-3-1-Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit en présence d'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelque soit leur origine (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés.

L'étude des mécanismes de la peroxydation lipidique et des moyens de la prévenir par les antioxydants connaît depuis les dernières décennies un regain d'intérêt dû aux implications de ces phénomènes dans les domaines de la nutrition et de la santé. La caractéristique de l'autooxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) par l'oxygène à l'état fondamental ($^3\text{O}_2$) est d'être une réaction en chaîne radicalaire qui se déroule en trois étapes : initiation, propagation et terminaison (Cillard et Cillard, 2006).

Initiation

L'initiation consiste en l'abstraction par un radical libre d'un atome d'hydrogène d'un groupement méthylène ($-\text{CH}_2-$) surtout s'il est adjacent à une double liaison. Le radical formé se stabilise, sous forme de diène conjugué, par résonance (Baudin, 2006 ; Levasseur-Acker et *al.*, 1995).



Propagation

Le radical alkyle formé dans l'étape d'initiation réagit très rapidement avec le $^3\text{O}_2$ pour donner un radical peroxy. Cette étape est très rapide comparée à la réaction suivante où il y a transfert d'un atome d'hydrogène d'une molécule d'acide gras voisine pour former un hydroperoxyde. C'est l'étape de propagation de la peroxydation car l'acide gras qui vient de donner son hydrogène est transformé en radical alkyle qui retourne dans le cycle pour réagir avec le $^3\text{O}_2$ et donner un radical peroxy.

Il a été calculé que lorsqu'un radical initie la peroxydation, environ 25 molécules d'acides gras sont oxydées dans la phase de propagation. Il est à noter que l'oxydabilité des acides gras augmente avec le nombre de doubles liaisons (Cillard et Cillard, 2006 ; Levasseur-Acker et *al.*, 1995).



Terminaison

Elle correspond à la disparition des peroxydes, à l'accumulation des composés secondaires d'oxydation, c.à.d. à l'oxydation complète du substrat (Jude, 2004 ; Rahmani, 2007).



Il existe de nombreux marqueurs de la peroxydation lipidique, dont le malondialdéhyde (MDA). Il résulte de la dégradation des hydroperoxydes formés au cours de la peroxydation des AGPI (figure 02) (Guichardant et *al.*, 2006).

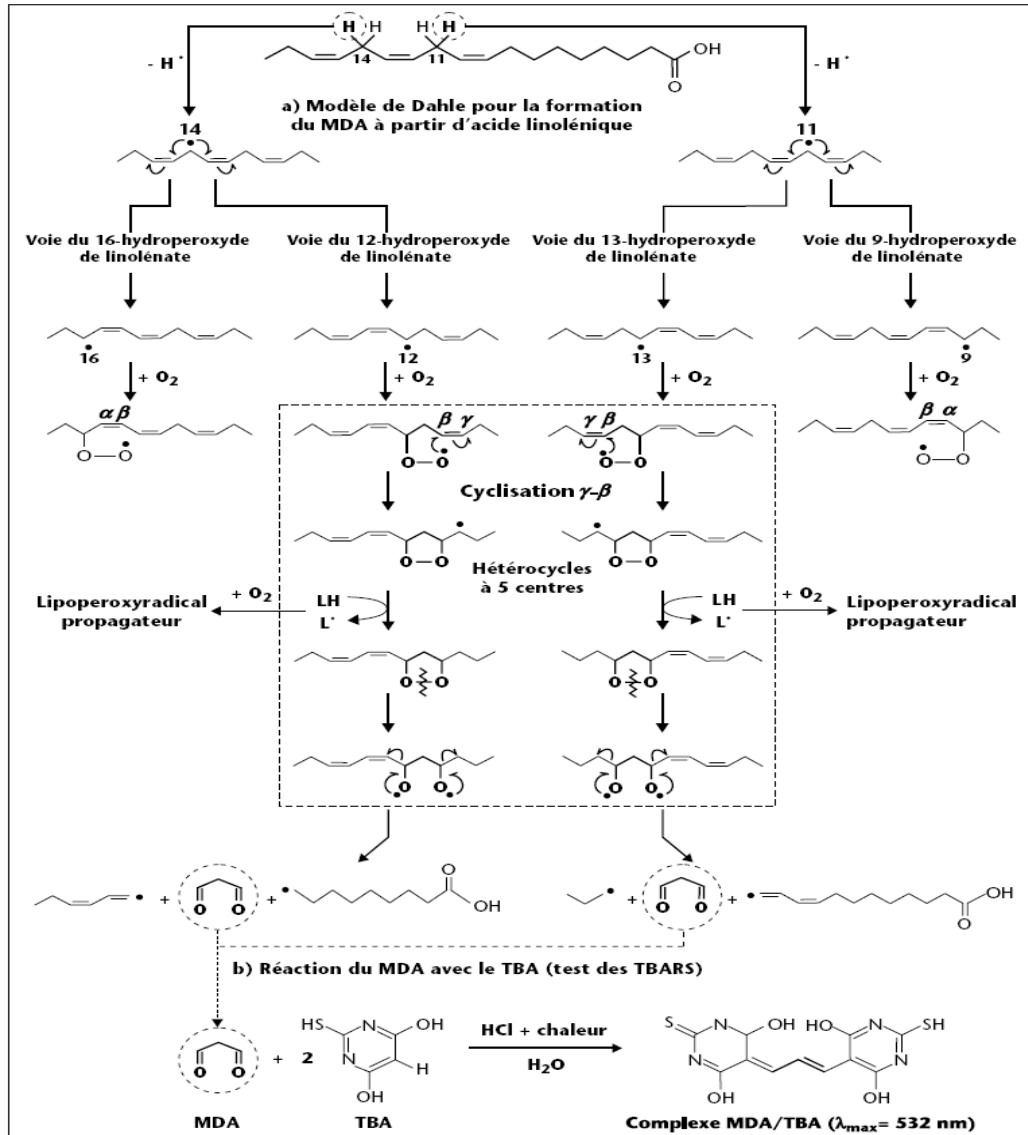


Figure 02 : formation du malondialdéhyde (MDA) à partir de l'acide linoléique (A), et formation d'un chromophore entre l'acide thiobarbiturique (TBA) et le malondialdéhyde (B) (Laguerre et *al.*, 2007).

I-3-2-Oxydation des protéines

Les ERO sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines, altérant ainsi leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical $\text{OH}\cdot$ s'additionne, modifiant la conformation de la protéine.

Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines. Les ERO sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (Favier, 2003).

I-3-3-Oxydation de l'ADN

Les ERO peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. Il peut y avoir jusqu'à 70 modifications oxydatives différentes des acides nucléiques, certaines affectant les bases d'autres induisant des cassures dans les brins (Ré et *al.*, 2005).

Dans les conditions physiologiques, on estime que l'ADN nucléaire présente une base modifiée par les ERO pour 130000 bases, et même une pour 8000 dans l'ADN mitochondrial particulièrement vulnérable. Le radical OH[•] est le plus réactif envers les bases azotées et les sucres des acides nucléiques (figure 03). Par exemple, la guanine peut être oxydée en 8-hydroxy-guanine ; les atomes 4 et 5 peuvent aussi être touchés et des attaques semblables ont été retrouvées sur les mêmes atomes de l'adénine ainsi que sur les carbones du noyau ou du groupement méthyle de la thymine, par exemple pour former du thymidine-glycol. Le ribose et le désoxyribose peuvent être oxydés en dérivés mono ou dicarbonylés (Baudin, 2006).

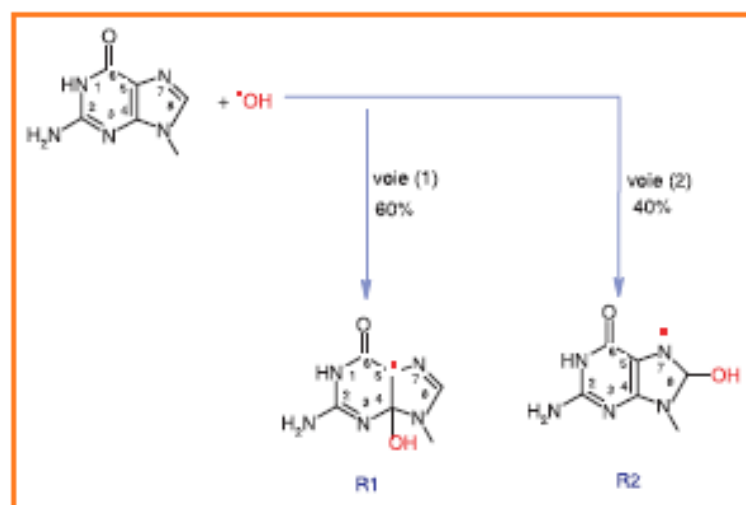


Figure 03: illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles (addition sur les doubles liaisons) sur une base de l'ADN, la guanine. Deux radicaux libres sont formés : R₁ (centré sur l'atome de carbone 5) et R₂ (centré sur l'atome d'azote 7). Ce dernier (R₂) donne naissance à la 8-oxo-guanine, un des principaux marqueurs du stress oxydant dans l'ADN (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

II-La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une métalloflavoenzyme complexe, existant sous deux formes interconvertibles : la xanthine déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.204) et la xanthine oxydase (XO) (EC 1.2.3.2), et qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique avec une réduction concomitante du NAD ou de l'oxygène moléculaire (Nishino et *al.*, 2005).

II-1-Structure cristalline

La XOR du lait bovin, la molybdène hydroxylase la plus étudiée, a servi de repère pour la classe entière des métalloflavoprotéines (Okamoto et *al.*, 2004). C'est un homodimère composé de deux sous unités catalytiquement indépendantes avec une masse moléculaire approximative de 150 kDa chaque. L'interface entre les sous unités s'organise tel que le complexe global a une forme de papillon (figure 04) (Berry et Hare, 2004).

Chaque sous unité de l'enzyme homodimérique contient un centre molybdène (Mo), une flavine (FAD), et deux centres fer-soufre (2Fe-2S) (Okamoto et *al.*, 2004). En effet, chaque sous unité est organisée en trois domaines associés avec un cofacteur spécifique. Le domaine N-terminal (acides aminés 1-165) est composé de deux sous domaines chacun avec un centre Fe₂-S₂ coordonné à 4 résidus cystéines. Un peptide linker le connecte au domaine intermédiaire (acides aminés 226-531), qui détient une profonde poche de liaison pour le FAD et qui positionne le cycle de la flavine à proximité d'un centre Fe₂-S₂. Un autre peptide linker joint le domaine FAD avec le domaine C-terminal (acides aminés 590-1332), qui est le domaine le plus large et de liaison du cofacteur Mo (Berry et Hare, 2004).

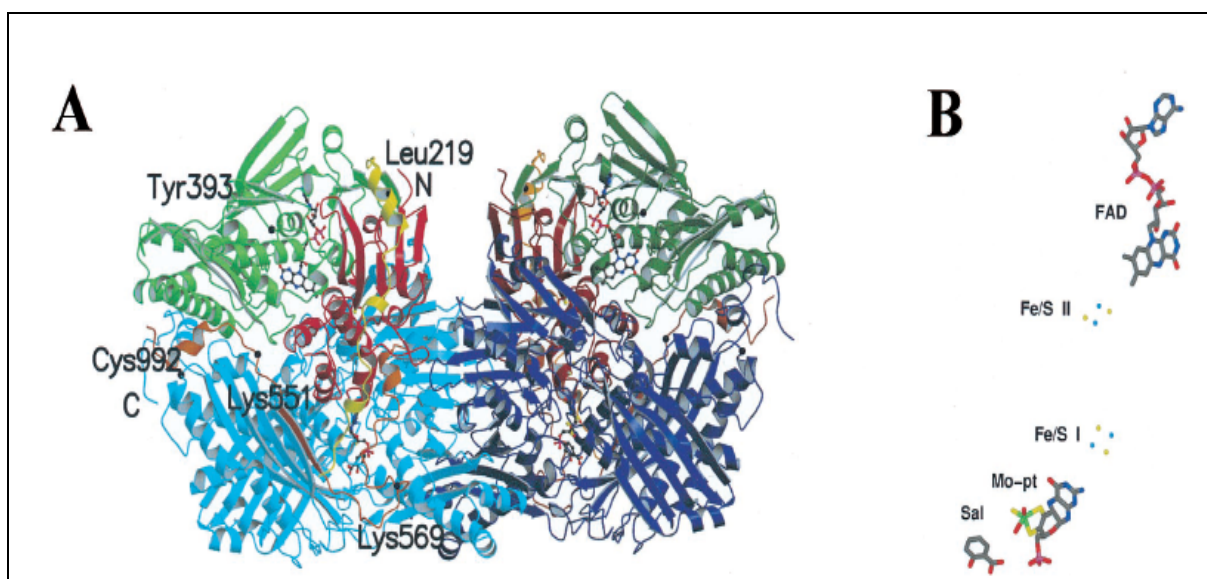


Figure 04 : (A) structure moléculaire du dimère de la xanthine déshydrogénase (XDH) divisée en trois domaines majeurs et deux boucles de liaison.

Les deux monomères ont des domaines symétriques de même couleur : plus clair pour le monomère sur la gauche et plus foncé pour le monomère sur la droite. De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, les domaines sont : un domaine centre fer soufre (résidus 3-165 ; rouge), un domaine FAD (résidus 226-531 ; vert), et un domaine molybdoptérine (Mo-pt) (résidus 590-1331 ; bleu). La boucle reliant le domaine fer soufre au domaine FAD (résidus 192-225) est montrée en jaune, celle reliant le domaine FAD au domaine Mo-pt (résidus 537-589) est en marron, et les extrémités N et C terminales sont marquées. Le cofacteur FAD, les deux centres Fer soufre, le cofacteur Mo-pt et le salicylate sont aussi inclus. (B) Plus clairement, l'arrangement des cofacteurs et du salicylate dans une sous-unité de la XDH est représenté. L'ion Mo est en vert, les ions fer sont en bleu clair, et les atomes de soufre en jaune (Enroth et *al.*, 2000).

II-2-Réactions catalysées par la XOR

-Activité xanthine oxydase

La XOR catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique, les deux dernières étapes dans le catabolisme des purines (figure 05) (Rouquette, 1998). La capacité de la XOR à générer le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène moléculaire et de l'hypoxanthine ou de la xanthine est bien connue, et a conduit au rôle proposé de l'enzyme comme une source d'ERO dans plusieurs situations pathologiques et physiologiques normales (Sanders et *al.*, 1997).

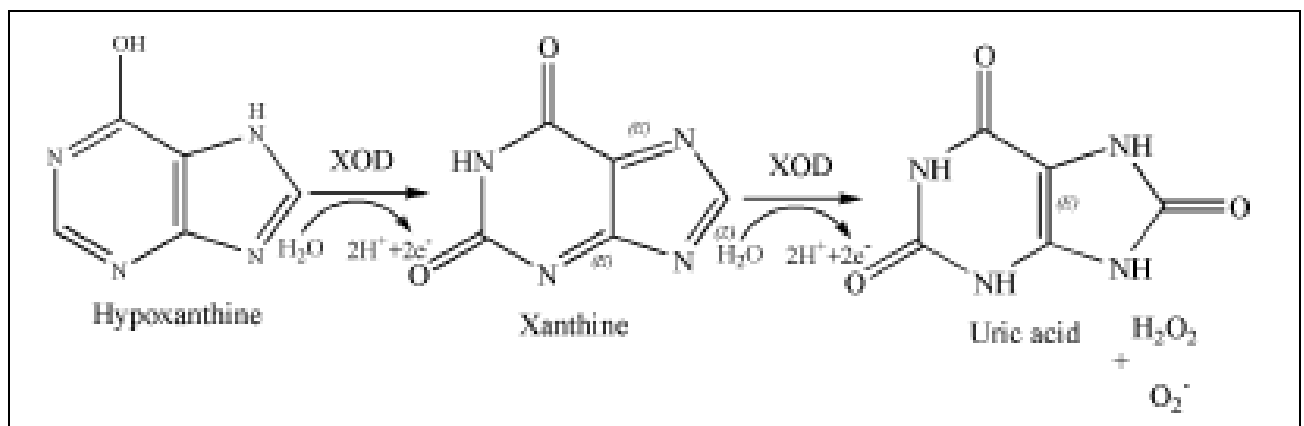


Figure 05 : schéma montrant l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique (Kalra et *al.*, 2007).

La XOR a été étudiée intensivement durant 100 ans, encore la complexité de sa fonction *in vivo* est toujours pauvrement comprise. Les chercheurs se focalisent sur les différentes formes catalytiques de la XOR et leur importance dans la production des ERO et ERN, qui sont impliquées dans plusieurs processus pathologiques (Vorbach et *al.*, 2003).

-Activité nitrite réductase

Récemment, la capacité de la XO à catalyser des réactions qui génèrent l'oxyde nitrique (NO[•]) à partir du nitrite inorganique a été rapportée. Le NO[•] est formé seulement sous des conditions anaérobies ; quand l'oxygène est présent, le superoxyde est aussi produit, qui réagit avec le NO[•] généré par la XO pour former le peroxyde nitrite, un puissant agent bactéricide (Hancock et *al.*, 2002).

Ainsi, la XO peut être une source importante de NO^\bullet indépendamment de la NOS. Sous des conditions anaérobies, la XO réduit le nitrite en NO^\bullet au niveau du site molybdène de l'enzyme avec la xanthine, le NADH, ou des substrats aldéhydiques servant à fournir les équivalents réducteurs requis (figure 06) (Li et *al.*, 2001). Comme la tension d'oxygène augmente, le rendement en NO^\bullet décroît comme une conséquence de sa réaction avec le superoxyde généré par la XOR (Codber et *al.*, 2000). Cette production de NO^\bullet à partir de l'enzyme peut servir comme une source alternative de NO^\bullet sous des conditions ischémiques dans lesquelles la production de NO^\bullet à partir de la NOS est altérée (Li et *al.*, 2001).

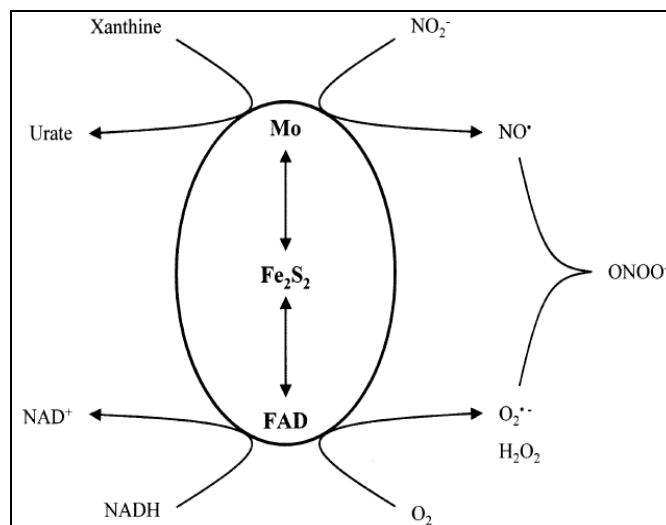


Figure 06: génération du NO^\bullet et du peroxynitrite catalysée par la XOR (Martin et *al.*, 2004 b).

-Activité NADH oxydase

L'activité NADH oxydase de la XOR est moins connue, bien que cette activité ait été documentée pour la XO du lait bovin, la XDH hépatique de dindon et la XDH hépatique du poulet. L'enzyme du lait humain, particulièrement dans sa forme déshydrogénase, est capable d'oxyder le NADH pour former l'anion superoxyde à des taux appréciables, comme indiqué dans la figure 07. Ce fait, couplé avec la très faible activité de l'enzyme humaine vis-à-vis des substrats réducteurs conventionnels, tels que la xanthine et l'hypoxanthine, suggère un rôle physiologique pour l'oxydation du NADH, non seulement par l'enzyme humaine, mais aussi par celles d'autres espèces (Sanders et *al.*, 1997).

Les propriétés catalytiques de la XO dans le lait bovin sont dépendantes de l'état de l'enzyme, si libre ou liée à la membrane du globule gras. L'activité oxydase de l'enzyme liée à la membrane vis-à-vis du NADH est augmentée relativement à celle vis-à-vis de la xanthine (Briley et Eissenthal, 1974).

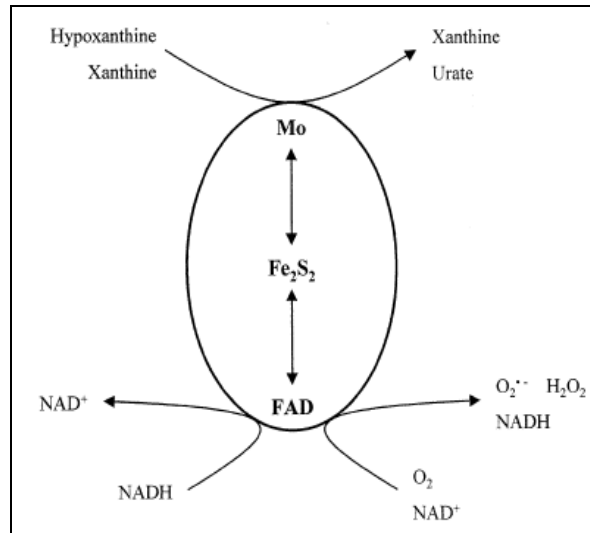


Figure 07 : un diagramme schématique montrant l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine catalysée par la XOR au niveau du site Mo, et du NADH au niveau du site FAD. La réduction du NAD⁺ ou de l'oxygène moléculaire a lieu au niveau du FAD (Harrison, 2002).

II-3-Mécanisme d'action

L'oxydation de la xanthine a lieu au niveau du centre molybdoptérine (Mo-pt) comme cela est montré dans la figure 08 et les électrons ainsi introduits sont rapidement distribués aux autres centres par un transfert intramoléculaire des électrons. La réduction du substrat oxydant naturel NAD⁺ se produit au niveau du FAD (figure 09). Contrairement aux autres hydroxylases, la XDH utilise la molécule d'eau comme source ultime d'oxygène incorporé dans le produit (Enroth et *al.*, 2000).

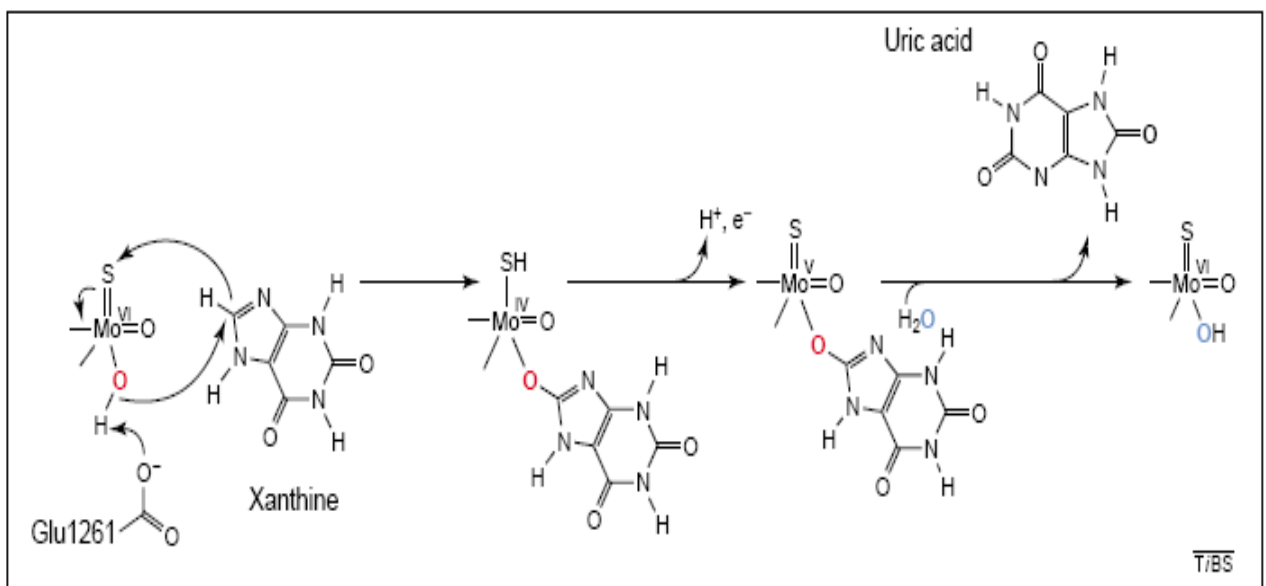


Figure 08: mécanisme d'action de la XO (Hille, 2002).

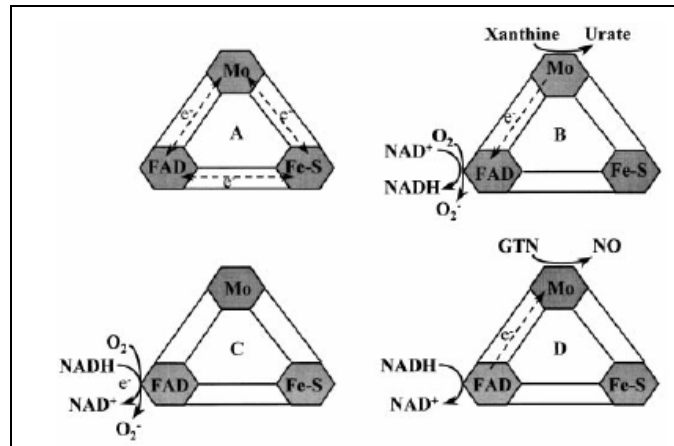


Figure 09 : schéma montrant le transfert des électrons entre les domaines de la XOR (O'Byrne et *al.*, 2000).

II-4-Conversion de la XDH en XO

Chez les mammifères, la XOR peut exister sous deux formes enzymatiques : une déshydrogénase (XDH) qui utilise le NAD^+ comme accepteur d'électrons et une oxydase (XO) qui utilise l' O_2 comme accepteur d'électrons. Les deux formes enzymatiques sont le produit du même gène et sont identiques en taille, composition en sous unités, et les cofacteurs requis (James et *al.*, 2002).

Les études sur les structures cristallines de la XDH et de la XO du lait bovin ont démontré que des atomes dans la boucle du site actif hautement chargé (Gln-423-Lys-433) autour du cofacteur FAD ont subi de larges dislocations durant la conversion, comme indiqué dans la figure 10, bloquant l'approche du substrat NAD du FAD dans la forme XO, changeant ainsi l'environnement électrostatique autour du FAD.

Kuwabara et *al.*, (2003), ont identifié un groupe unique d'acides aminés qui joue un double rôle en formant le noyau du système de relais pour la transition XDH-XO et en ouvrant un canal conduisant vers le cycle du FAD. Une comparaison structurale plus détaillée et des expériences d'analyse par mutagenèse dirigée ont montré que la Phe-549, l'Arg-335, le Trp-336 et l'Arg-427 se placent au centre d'un système de relais qui transmet des modifications du peptide linker par l'oxydation de cystéine (figure 11) ou par un clivage protéolytique à la boucle du site actif (Gln-423-Lys-433).

Les interactions serrées de ces résidus sont cruciales dans la stabilisation de la conformation de la XDH et ainsi maintenir le canal fermé. La génération oxydative et protéolytique de la XO mène efficacement au déplacement de la Phe-549 du groupe causant une réorientation de la chaîne latérale encombrante du Trp-336, qui alors alternativement forme une dislocation de l'Arg-427, un acide aminé situé dans la boucle du site actif (Kuwabara et *al.*, 2003).

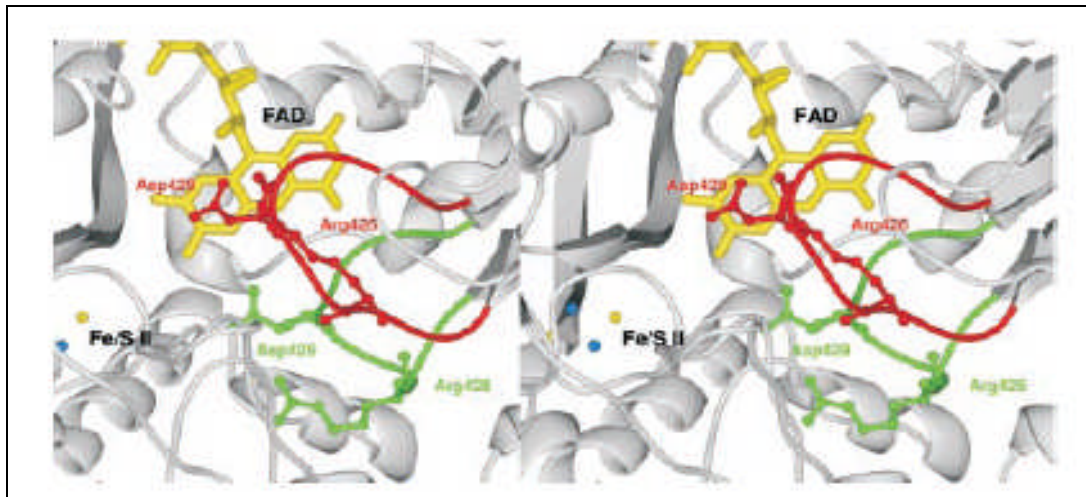


Figure 10 : stéréo représentation du changement dans la conformation montré par une boucle du site actif (Gln-423-Lys-433) dans la transition XDH à XO ; l'orientation verte représente la conformation qu'elle adopte dans la XDH et le trait rouge suit son chemin dans la XO. Les positions des chaînes latérales de l'Asp 429 et de l'Arg 426 sont indiquées ; elles montrent des changements et sont les contributeurs majeurs au changement dans la charge électrostatique au niveau du site de la flavine (Enroth *et al.*, 2000).

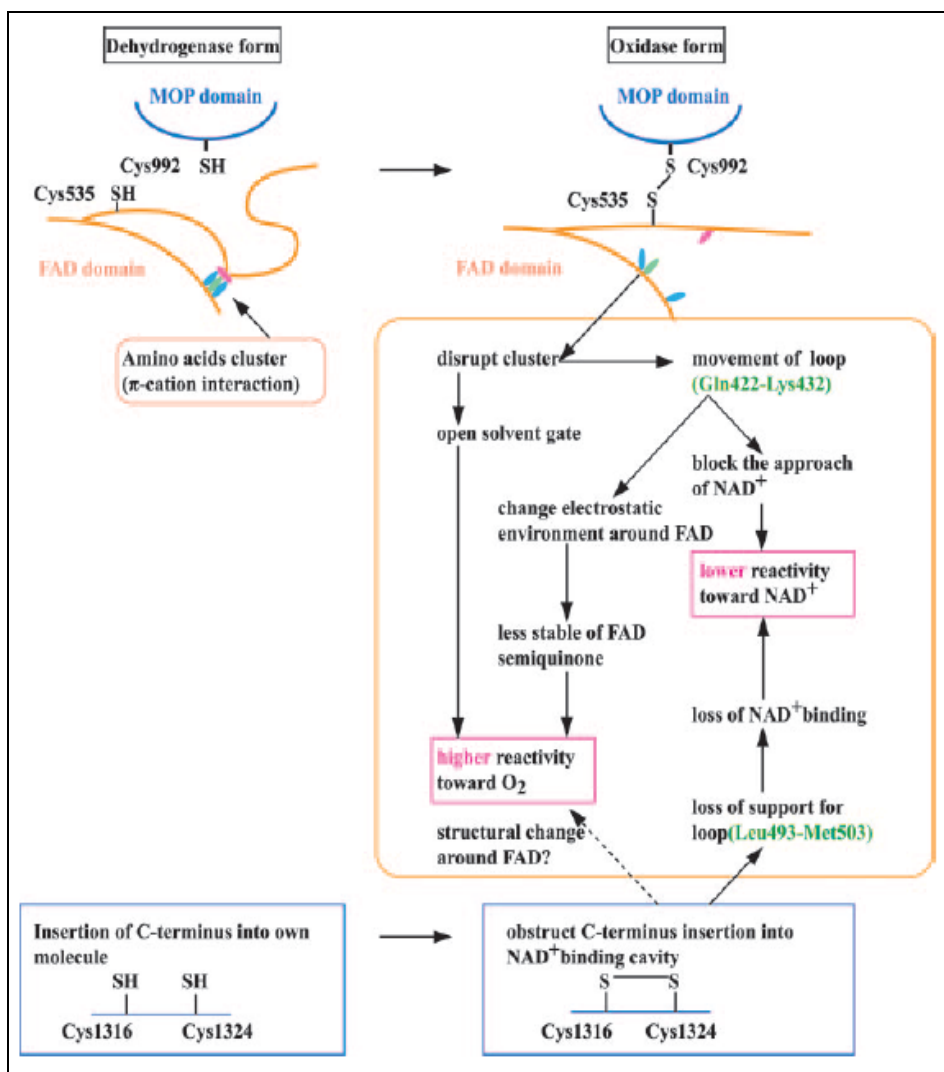


Figure 11 : représentation schématique du mécanisme de la conversion de la XDH en XO. MOP, molybdoptérine ; SH, groupements sulfuriques (Nishino *et al.*, 2005).

II-5-Rôles physiologiques

Pendant de nombreuses décennies, le seul but de la XOR était présumé être le catabolisme des purines, mais de plus en plus de preuves suggérant un plus grand rôle biologique pour cette enzyme (Berry et Hare, 2004). La fonction exacte de l'enzyme est toujours inconnue, mais elle semble être impliquée dans le catabolisme des purines, détoxification des antibiotiques et une capacité antioxydante en produisant l'urate (Frederiks et Vreeling-Sindelarova, 2002).

II-5-1-Catabolisme des purines

L'hypoxanthine et la xanthine sont des produits dans la voie de dégradation des purines (Hellsten, 2000). Dans le catabolisme des purines, la XOR catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et subséquemment de la xanthine en acide urique (figure 12) (Vorbach et *al.*, 2003).

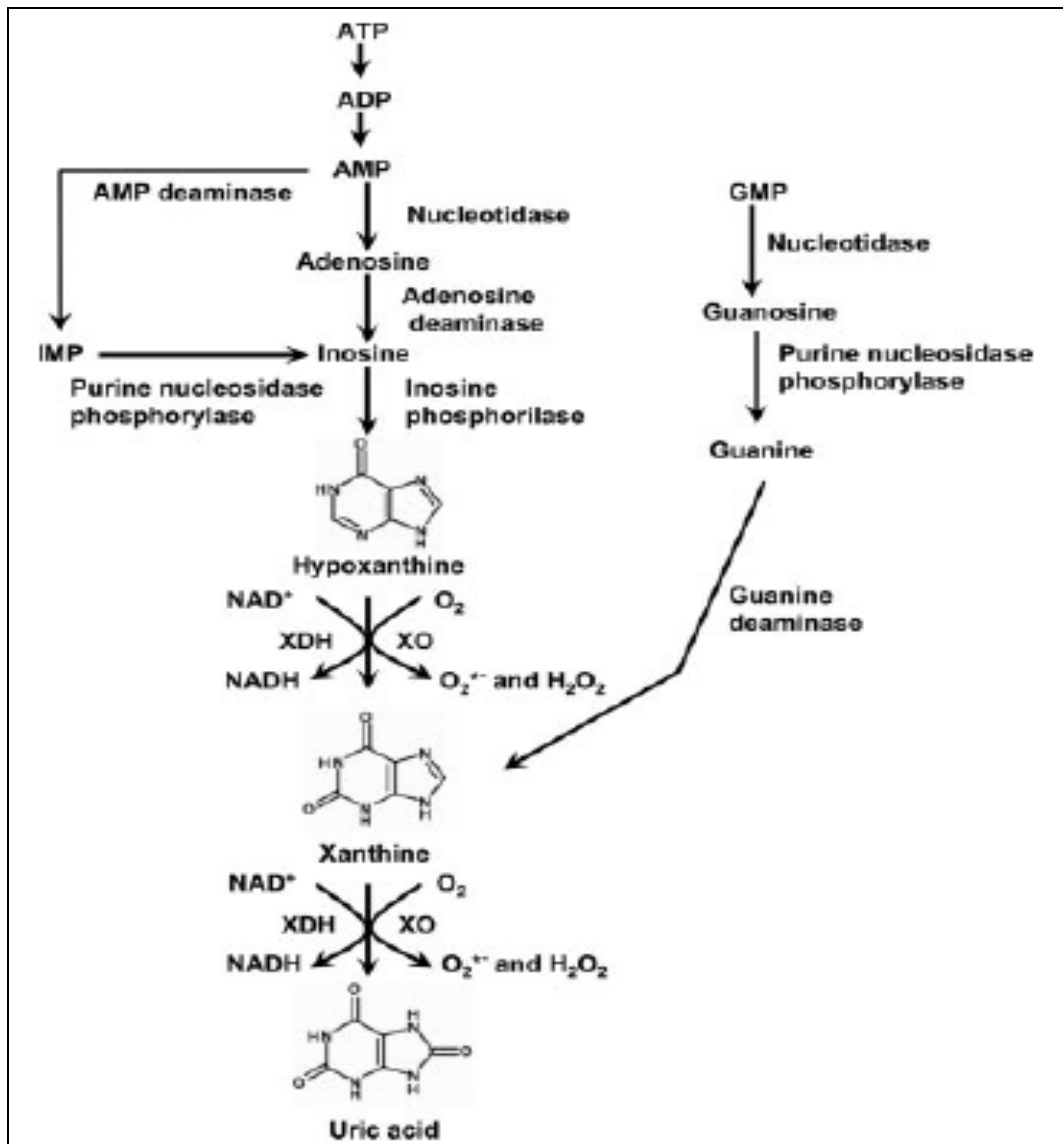


Figure 12 : un diagramme schématisé de la voie de dégradation des purines (Packer et *al.*, 2006).

II-5-2-Rôle antimicrobien

La présence de la XOR dans la bile est complémentaire à son occurrence dans le tractus gastro-intestinal et, en effet, dans le lait humain, où la mère fournit une source exogène de la XOR pour son bébé durant son développement précoce. Cela soulève la question de savoir ce qui est le rôle de la XOR dans la bile ou dans le tractus gastro-intestinal humain (Martin *et al.*, 2004 a).

L'expression de la XOR est élevée dans les cellules épithéliales intestinales, où une barrière, à rôle microbicide a été proposée (Martin *et al.*, 2004 b). Les auteurs ont proposé que la XOR joue un rôle anti-microbien dans le tractus digestif par génération des ERO. Ce concept a été supporté et amplifié par des résultats récents tel que la XOR catalyse la réduction du nitrite en oxyde nitrique qui réagit rapidement avec le superoxyde pour donner l'agent bactéricide puissant le peroxy-nitrite (Martin *et al.*, 2004 a). Effectivement, par génération d'un microenvironnement riche en nitrite, les bactéries entériques pouvaient initier leur propre destruction (Hancock *et al.*, 2002).

Il a été proposé que la XOR sur la surface des globules gras du lait joue un rôle similaire dans l'intestin du nouveau-né. En support à cela, le lait humain et le lait bovin montrent une activité bactéricide qui est dépendante de la présence du nitrite et est bloquée par l'allopurinol, un inhibiteur spécifique de la XOR. Il est généralement accepté que la bile constitue une arme de défense immunitaire innée dans le tractus gastro-intestinal, et il est possible que son contenu en XOR puisse contribuer à cette fonction (Martin *et al.*, 2004 a).

II-5-3-Transduction du signal

Comme les ERO sont de plus en plus considérées comme agents de transduction du signal, la XOR, avec sa capacité à générer l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, est dans plusieurs cas une candidate attractive. Une localisation périnucléaire serait, par exemple, en accord avec un rôle pour la XOR comme une source d'ERO qui activent les facteurs de transcription nucléaires, tel que le NF- κ B. Dans les cellules, la XOR était clairement observée d'être asymétriquement localisée sur les surfaces externes. Une telle spécifique distribution suggère un rôle fonctionnel pour l'enzyme dans les interactions cellule-cellule, probablement incluant la signalisation via les ERO (Rouquette *et al.*, 1998).

II-5-4-Rôle de la XOR dans la sécrétion du lait

Dans les cellules alvéolaires mammaires, la XOR représente une composante importante de la protéine soluble.

Il a été connu depuis quelques années que l'expression de l'ARNm de la XOR dans ces cellules épithéliales augmente durant la grossesse et que l'enzyme est présente dans la membrane plasmique apicale au moment de la lactation. Sur la base de ces informations et d'autres, Mather et Keenan, (1998), ont proposé la participation de la XOR dans la sécrétion des globules gras du lait et une preuve convaincante appuyant cette idée a été fournie dans deux études récentes.

Dans l'une d'entre elles, McManaman, Palmer, Wright et Neville, (2002), ont confirmé l'augmentation de l'ARNm de la XOR au cours de la grossesse, de plus, montrant une forte augmentation au début de la lactation. A ce moment-là, l'enzyme est transférée du cytoplasme à la membrane apicale de la cellule, où elle se colocalise avec deux autres protéines, l'adipophiline (ADPH) et la butyrophiline (BTN). A l'intérieur de la cellule, l'ADPH est associée au globule lipidique, alors que la BTN est une protéine de la membrane plasmique.

Dans les globules gras sécrétés du lait, ces trois protéines (XOR, ADPH et BTN) sont connues pour faire partie de la couche protéinique qui sépare le noyau lipidique de la MFGM (milk fat globule membrane) et que la XOR médie le couplage entre le globule lipidique et la membrane cellulaire apicale dans le processus de sécrétion. Des analyses chromatographiques des protéines solubilisées de la MFGM ont montré que la XOR, l'ADPH et la BTN forment un complexe dépendant de liaisons sulfidryles (Harrison, 2006).

II-6-Rôles pathologiques

II-6-1-Hyperuricémie

L'hyperuricémie, définie comme la concentration d'urate sérique excédant la limite de solubilité [environ 6,8 mg/dl (400 μ mol/l)], est une anomalie biochimique commune qui reflète la saturation du fluide extracellulaire en urate et prédispose les personnes affectées à la goutte. Ainsi, un but majeur dans le contrôle de la goutte est la réduction à long terme des concentrations d'urate sérique à des niveaux subsaturants, une telle réduction va empêcher la formation et la déposition des cristaux d'urate (Becker et *al.*, 2005). L'inhibition de la XO par l'allopurinol a été observée, et celle-ci est devenue la base pour le contrôle de l'hyperuricémie dans la maladie de la goutte (Lewis et *al.*, 1984).

II-6-2-Syndrome d'ischémie reperfusion

Bien que plusieurs mécanismes aient été démontrés d'être impliqués dans la génération des radicaux libres oxygénés, la XO a été proposée d'être le mécanisme central dans une variété de cellules et de tissus post-ischémiques (Yong-Xia et Zweier, 1995).

En 1981, Granger et ses collègues ont hypothésé que les ERO générées par la XOR causent des lésions intestinales ischémiques dues au catabolisme de l'ATP durant l'hypoxie et à l'augmentation de la disponibilité d'accepteur d'électron en reperfusion (Berry et Hare, 2004).

Bien qu'il y ait eu des controverses quant à savoir si ce mécanisme se produit dans les cellules et tissus humains, des études récentes ont montré que l'enzyme est présente dans les cellules endothéliales humaines reoxygénées. Dans les tissus reperfusés, la XO en présence de ses substrats hypoxanthine ou xanthine réduit l'oxygène moléculaire en $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 , qui peuvent encore réagir pour former le radical le plus réactif OH^{\cdot} . Les radicaux OH^{\cdot} et $O_2^{\cdot-}$ peuvent alors à leur tour réagir avec les protéines et les membranes cellulaires induisant des lésions cellulaires (Yong-Xia et Zweier, 1995).

Au cours d'une hypoxie (baisse de l' O_2 artérielle) il existe un ralentissement, voir un arrêt, du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette situation entraîne un déficit qui ne permet plus aux mitochondries d'assurer la synthèse d'ATP par la voie de la phosphorylation oxydative. Ceci entraîne une paralysie des pompes calciques (Ca^{2+} ATPase) et autorise une entrée massive de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule qui a comme conséquence l'activation d'une protéase Ca^{2+} dépendante qui assure la conversion de la XDH en XO. Contrairement à la XDH, la XO utilise l' O_2 au lieu du NAD comme accepteur d'électrons pour former le $O_2^{\cdot-}$ et le H_2O_2 (figure 13) (Eschwège, 2005).

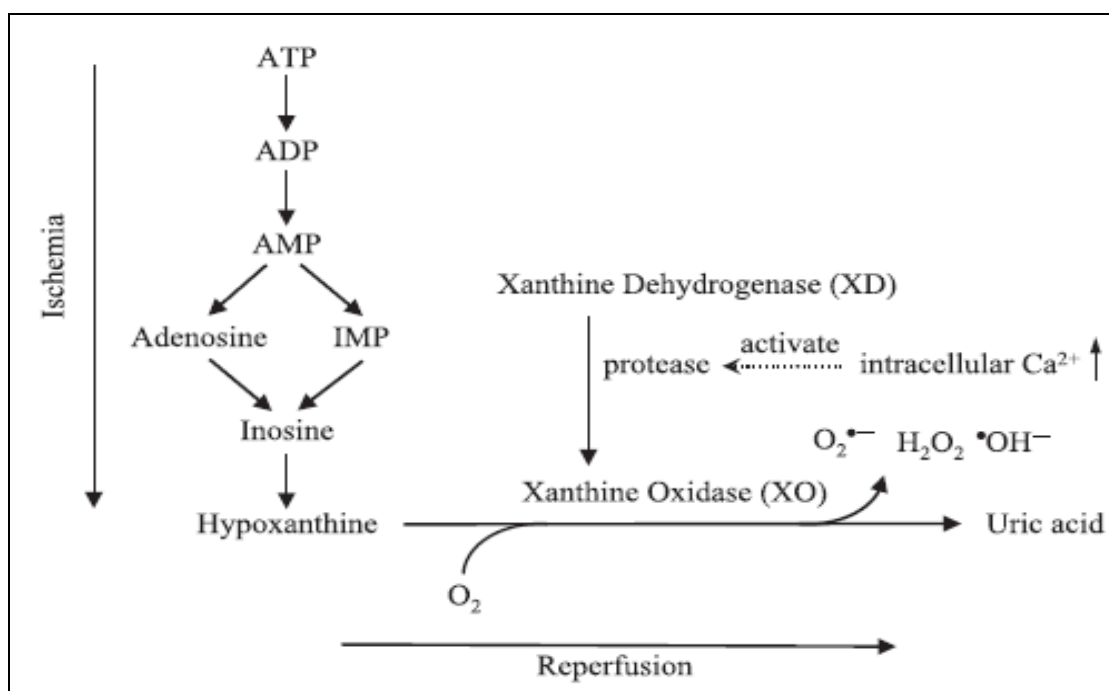


Figure 13 : mécanisme des lésions induites par les radicaux libres médiés par la XO (Sasaki et Joh, 2007).

III-Les composés phénoliques

Les phénols sont des composés possédant un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupements hydroxyles, et généralement, ils sont catégorisés en acides phénoliques, flavonoides, stilbenes, coumarines et tannins. Les phénols sont les produits du métabolisme secondaire chez les plantes, fournissant des fonctions essentielles dans la reproduction et la croissance des plantes, agissant dans les mécanismes de défense contre les pathogènes, parasites et prédateurs, aussi bien que contribuant à la couleur des plantes (Liu, 2007).

III-1-Biosynthèse

Les polyphénols sont synthétisés à partir de deux voies biosynthétiques :

- celle de l'acide shikimique, qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples ;
- celle issue de l'acétate, qui conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones ;
- de plus, la diversité structurale des composés phénoliques, due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoides (figure 14) (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

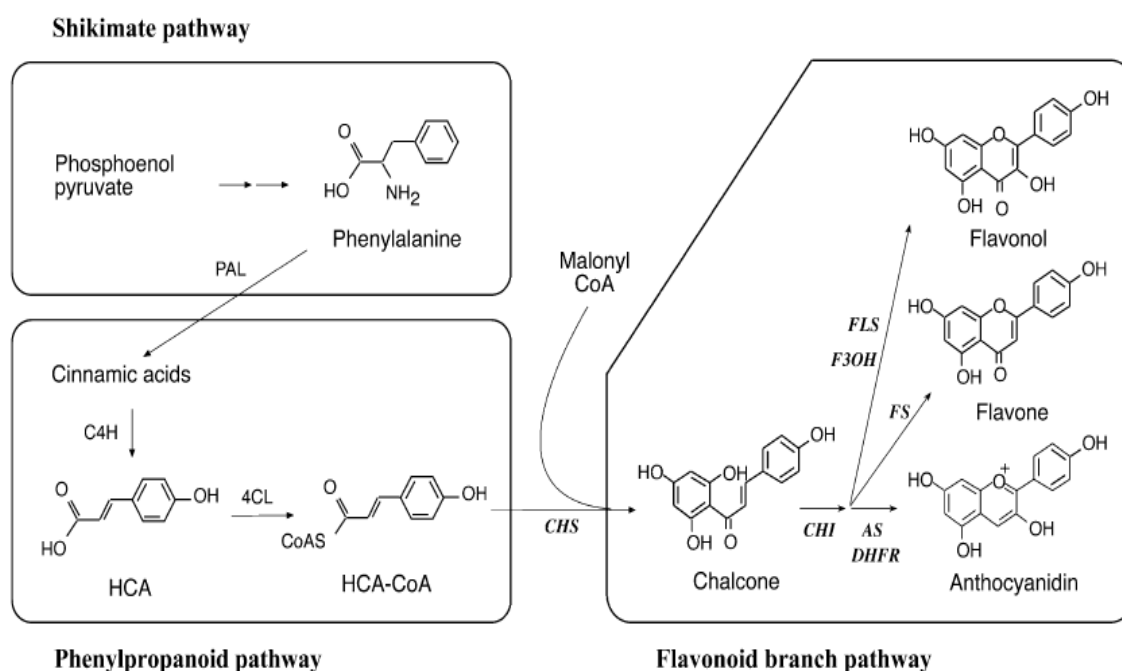


Figure 14 : diagramme de la voie de biosynthèse des polyphénols (Sakihama et al., 2002).

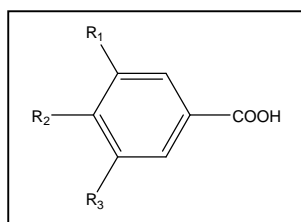
III-2-Principales classes

III-2-1-Les acides phénoliques

Ils sont subdivisés en deux sous groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Les acides hydroxybenzoïques ont en commun la structure C₆-C₁. Ils incluent les acides galliques, hydroxy- benzoïques, protocatéchique, vanillique et syringiques.

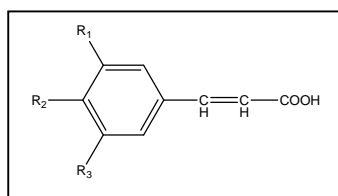
Les acides hydroxycinnamiques, de l'autre coté, sont des composés aromatiques avec une chaîne latérale de trois carbones (C₆-C₃), avec les acides caféïques, féruliques, p-coumariques et cinapiques étant les plus communs (figure 15) (Bravo, 1998).

a



Dérivés d'acide benzoïque	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
Acide benzoïque	H	H	H
Acide p-hydroxybenzoïque	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH
Acide vanillique	CH ₃ O	OH	H
Acide syringique	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Acide gallique	OH	OH	OH

b



Dérivés d'acide cinnamique	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
Acide cinnamique	H	H	H
Acide p-coumarique	H	OH	H
Acide caféïque	OH	OH	H
Acide férulique	CH ₃ O	OH	H
Acide sinapique	CH ₃ O	OH	CH ₃ O

Figure 15 : structures des acides phénoliques communs : (a) les dérivés d'acide benzoïque et (b) les dérivés d'acide cinnamique (Liu, 2007).

III-2-2-Les coumarines

Les coumarines (connus comme 1,2-benzopyrone), contenant des cycles de benzène et de α -pyrone fusionnés, sont un groupe important de phénols de faible poids moléculaire (figure 16) (Lin et *al.*, 2008).

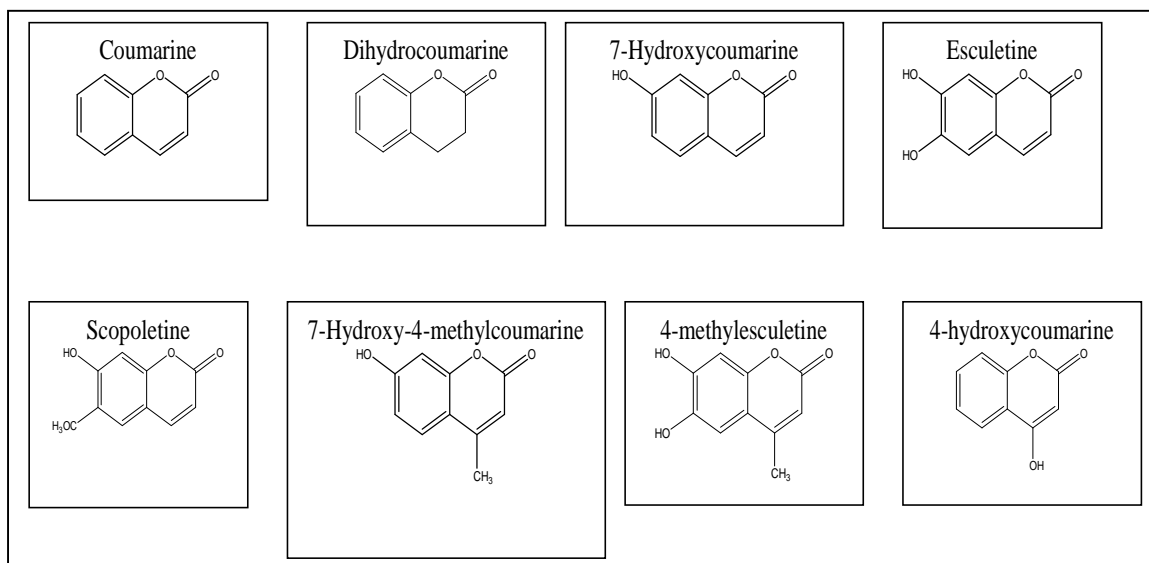


Figure 16: structures chimiques des dérivés de coumarines (Lin *et al.*, 2008).

III-2-3-Les flavonoides

Les flavonoides constituent le groupe le plus large des phénols végétaux, représentant plus de la moitié des huit mille composés phénoliques naturels. Les flavonoides sont des composés de faible poids moléculaire qui consistent en 15 atomes carboniques, disposés sous la configuration : C₆-C₃-C₆ (Balasundram *et al.*, 2006). Les flavonoides sont composés généralement de deux cycles benzéniques (cycles A et B) liés par un hétérocycle contenant un oxygène (cycle C) (figure 17) (Tsao et Deng, 2004).

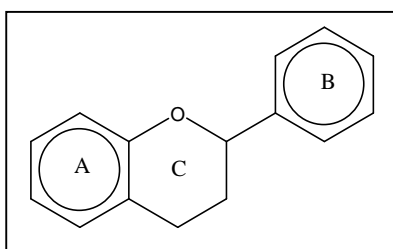


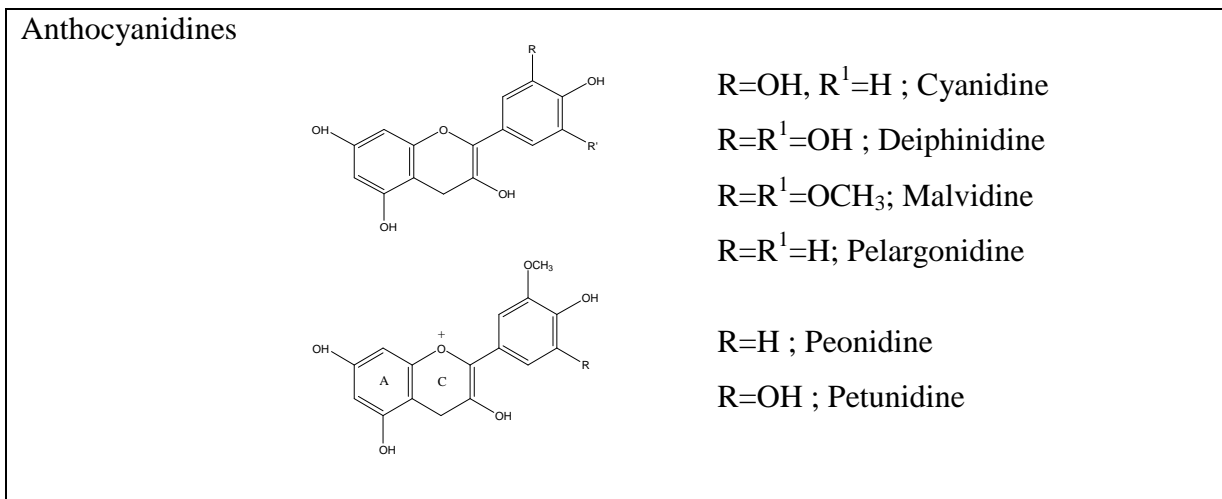
Figure 17: structure de base des flavonoides (Saraf *et al.*, 2007).

Des variations dans des modèles de substitution dans le cycle C a pour résultat les principales classes de flavonoides, c.à.d. les flavones, les flavonols, les flavanes, les flavanones, et les anthocyanidines, dans lesquelles : les flavones et les flavonols sont les plus répandues et structurellement diverses (tableau I).

Des substituants des cycles A et B donnent naissance à des composés différents à l'intérieur de chaque classe de flavonoides. Ces substitutions peuvent impliquer l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation et la sulfatation (Balasundram *et al.*, 2006).

Tableau I : structures chimiques des flavonoides et quelques exemples (Aruoma et al., 2003).

Classe	formule structurale	Exemples
Flavanones		$R=R^1=H, R^{11}=R^{111}=OH$; Naringénine $R=OH, R^1=H, R^{11}=R^{111}=OH$; Eriodyctiol $R=R^1=OH, R^{11}=R^{111}=OH$ 5 ¹ -OH-Eriodyctiol
Flavones		$R=R^1=H$; Apigénine $R=OH, R^1=H$; Lutéoline $R=R^1=OCH_3$; Tricétine
Isoflavones		$R=OH$; Genesteine $R=H$; Daidzeine
Flavonols		$R=R^1=H$; Kaempferol $R=OH, R^1=H$; Quercétine $R=R^1=OH$; Myricétine
Flavanols		$R=OH, R^1=H$; (-)-Epicatechine $R=R^1=OH$; (-) Epigallocatechine $R=OH, R^1=H$; (+)-Catechine $R=R^1=OH$; (+)-Gallocatechine
		$R=OH, R^1=H$; (+)-Epicatechine $R=R^1=OH$; (+)Epigallocatechine $R=OH, R^1=H$; (-)-Catéchine $R=OH, R^1=H$; (-)-Gallocatechine



III-2-4-Les tannins

Les tannins sont des composés polyphénoliques de poids moléculaire élevé produits par le métabolisme secondaire des plantes (Bossu et *al.*, 2006). Les tannins sont divisés en tannins condensés et tannins hydrolysables (Cai et *al.*, 2006).

III-2-4-1-Les tannins condensés

Ces composés consistent en des unités de flavan-3ol liées par des liaisons C₄-C₆ ou C₄-C₈. Ces polyflavonoïdes contiennent des cycles A de phloroglucinol ou de résorcinol et des cycles B de catéchol ou de pyrogallol. La liaison interflavonoïdique C₄-C₆ prédominant chez les tannins est le plus souvent composée d'unités répétées de fisétidine (cycle A : résorcinol, cycle B : catéchol) et de robinétidine (cycle A résorcinol, cycle B pyrogallol). La liaison interflavonoïdique C₄-C₈ de l'autre côté prédominant chez les tannins, est composée d'unités répétées de catéchine (cycle A phloroglucinol, cycle B catéchol) et de gallocatéchine (cycle A phloroglucinol, cycle B pyrogallol). Lorsque les tannins polymériques sont composés d'unités de fisétidine ou de robinétidine les polymères sont respectivement appelés profisétidine ou probinétidine ; lorsqu'ils sont composés de catéchine ou de gallocatéchine les polymères sont appelés procyanidines ou prodéphinidine, respectivement (Rahim et *al.*, 2008).

III-2-4-2-Les tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont formés par un cœur hydrocarbure, usuellement le D-Glucose, dont les groupements hydroxyles peuvent présenter des liaisons esters avec les groupements phénoliques. Les tannins hydrolysables peuvent être appelés ellagitannins, lorsque seulement les acides ellagiques sont les groupements polyphénoliques liés au cœur hydrocarbure. Les gallotannins se présentent lorsque seulement les acides galliques sont liés au cœur hydrocarbure, et les tannins mixtes lorsque les deux, les acides ellagiques et galliques sont liés au même cœur hydrocarbure (figure 18) (Bossu et *al.*, 2006).

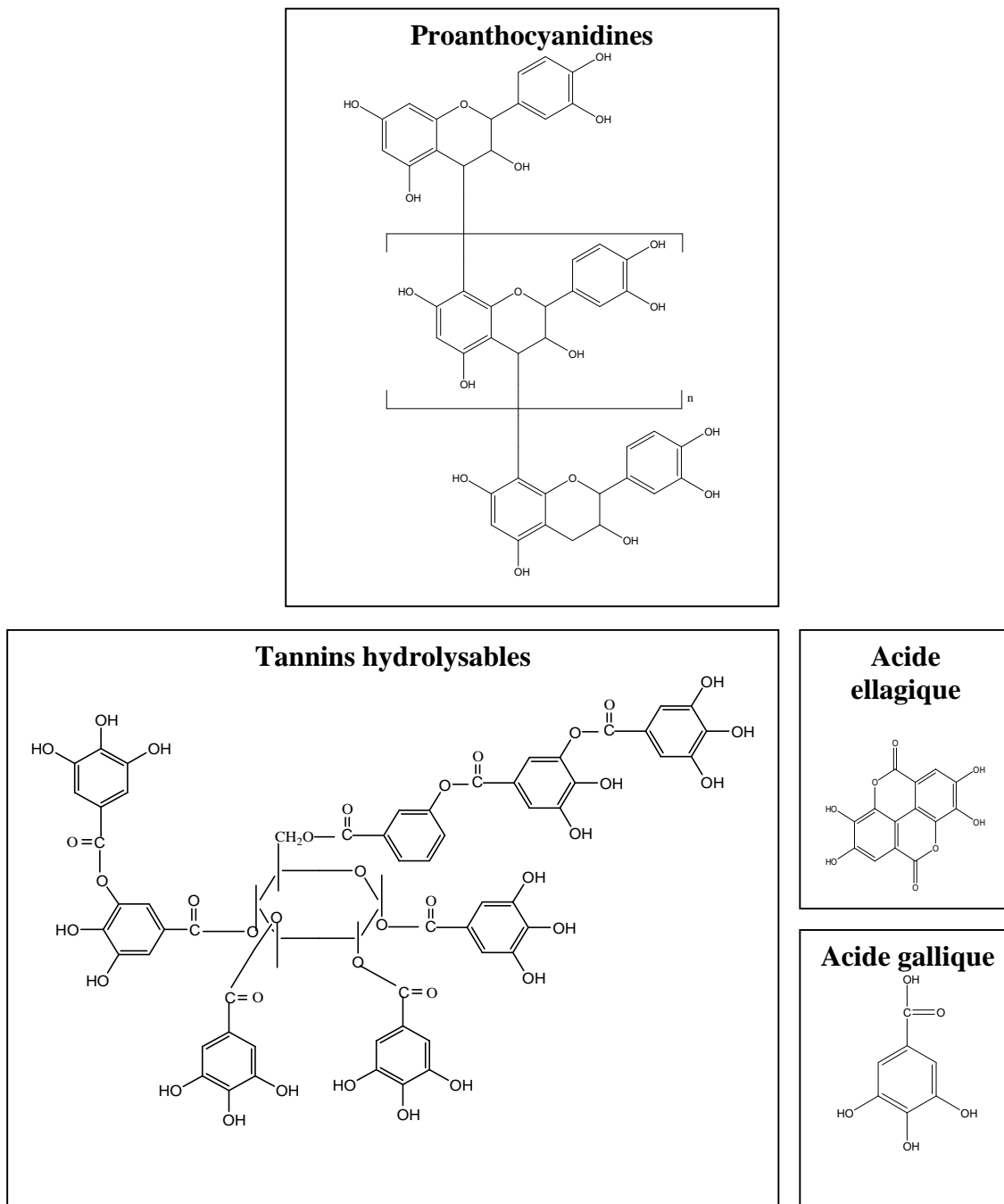


Figure 18 : structures chimiques des tannins (Naczka et Shahidi, 2004).

III-3-Rôles physiologiques

Les composés phénoliques possèdent plusieurs propriétés physiologiques telles que les propriétés anti-allergique (Dykes et Rooney, 2007), anti-athérogénique (Borochoy-Neori *et al.*, 2008), anti-inflammatoire (Tadić *et al.*, 2008), anti-bactérienne (Falleh *et al.*, 2008), anti-oxydante (Aberoumand et Deokule, 2008), anti-thrombotique (Svobodova *et al.*, 2003), cardioprotectrice et des effets vasodilatateurs (Balasundram *et al.*, 2006).

III-4-Activité anti-radicalaire

Le rôle central des radicaux libres dans la pathophysiologie justifie l'emploi des antioxydants (Haenen et *al.*, 2006).

Un antioxydant peut être défini comme : « toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celles d'un substrat oxydable, ralentie ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Young et Woodside, 2001).

Les antioxydants sont des substances qui retardent le processus d'oxydation, inhibant la chaîne initiée par les radicaux libres et autres réactions d'oxydation subséquentes (Céspedes et *al.*, 2008).

Ainsi, le terme antioxydant a été défini comme toute substance qui piège directement les ERO ou indirectement agit pour réguler les défenses antioxydantes ou inhiber la production des ERO (Khlebnikov et *al.*, 2007).

Au cours des dernières années, de nombreux antioxydants et piègeurs des ERO synthétiques et naturels ont été développés et étudiés afin de protéger les biomolécules contre l'attaque des ERO et/ou pour supprimer le dommage résultant (Yong et *al.*, 2008).

III-4-1-Inhibiteurs synthétiques

Les antioxydants synthétiques sont utilisés dans l'industrie alimentaire (Barreira et *al.*, 2008). Les antioxydants synthétiques tels que le butyl hydroxytoluène, le butyl hydroxyanisole et le propyl gallate ont été utilisés depuis le début du 20^{ème} siècle. Cependant, des restrictions sur l'utilisation de ces composés sont maintenant en train d'être imposées à cause de leur carcinogénicité (Kahl et Kappus, 1993).

C'est pourquoi, il y a un intérêt croissant pour les propriétés chemopreventives contre le cancer des métabolites secondaires naturels de plantes et leur utilisation potentielle comme antioxydants dans les industries pharmaceutiques et alimentaires (Khalloki et *al.*, 2007).

III-4-2-Inhibiteurs naturels

Les antioxydants tels que la vitamine C et E sont essentiels pour la protection contre les ERO. Cependant, la majorité de l'activité antioxydante des fruits ou des légumes peut être due aux composés tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes, plutôt qu'à la vitamine C, E ou au β -carotène (Isao et Deng, 2004). Effectivement, l'activité antioxydante des extraits de plantes est due principalement aux composés phénoliques (Yesil-Celiktas et *al.*, 2007).

III-4-2-1-Les acides phénoliques

- Les acides phénoliques jouent un rôle positif dans la prévention des maladies humaines et dans l'industrie alimentaire. L'acide salvianolique B et le danshensu sont les ingrédients actifs les plus abondants chez *S. miltiorrhiza*. Des études sur les effets protecteurs de l'acide salvianolique B et de Danshensu contre les stress oxydants ont montré qu'ils sont de potentiels antioxydants. L'acide salvianolique B et danshensu ont exhibé des activités scavenging contre les radicaux hydroxyles de manière dépendante de la concentration avec des valeurs de l'IC₅₀ de 94 et 102 µg/ml respectivement, 4,7 et 4,2 fois inférieure à l'IC₅₀ de la vitamine C (534 µg/ml) (Zhao et al., 2008).
- Neuf acides phénoliques ont été identifiés et quantifiés par HPLC MS dans les feuilles et dix dans les graines du chou frisé (chou noir). Les contenus phénoliques totaux des fractions, déterminés colorimétriquement, ont été fortement corrélés avec leur capacité scavenging du DPPH. Les IC₅₀ des fractions des feuilles: libres, esters, glycosides et ester-liés sont de : 400 ; 4,39 ; 7,37 et de 24,6 µg/ml, respectivement et celles des fractions des graines sont inférieures à 8 µg/ml (Ayaz et al., 2008).

-Mode d'action

Les acides phénoliques ont été étudiés comme des modèles pour le développement de nouveaux antioxydants primaires, qui peuvent empêcher ou retarder les processus d'oxydation. Ces composés phénoliques sont de puissants antioxydants et peuvent piéger les ERO et chélater les métaux de transition (Barreira et al., 2008).

Dans le cas des acides phénoliques, l'activité antioxydante dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles en relation avec le groupement fonctionnel carboxylique (Balasundram et al., 2006).

- Parmi les acides phénoliques simples testés, l'acide hydroxybenzoïque n'a montré aucune activité antioxydante dans la plupart des différents tests antioxydants. Cela est compatible avec la capacité du groupement fonctionnel carboxylique unique, attaché au cycle aromatique, à capter des électrons, affaiblissant la capacité de donation d'hydrogène par le groupement hydroxyle (Soobrattee et al., 2005).

- L'activité antioxydante des acides phénoliques augmente avec l'augmentation du degré d'hydroxylation, comme c'est le cas de l'acide gallique trihydroxylé, qui montre une activité antioxydante élevée.

- Les acides hydroxycinnamiques exhibent une activité antioxydante plus élevée comparée à celle des acides hydroxybenzoïques. L'activité élevée de l'acide hydroxycinnamique pourrait être due au groupement $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, qui assure une plus grande capacité de donation d'hydrogène et de stabilisation du radical que le groupement COOH dans les acides hydroxybenzoïques (Balasundram et al., 2006).

III-4-2-2-Les flavonoides

- Quatre variétés de *Allium cepa* ont été étudiées pour leurs contenus en phénols totaux, les activités antioxydantes et de piégeage des radicaux libres. Les couches externes inutilisables de la variété rouge ont été une source riche en quercétine (5110 $\mu\text{g/g}$) avec une activité scavenging des radicaux libres élevée ($\text{IC}_{50} = 0,1 \text{ mg/ml}$) (Prakash et al., 2007).
- *Fructus Lycii* a été extrait avec 95% d'éthanol et le contenu en flavonoides a été déterminé (1,56 mg équivalent quercétine/g d'extrait). Trois espèces de flavonols dans l'extrait ont été identifiées et quantifiées par reversed-phase HPLC et leurs structures ont été confirmées : le Kæmpferol (135 $\mu\text{g/g}$), la quercétine (296 $\mu\text{g/g}$) et la myrecitine (247 $\mu\text{g/g}$). Ces résultats ont montré que *F. Lycii* possède les trois activités antioxydantes étudiées avec une activité de donation d'hydrogène de 80 $\mu\text{mol TEAC/g}$ d'extrait (Le et al., 2007).

-Mode d'action

La classe des flavonoides est la plus proéminente et la plus importante des antioxydants de plante.

Les activités antioxydantes des flavonoides sont multiples :

- La plupart des flavonoides possèdent la capacité de piéger les radicaux libres en agissant comme des donneurs d'hydrogène et d'électrons.
- Certains flavonoides peuvent aussi agir comme antioxydants par réaction directe avec les radicaux pour former des produits moins réactifs,
- et certaines espèces possèdent une capacité à chélater les éléments de transition.
- Quelques flavonoides sont aussi de forts inhibiteurs de certaines enzymes métaboliques qui génèrent des produits de radicaux libres telle que la cyclooxygénase, la lipooxygénase, la monoamineoxydase, la XO et l'oxyde nitrique synthase inductible (Le et al., 2007).

De nombreux auteurs ont étudié l'activité antioxydante des flavonoides, et plusieurs tentatives ont été faites pour établir la relation entre la structure des flavonoides et leur activité scavenging des radicaux.

En général, l'activité de piégeage des radicaux par les flavonoides dépend de la structure moléculaire et du mode de substitution des groupements hydroxyles (figure 19) : de la disponibilité d'hydrogènes phénoliques et de la possibilité de stabilisation des radicaux phénoxyes résultants via des liaisons hydrogènes ou par une délocalisation électronique (Amic et *al.*, 2003).

(1)-Des études de la relation structure-activité des flavonoides ont montré l'importance du nombre et de la localisation des groupements OH phénoliques présents pour l'efficacité anti-radicalaire :

- L'exigence structurale essentielle pour le piégeage efficace des radicaux par les flavonoides est la présence d'un 3',4'-dihydroxy : un groupement O-dihydroxy (structure catéchol) dans le cycle B, possédant des propriétés de donation d'électrons et étant une cible radicalaire (Amic et *al.*, 2003).
- Aussi, la fraction 3-OH du cycle C est également bénéfique pour l'activité antioxydante des flavonoides (Amic et *al.*, 2003). L'hétérocycle du flavonoïde contribue à l'activité antioxydante par la présence d'un 3-OH libre et permettant la conjugaison entre les cycles aromatiques. Le cycle C fermé en lui-même peut ne pas être crucial pour l'activité des flavonoides, étant donné que les chalcones sont des antioxydants actifs. Le piégeage des radicaux libres par les flavonoides est hautement dépendant de la présence d'un 3-OH libre. Les flavonoides avec un 3-OH et un 3',4'-catéchol sont rapportés d'être 10 fois plus puissants que l'ebsele. La forte activité inhibitrice de la quercétine, des dommages oxydatifs induits par les métaux ou non, est partiellement attribuée à son substituant 3-OH libre, qui augmente la stabilité du radical flavonoïque.
- L'angle de torsion du cycle B par rapport au reste de la molécule influence fortement la capacité de piégeage des radicaux libres. Les flavonols et les flavanols avec un 3-OH sont plans. Par contre, les flavones et les flavanones, manquant de cette caractéristique, sont un peu torsadés. La planéité permet la conjugaison, la délocalisation électronique et une augmentation correspondante dans la stabilité du radical phénoxye du flavonoïde. La suppression d'un 3-OH abroge la coplanarité et la conjugaison, et compromettant ainsi la capacité de piégeage (Heim et *al.*, 2002).
- La substitution du OH dans les positions 5 et 7 du cycle A leur donne une grande capacité à piéger les radicaux superoxydes (Mishra et *al.*, 2003).

(2)-La double liaison C₂-C₃ conjuguée avec le groupement 4-ceto, qui est responsable de la délocalisation électronique à partir du cycle B, élève d'avantage la capacité de piégeage des radicaux, et la saturation de la double liaison 2,3 cause une perte du potentiel d'activité (Amic et *al.*, 2003).

Bors et *al.* ont proposé trois caractéristiques structurales des flavonoides qui déterminent leurs capacités de piégeage des radicaux :

-la substitution 3',4' dihydroxy dans le cycle B, qui fournit une bonne délocalisation électronique et une stabilisation du radical phenoxy,

-et la coexistence de la double liaison 2,3 en conjugaison avec le groupement 4-ceto et le groupement 3-hydroxy sur le cycle C, qui augmente la délocalisation des électrons le long du noyau flavonoïdique. La quercétine qui satisfait à toutes ces exigences, a une activité antioxydante élevée (Simic et *al.*, 2007).

(3)-Cependant, la glycosylation du groupement 3-hydroxy de la quercétine pour former la rutine a résulté dans la perte des capacités antioxydantes (Simic et *al.*, 2007). La glycosylation des flavonoides diminue leur activité lorsqu'elle est comparée aux aglycones correspondants (Cai et *al.*, 2006).

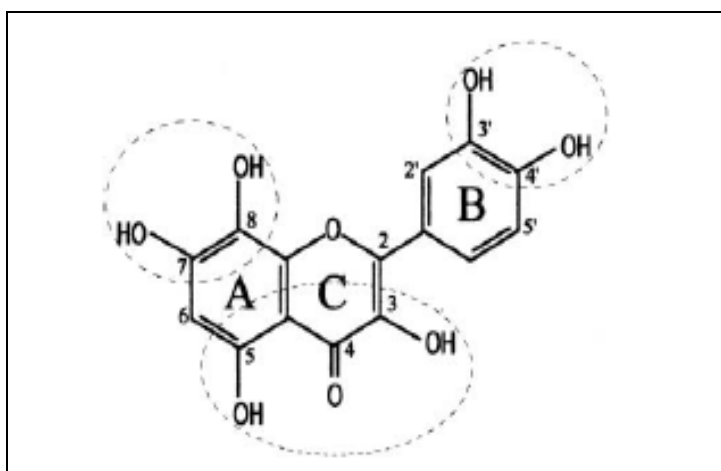


Figure 19: les caractéristiques structurales des flavonoides avec une haute activité de piégeage du radical (Amic et *al.*, 2003).

III-4-2-3-Les tannins

- Deux fractions de procyanidines, oligomériques et polymériques isolées à partir de l'extrait méthanolique de pépins de raisin ont été caractérisées. les procyanidines polymériques semblent les plus élevées en activité antioxydante, suivies par les procyanidines oligomériques, par contre les catéchines ont présenté la plus faible activité antioxydante (L'EC₅₀ des fractions de procyanidines oligomériques et polymériques ont été de 0,018 et 0,005 moles AO/mol DPPH, respectivement) (Spranger et *al.*, 2008).

- L'extrait du thé vert a montré une activité de piégeage direct contre le NO[•] et le O₂^{•-} et le mélange de tannins du thé vert, à la même concentration, a montré une grande activité scavenging. Ainsi, l'effet inhibiteur du NO[•] par le mélange de tannins à 5 µg/ml a été de 40,9% (Nakagawa et Yokozawa, 2002).

-Mode d'action

Les tannins sont des antioxydants souvent caractérisés par le pouvoir réducteur et les activités de piégeage. Les capacités antioxydantes des tannins dépendent de :

- (1)-Le degré de leur état colloïdal ;
- (2)-la faculté de clivage de la liaison interflavonoïdique ou de sa structure stéréochimique ;
- (3)-la faculté d'ouverture du cycle pyranique (cycle C) ;
- (4)-les nombres relatifs de groupements OH sur les cycles A et B. Les composés avec une structure trihydroxyle dans le cycle B ont la plus grande activité antioxydante (Rahim et *al.*, 2008).

Il apparaît que, l'augmentation du degré de polymérisation augmente l'efficacité des procyanidines contre une variété d'espèces radicalaires. Une conjugaison extensive entre le 3-OH et les groupements catéchols du cycle B, associée aux liaisons β₄→₈ abondantes dotent le polymère avec des propriétés de piégeage du radical significatives par accroissement de la stabilité du radical (Heim et *al.*, 2002).

III-5-Activité anti-xanthine oxydase

L'interaction de la XO avec un inhibiteur est intéressante non seulement d'un aspect mécanisme réactionnel de l'enzyme, mais aussi du point de vue médical. Comme l'enzyme est impliquée dans les étapes finales de production d'acide urique, un inhibiteur de la XO est utile pour remédier à l'hyperuricémie et à la goutte. En outre, comme le type O₂-dépendant de l'enzyme produit du peroxyde d'hydrogène et du superoxyde (O₂^{•-}), la conversion du type NAD-dépendant au type O₂-dépendant est proposée d'être responsable des lésions tissulaires de reperfusion post-ischémie (Okamoto et Nishino, 1995).

III-5-1-Inhibiteurs synthétiques

L'allopurinol (Ogryzlo et *al.*, 1966), la 8-Bromoxanthine (Hille et Stewart, 1984), le febuxostat (Moreland, 2005), les composés folates et amétopterine (Lewis et *al.*, 1984), le TEI-6720 (Okamoto et *al.*, 2003) et le BOF-4272 (Okamoto et Nishino, 1995) sont des inhibiteurs de synthèse de la XO. Parmi ces inhibiteurs, l'allopurinol est le plus utilisé (Kong et *al.*, 2000).

L'allopurinol (4-hydroxypyrazolo (3,4-d)-pyrimidine) comme illustré dans la figure 20 est un puissant inhibiteur de la XO qui inhibe l'oxydation d'oxypurines existant naturellement, diminuant ainsi la formation d'acide urique (Ogryzlo et *al.*, 1966). L'allopurinol, un analogue d'hypoxanthine, a été développé comme un inhibiteur de la XDH et a été largement prescrit comme un traitement de l'hyperuricémie et de la goutte. En outre, il a été rapporté que l'administration de l'allopurinol prévient les dommages tissulaires post-ischémiques en inhibant l'activité de la XO (Okamoto et *al.*, 2003).

L'allopurinol est rapidement oxydé par la XO *in vivo* en son métabolite actif l'oxypurinol qui également inhibe la XO : à de faibles concentrations, l'allopurinol est un substrat et un inhibiteur compétitif de l'enzyme ; à des concentrations élevées, c'est un inhibiteur non compétitif. L'oxypurinol est un inhibiteur non compétitif de l'enzyme ; la formation de ce composé, associée à sa longue persistance dans les tissus, est responsable de l'activité pharmacologique de l'allopurinol (Packer et *al.*, 2006). Cependant, plusieurs études ont indiqué que l'allopurinol peut induire le syndrome d'hypersensibilité et le syndrome de Stevens-Johnson chez les patients (Hsieh et *al.*, 2007).

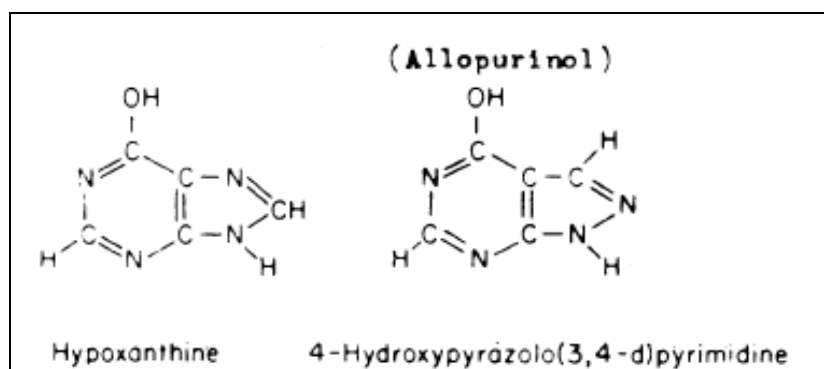


Figure 20: structure chimique de l'hypoxanthine et de l'allopurinol (Ogryzlo et *al.*, 1966).

III-5-2-Inhibiteurs naturels

III-5-2-1-Les acides phénoliques

- Des analyses par HPLC ont montré que triphala contient 73 ± 5 mg d'acide gallique/g d'espèce, qui a été trouvé d'augmenter à 150 ± 5 mg/g après une hydrolyse acide. Lorsque triphala a été testée pour l'activité de piégeage du radical superoxyde en utilisant le système X/XO, il a été observé qu'en addition à la réaction avec le radical superoxyde, elle a aussi inhibé la formation de l'acide urique, indication d'une activité inhibitrice de la XO (Naik et *al.*, 2006).

-Mode d'inhibition

Les dérivés des phénylpropanoïdes (C_6-C_3) sont un groupe important de phénols de faible poids moléculaire. Les phénylpropanoïdes les plus importants sont les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés (Chang et *al.*, 2007).

Les résultats de la structure moléculaire basée sur la modélisation ont exhibé des interactions entre les dérivés des phénylpropanoïdes et la région molybdoptérine de la XO.

- L'hydroxyle en para des dérivés de phénylpropanoïdes a été orienté vers le groupement guanidinium de l'Arg 880.
- Les dérivés de phénylpropanoïdes contenant le méta ou l'ortho hydroxyle ont formé des liaisons hydrogènes avec la Thr 1010.
- En outre, le méta hydroxyle a formé des liaisons hydrogènes avec le peptide lié entre les résidus de Thr 1010 et la Phe 1009.
- Le CAPE, l'acide caféique phenethyl ester des phénylpropanoïdes, a eu la plus grande affinité envers le site de liaison de la XO, et il a été spéculé que cela était dû à des interactions hydrophobes du phenylenethyl ester avec plusieurs résidus hydrophobes entourant le site actif (figure 21) (Chang et *al.*, 2007).

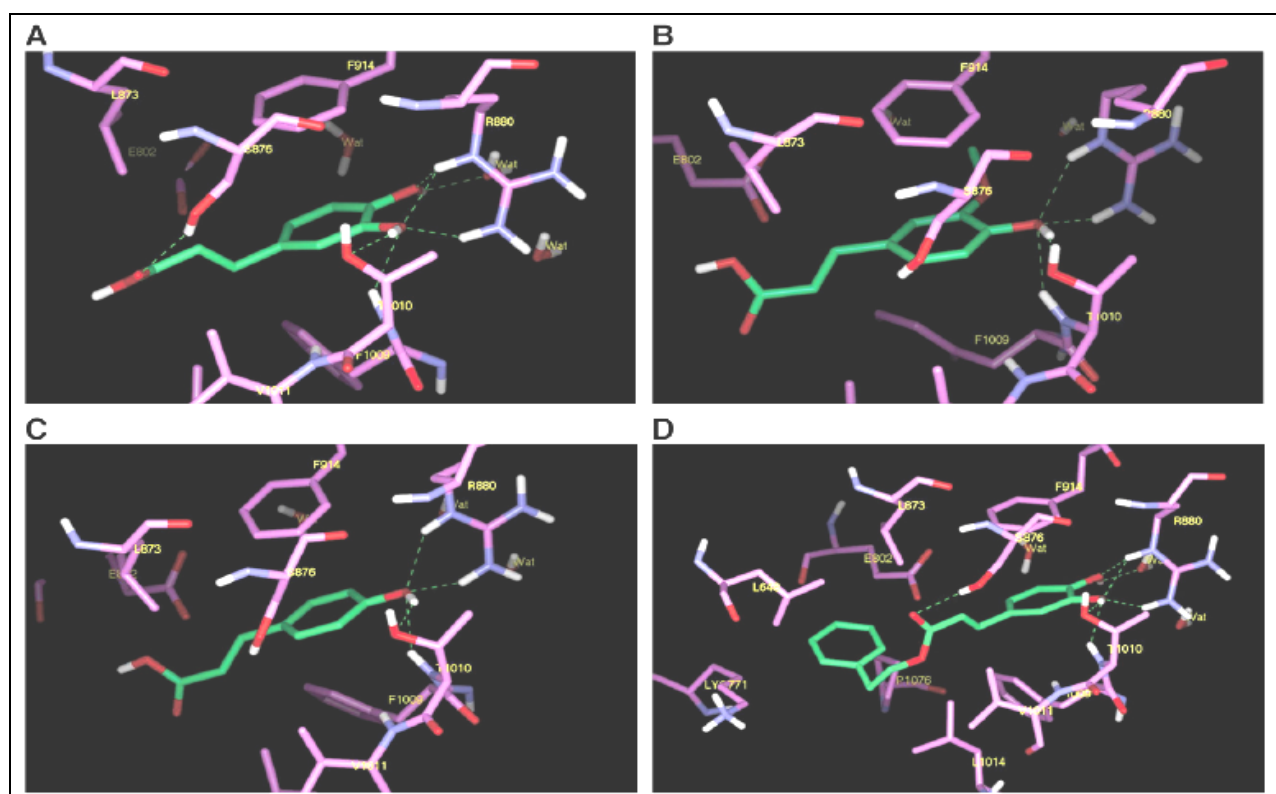


Figure 21: modèle moléculaire de liaison des phénylpropanoïdes au site actif de la XO. Un modèle en trois dimensions des dérivés de phénylpropanoïdes : (A) acide caféique, (B) acide férulique, (C) acide p-coumarique, et (D) acide caféique phenethyl ester (Chang et *al.*, 2007).

III-5-2-2-Les coumarines

Tous les dérivés ont inhibé compétitivement la XO. Les résultats de la structure moléculaire basée sur la modélisation ont exhibé des interactions entre les coumarines et la région molybdoptérine de la XO. Le carbonyle a été orienté vers l'Arg 880, et l'atome O ester a formé des liaisons hydrogènes avec la Thr 1010. L'Esculetine, qui porte deux groupements hydroxyles sur ses cycles benzènes, a eu l'affinité la plus élevée envers le site de liaison de la XO, et cela a été principalement dû à l'interaction du 6-hydroxyle avec le résidu E 802 de la XO (figure 22) (Lin et al., 2008).

Les dérivés de coumarines, dont la structure est similaire à celle d'un benzopyran-4-one, se sont révélés d'être actifs comme inhibiteurs de la XO. En effet, le modèle d'hydroxylation des coumarines s'est avéré être important pour l'inhibition de la XO, comme précédemment observé également pour les flavones et les anthocyanidines hydroxylées (Ferrari et al., 2007).

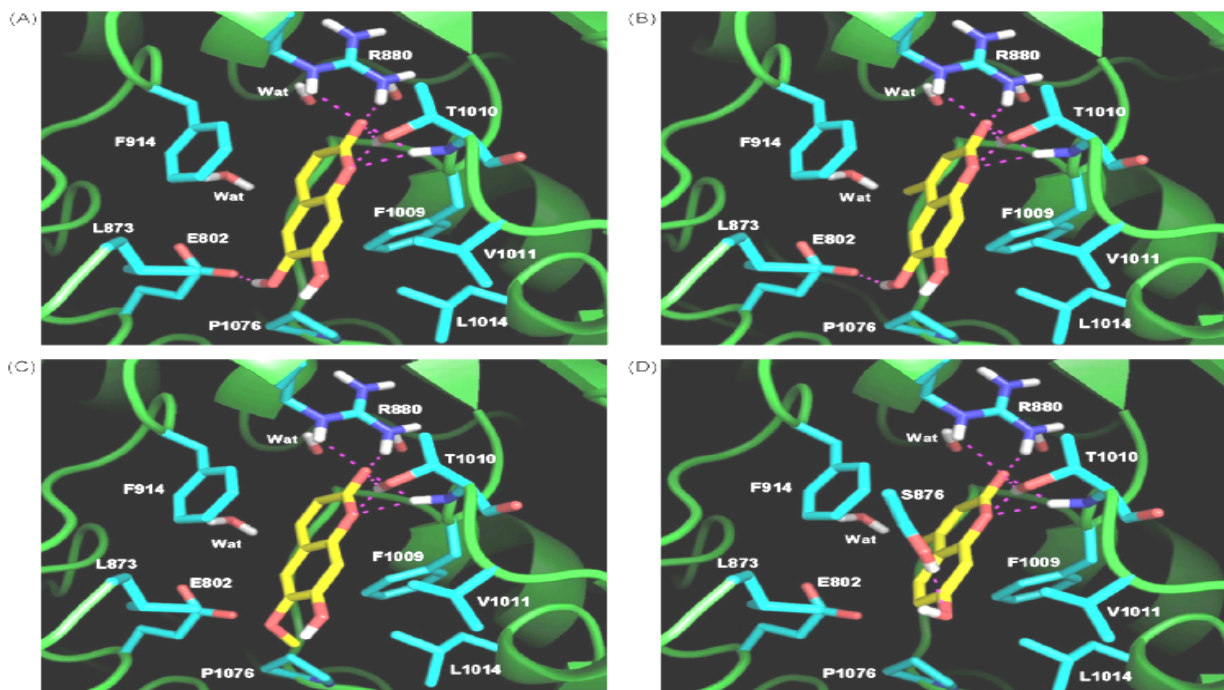


Figure 22: modèles moléculaires de la liaison des coumarines au site actif de la XO. Un modèle tridimensionnel des coumarines : (A) esculetine, (B) 4-méthylesculetine, (C) scopoletine, et (D) 4-méthyl-7-hydroxycoumarine (Lin et al., 2008).

III-5-2-3-Les flavonoïdes

- L'activité antioxydante de la myrecitine-3-O-galactoside et de la myrecitine-3-O-rhamnoside, isolés à partir des feuilles de *Myrtus communis*, a été déterminée par la capacité de chaque composé à inhiber l'activité de la XO. A une concentration de 100 µg/ml, les deux composés ont montré un effet inhibiteur de l'activité de la XO de 57% et 59%, respectivement (Hayder et al., 2008).

-Mode d'inhibition

La famille des flavonoïdes a montré une inhibition élevée de la XO (Hoorn et *al.*, 2002). A partir de la relation structure-activité associée à la modélisation, des données structurales de cette étude révèlent plusieurs facteurs importants pour la liaison des flavonoïdes dans le site actif de la XO :

(1)-Les oléfines en C₂ et C₃ qui maintiennent une structure plane des flavonoïdes sont essentielles pour une puissante activité inhibitrice de la XO. Les flavonoïdes non plans tels que la naringénine, n'ont exhibé aucune activité inhibitrice de la XO (Lin et *al.*, 2002).

(2)-Puisque l'apigénine a été le plus puissant inhibiteur parmi les flavonoïdes testés, la modélisation moléculaire a révélé que les groupements hydroxyles en C₇ et C₅ et le groupement carbonyle en C₄ fournissent des liaisons hydrogènes favorables et des interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et le site actif (figure 23) (Lin et *al.*, 2002).

(3)-Une plus petite mais significative diminution dans la valeur de l'IC₅₀ est observée quand les groupements hydroxyles 3' ou 4' sont ajoutés (Hoorn et *al.*, 2002).

Pour illustrer la contribution des groupements hydroxyles 5,7,3' et 4' à l'inhibition de la XO, la lutéoline qui a tous les groupements hydroxyles mentionnés au dessus a la valeur de l'IC₅₀ la plus basse (Hoorn et *al.*, 2002).

(4)-Certains groupements hydroxyles montrent des effets négatifs sur les valeurs de l'IC₅₀ :

- Le groupement avec la plus forte contribution négative à l'inhibition de la XO est le groupement 2'-hydroxyle (Hoorn et *al.*, 2002).
- La présence du groupement 3-hydroxyle atténue également l'inhibition (Hoorn et *al.*, 2002). Le cycle benzopyranone substitué par un 3-hydroxyle a exhibé un effet inhibiteur plus faible, qui pourrait être expliqué par la déstabilisation de l'hydroxyle polaire s'étendant vers la région hydrophobe du site actif et ayant abouti à l'abaissement de l'affinité de liaison (Lin et *al.*, 2002).
- Aussi, un substituant 8-hydroxyle a été trouvé d'avoir un effet négatif sur l'inhibition de la XO. L'addition d'un groupement 5'-hydroxyle n'a pas d'effet sur l'inhibition de la XO (Hoorn et *al.*, 2002).

(5)-La substitution glycosylique sur le C₆ du cycle benzopyranone du flavonoïde empêche la liaison des inhibiteurs au site actif de la XO (Lin et *al.*, 2002). Les groupements glycosyliques semblent être trop encombrants ou trop hydrophiles et empêchent les flavonoïdes glycosidiques d'entrer en contact avec l'enzyme (Iio et *al.*, 1985).

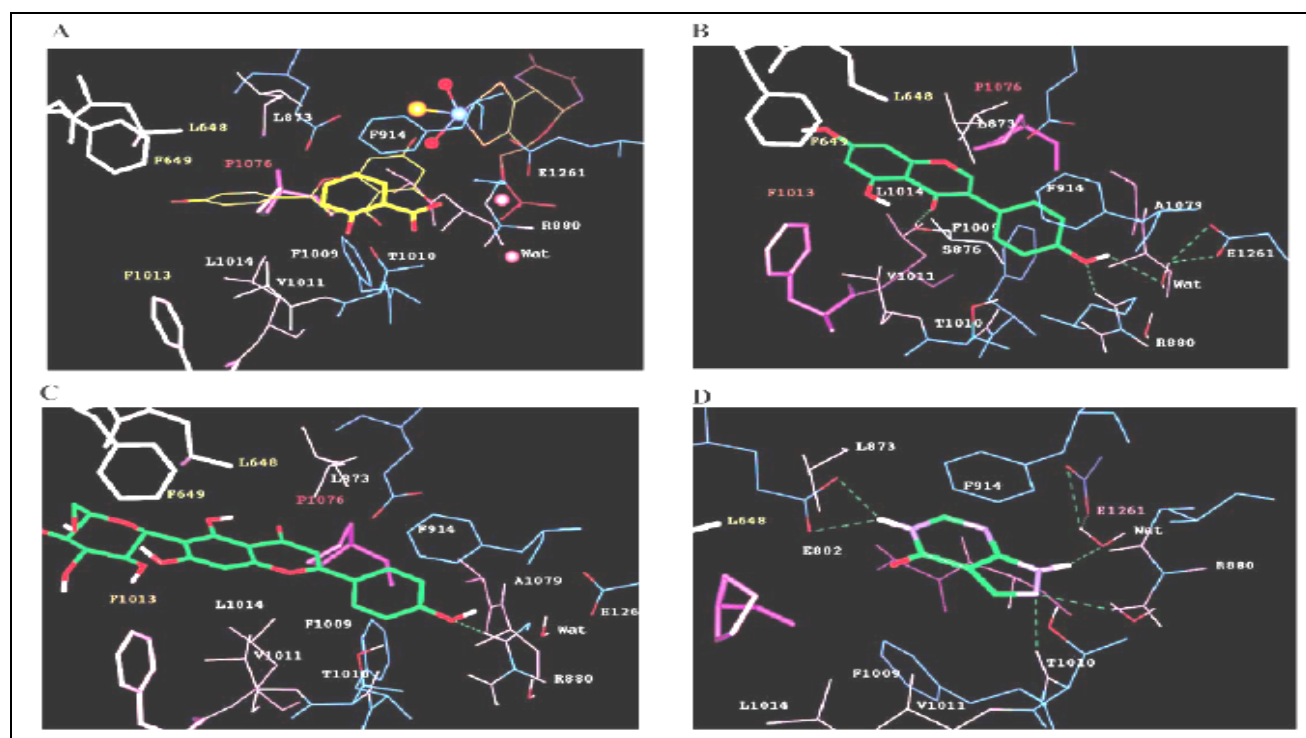


Figure 23: modèle moléculaire de la liaison des flavonoides au site actif de la XO. Modèle en trois dimensions de l'apigénine (vert) superposé sur le salicylate (jaune) (A), genestéine (B), isovitexine (C), et l'allopurinol (D) (Lin et al., 2002).

Dans le travail effectué par da Silva et al., (2004), une étude sur l'influence des propriétés électroniques, stériques et hydrophobes de quelques composés flavonoïdiques sur l'inhibition de l'activité de la XO a été réalisée en utilisant des mécaniques moléculaires et des méthodes semi-empiriques. A partir des résultats obtenus, da Silva et al. ont corrélé les propriétés moléculaires des composés flavonoïdiques étudiés avec l'inhibition de la XO. En résumé, un composé flavonoïdique va être un bon inhibiteur de la XO lorsqu'il présente une valeur pour l'angle de torsion D_3 aux alentours de 26 et 27° , une petite taille et un haut caractère hydrophobe (da Silva et al., 2004).

En fonction de leur effet sur la XO et comme piègeurs du superoxyde, les flavonoides pourraient être classés en six groupes :

- (1)-piégeurs du superoxyde sans activité inhibitrice sur la XO (catégorie A) ;
- (2)-inhibiteurs de la XO sans aucune activité additionnelle de piégeage du superoxyde (catégorie B) ;
- (3)-inhibiteurs de la XO avec une activité additionnelle de piégeage du superoxyde (catégorie C) ;
- (4)-inhibiteurs de la XO avec un effet prooxydant additionnel sur la production du superoxyde (catégorie D) ;
- (5)-des flavonoides avec un effet marginal sur la XO mais avec un effet prooxydant sur la production du superoxyde (catégorie E) ;

(6)-et finalement, des flavonoides sans effet ni sur la XO ni sur le superoxyde (catégorie F) (Cos et *al.*, 1998).

III-5-2-4-Les tannins

- Khallouki et *al.* ont quantifié et identifié plusieurs polyphénols antioxydants dans l'extrait méthanolique de l'écorce de racine de *Anisophyllea dichostyla*. En termes de l'inhibition de la XO, une fraction, dominée par la (épi)catéchine trimère et qui a également contenu des quantités appréciables de 3'-O-méthyle acide ellagique 4'-O-β-D-xylopyranoside, les catéchines (+)-catechine-3-O-β-D-gluco-pyranoside, epicatéchine-(4β→8)-catéchine (procyanidine B1), et l'(-)-epicatéchine 3-O-gallate, s'est avérée la plus puissante (IC₅₀ = 36 µg/ml) (Khallouki et *al.*, 2007).
- Une étude chimique de *Cunonia macrophylla*, basée sur les effets bioactifs de l'extrait méthanolique brut des feuilles, a détecté des tannins bioactifs pour la première fois dans cette famille de plante. Ces ellagitannins ont été identifiés et ont possédé une activité d'inhibition de la XO. Le composé, l'acide ellagique-4-O-β-D-xylopyranoside a présenté la meilleure activité (IC₅₀ = 2,1 µg/ml) (Fogliani et *al.*, 2005).

-Mode d'inhibition

Les effets inhibiteurs des tannins hydrolysables et des tannins condensés sur l'activité de la XO ont été étudiés. Des différences marquantes dans la force d'inhibition ont été observées. Certaines de ces différences parmi les tannins hydrolysables monomériques sont dues à leur poids moléculaire, reflétant le nombre de groupements hydroxyles phénoliques dans la molécule. Cependant, l'activité inhibitrice de plusieurs tannins hydrolysables oligomériques semblait particulièrement faible en dépit de leur grande taille moléculaire. Il a été également observé que des différences dans la localisation des groupements acyles sur les cœurs hydrocarbures ont causé des différences dans l'activité inhibitrice parmi les tannins hydrolysables oligomériques ou monomériques (Hatano et *al.*, 1990).

La galloylation et le degré de polymérisation dans les proanthocyanidines ont également affecté remarquablement la force de l'inhibition. Les proanthocyanidines oligomériques ayant des groupements galloyles ont montré une inhibition appréciable, dépendante du degré de polymérisation (dimère<trimère<tétramère). Cependant, l'epicatéchine gallate et l'épigallocatechine gallate monomériques n'ont montré pratiquement aucune inhibition de l'activité de la XO. Les proanthocyanidines ordinaires manquant d'un groupement acyle, et leurs constituants monomériques n'ont pratiquement montré aucune inhibition (Hatano et *al.*, 1990).

Partie pratique

Matériels et méthodes

I- Matériels et méthodes**I-1-Description des plantes****I-1-1-Le peuplier noir**

Populus nigra L., communément connue comme étant le peuplier noir, est un membre de la famille des salicaceae. C'est un arbre à feuilles caduques, grandes et vertes avec de petites fleurs jaunâtres (figure 24) (Jercović et Mastelić, 2003).

-Classification

Règne : Plantae

Embranchement : Angiosperme

Classe : Dicotylédones

Ordre : Salicales

Famille : Salicaceae

Genre : Populus

Espèce : *Populus nigra* L (Beloued, 1998).



Figure 24 : Photographie des bourgeons de *Populus nigra*.

I-1-2-Le frêne

C'est une espèce naturelle, appartenant à la famille des Oleaceae. C'est un grand arbre de 20 m de hauteur. Les feuilles sont caduques et opposées de 2 à 5 folioles et une terminale. Les fleurs sont réunies en grappes verdâtres (figure 25) (Messaoudi, 2005).

Classification

Règne : Végétal

Groupe : Angiosperme

Classe : Dicotylédones

Ordre : Oléale

Famille : Oléacées

Genre : Fraxinus

Espèce : *angustifolia* Vahl

Sous-espèce : *angustifolia* (Beloued, 1998).



Figure 25 : Photographie des feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

I-2-Cueillette et identification des plantes

Les bourgeons du peuplier noir ont été récoltés en Mars 2008 et les feuilles du Frêne en Juin 2007, dans un endroit naturel loin de la pollution, dans la forêt d'Azru n Bechar, Amizour, située à l'Est de Bejaia. Les plantes ont été identifiées par M^r Bekdouche Farid, enseignant à la FSNV.

I-3-Séchage, broyage et tamisage

Les bourgeons du Peuplier noir ont été séchés à l'étuve à une température de 37°C, pendant une semaine et les feuilles du Frêne ont été séchées à l'air libre. Il est à noter que les deux plantes ont été séchées juste après leur cueillette. Après broyage des deux parties séchées, la poudre est tamisée afin d'obtenir une poudre fine de diamètre inférieur à 63 µm.

I-4-Préparation des extraits

Le protocole d'extraction suivi est celui de Chiang *et al.*, (1994), ayant subi quelques modifications (figure 26). Il consiste en une extraction sélective des composés phénoliques en utilisant plusieurs solvants de différentes polarités, allant de solvants très polaires à des solvants apolaires, dans le but de séparer les composés phénoliques contenus dans les bourgeons de *Populus nigra* et dans les feuilles de *Fraxinus angustifolia* en composés de polarités distinctes. Les étapes d'extraction qui suivront ont été réalisées à température ambiante.

Il s'agit de mettre la poudre dans de l'éthanol absolu avec un rapport de 1/6 pour la poudre de *Populus nigra*, et de 1/4 concernant la poudre des feuilles de *Fraxinus angustifolia*, et de les laisser macérer pendant 24 heures sous agitation. Après décantation pendant 24 heures, chaque suspension a été centrifugée puis séchée jusqu'à atteindre un poids constant de l'extrait sec d'éthanol.

La deuxième étape consiste à dissoudre l'extrait sec d'éthanol dans un mélange de solvants : l'acétate d'éthyle et l'eau (1/3, v/v). Après 24 heures de décantation, deux phases, organique et aqueuse, ont été observées puis récupérées et séchées. La phase organique d'acétate d'éthyle sèche a été divisée en deux parties puis extraites chacune par un mélange de solvants : l'hexane et l'eau (1/3, v/v) et le chloroforme et l'eau (1/3, v/v). Les suspensions obtenues ont été agitées et décantées pendant 24 heures puis séchées.

Il est à noter, qu'après chaque étape d'extraction, un échantillon de chaque extrait a été récupéré afin de tester son activité. Le pourcentage d'extraction de chaque étape a été calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\% \text{ d'extraction} = (P_1 - P_0) / \text{Poids de la poudre ou de l'extrait de départ} \times 100$$

Avec :

P_0 : Poids vide du cristalliseur ou de la boîte de pétri.

P_1 : Poids après évaporation du solvant.

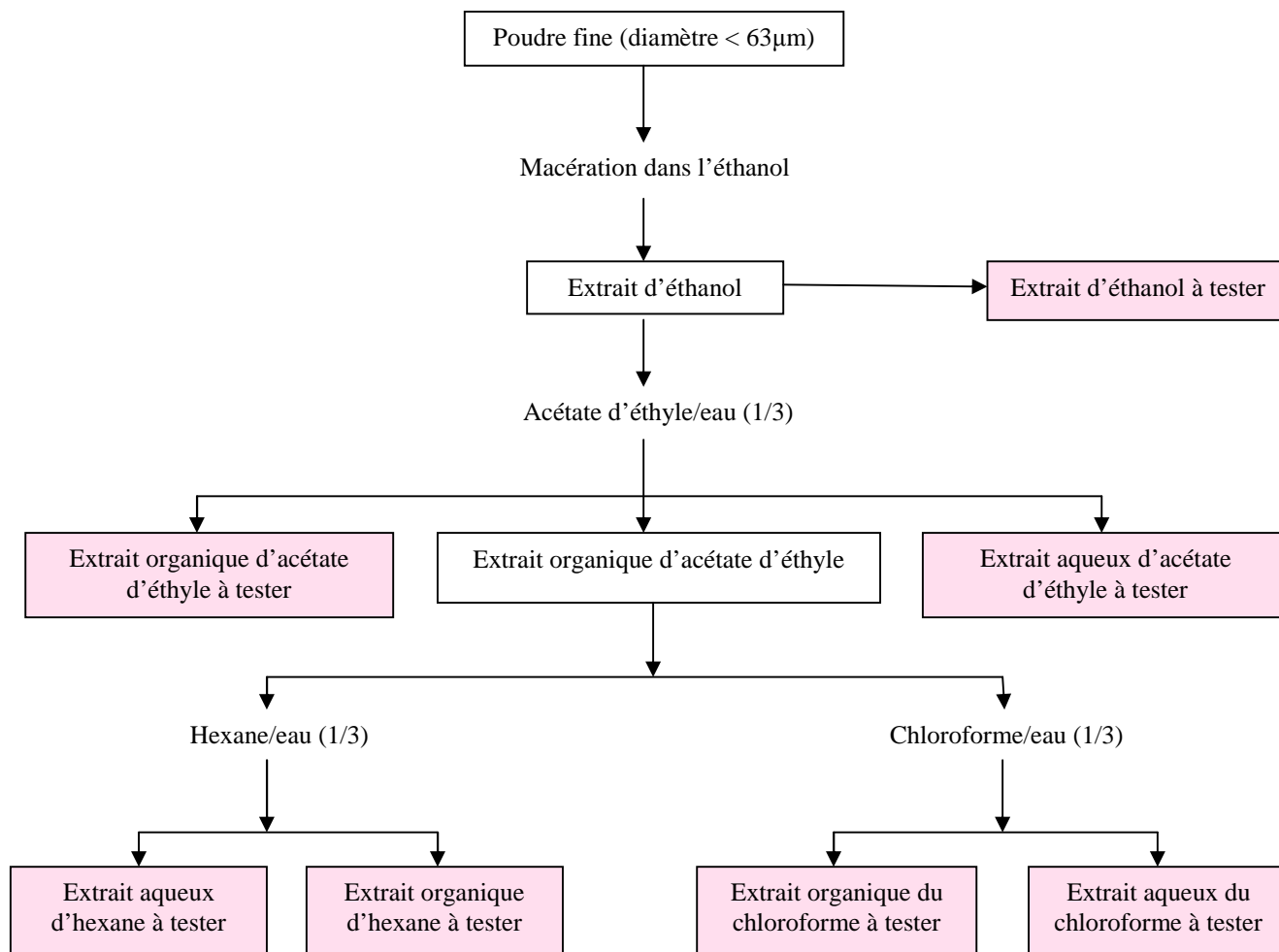


Figure 26: schéma d'extraction (Chiang et al., 1994).

I-5-Dosage des composés phénoliques

Dans le but d'évaluer qualitativement et quantitativement le contenu en composés phénoliques des extraits de bourgeons de *Populus nigra* et ceux des feuilles de *Fraxinus angustifolia*, trois protocoles ont été suivis afin de doser les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins contenus dans tous les extraits.

I-5-1-Dosage des phénols totaux

Le contenu en phénols totaux a été déterminé spectrophotométriquement à 765 nm en utilisant le procédé de Singleton et Rossi, (1965) in Kähkönen et al., (1999). La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphotungstène du réactif de Folin-Ciocalteu vers un complexe de couleur bleue, dans une solution alcaline en présence des composés phénoliques.

1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté à 200 µl d'une solution d'extrait de 0,1 mg/ml ; puis 0,8 ml de solution de carbonate de sodium (7,5%) ont été ajoutés au mélange. Ce dernier a été incubé pendant 30 mn à température ambiante et la mesure de l'absorbance à 765 nm a été effectuée. Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard afin de déterminer la concentration des extraits en phénols totaux en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait.

I-5-2-Dosage des flavonoides

Les flavonoides présents dans les extraits ont été mesurés selon le protocole de Mimica Dukić, (1992), in Maximović et al., (2004), avec quelques modifications.

Cette méthode se base sur le principe suivant : les flavonoides forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium), car ils contiennent des groupements hydroxyyles libres (Ribéreau, 1968).

10 ml d'une solution d'extrait (1 mg/ml) ont été mélangés avec 5 ml d'une solution d'acétate de sodium et de chlorure d'aluminium (133 mg d'AlCl₃, 400 mg d'acétate de sodium/ 100 ml d'eau distillée). Après incubation à température ambiante pendant 10 mn, l'absorbance a été déterminée à 430 nm. Un blanc pour chaque extrait a été utilisé contenant 10 ml d'extrait et 5 ml d'eau distillée.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant la rutine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent rutine/g d'extrait.

I-5-3-Dosage des tannins

Le dosage des tannins a été réalisé en se basant sur la précipitation des tannins par une protéine standard, l'albumine du sérum bovin (BSA), selon la méthode d'Hagerman et Butler, (1978). Le précipité est dissout à un pH élevé en présence d'un détergent et le complexe fer-phénols est déterminé spectrophotométriquement à 510 nm.

-Préparation des réactifs

Le tampon A : la solution du tampon A a été préparée avec de l'acide acétique (0,2 M) et du NaCl (0,17M) et le pH est ajusté à 4,9 avec de la NaOH.

La BSA : Une solution de la protéine BSA (1 mg/ml) est préparée dans le tampon A.

SDS/TEA : 50 ml de triethanolamine (TEA) avec 10 g de sodium dodecyl sulfate (SDS), dans un litre d'eau distillée.

FeCl₃ : 0,01 M de FeCl₃ est préparé dans une solution d'HCl à 0,01 M. La solution est filtrée après plusieurs heures.

-Mode opératoire

2 ml de la solution de BSA ont été mélangés avec 1 ml d'une solution d'extrait de plante (1 mg/ml). Après incubation pendant 24 heures à 4 °C, le mélange a été centrifugé pendant 15 mn à 3000 g. Le culot a été dissout par l'ajout de 4 ml de la solution de SDS/TEA. 1 ml de la solution de FeCl₃ a été ajouté à la solution, puis vortexé immédiatement.

La lecture de l'absorbance a été effectuée à 510 nm après 15 mn d'incubation. Le contenu en tannins a été calculé par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide tannique comme standard et exprimé en mg équivalent d'acide tannique/g d'extrait. Un blanc contenant 4 ml de solution de SDS/TEA et 1 ml de FeCl₃ a été préparé.

I-6-Characterisation des extraits

La chromatographie sur couche mince (CCM) permet la séparation des composés phénoliques selon leur poids moléculaire et leur degré de solubilité, afin de pouvoir les caractériser.

Une plaque chromatographique est composée d'un support en verre sur lequel est posée une fine couche de silice qui constitue la phase stationnaire. Sur cette dernière ont été tracées deux lignes séparées au niveau des deux extrémités de la plaque chromatographique : l'une se trouve à 2,5 cm de l'extrémité basse, et l'autre à 3,5 cm de l'extrémité haute. Des échantillons de tous les extraits et des standards utilisés ont été déposés sur la ligne basse de la plaque chromatographique en respectant la même concentration (10 mg/ml) et le même volume (10 µl), puis laissés sécher.

La deuxième étape consiste à introduire de façon inclinée la plaque chromatographique dans une cuve de chromatographie préalablement saturée par des systèmes de solvants appropriés, l'un est spécifique pour les extraits de bourgeons de *Populus nigra*, acétone-toluène-acide formique (60 :60 :10, v/v) et l'autre permet la séparation des composés phénoliques contenus dans les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, acétate d'éthyle-acide formique- acide acétique-eau (100 :11 : 11 :26, v/v). Après l'élution, la plaque chromatographique a été séchée à l'air libre puis observée à la lumière du jour et sous UV. Finalement, une révélation à la vanilline sulfurique a été effectuée par une simple pulvérisation puis un chauffage à 110 °C pendant 5 mn.

I-7-Purification de la XO

La purification de la XO a été réalisée dans le laboratoire du professeur M. Benboubetra à l'Université Ferhat Abbas de Sétif à partir du lait de vache, selon le protocole de Sanders et *al.*, (1997), avec quelques modifications. Le procédé d'extraction et de purification consiste en plusieurs étapes de centrifugation suivies d'une ultime étape de chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine (figure 27).

La première étape consiste en une centrifugation du lait froid (4 litres) à 6000 rpm, pendant 20 mn. La crème obtenue a été collectée et remuée doucement, dans un volume de tampon phosphate (0,2 M), contenant 1 mM EDTA et 5 mM dithiothréol (DTT) puis soumise à une agitation pendant 60 mn à 4°C. Le mélange récupéré a été centrifugé encore une fois à 6000 rpm, pendant 30 mn. La crème est écartée et la phase aqueuse filtrée à travers la laine de verre. 15 % (v/v) de butanol glacé et 15% (p/v) de sulfate d'ammonium ont été rajoutés lentement et sous agitation continue pendant 90 mn à 4°C. Après une centrifugation à 10000 rpm pendant 20 mn, la couche de butanol est jetée et la phase aqueuse récupérée. 20% (p/v) de sulfate d'ammonium a été lentement ajouté sous agitation à 4°C. Après une incubation de 60 mn, le mélange a subi une ultime étape de centrifugation à 11000 rpm pendant 30 mn pour récupérer un précipité marron qui est la solution enzymatique, cette dernière est soumise à une dialyse dans un tampon phosphate à pH = 6,3, pendant toute la nuit à 4°C.

La solution récupérée a été centrifugée à 20000 rpm pendant 60 mn pour faire précipiter toutes les impuretés. L'enzyme est ensuite passée dans une colonne d'héparine préalablement équilibrée dans le même tampon. L'enzyme est stabilisée dans la colonne à l'aide de la solution tampon additionnée de 0,08 M de NaCl alors que l'élution de la XO a été effectuée avec le même tampon contenant 0,25 M de NaCl. L'enzyme ainsi obtenue est dialysée pendant toute la nuit à 4°C contre un tampon bicine (50 mM, pH = 8,3).

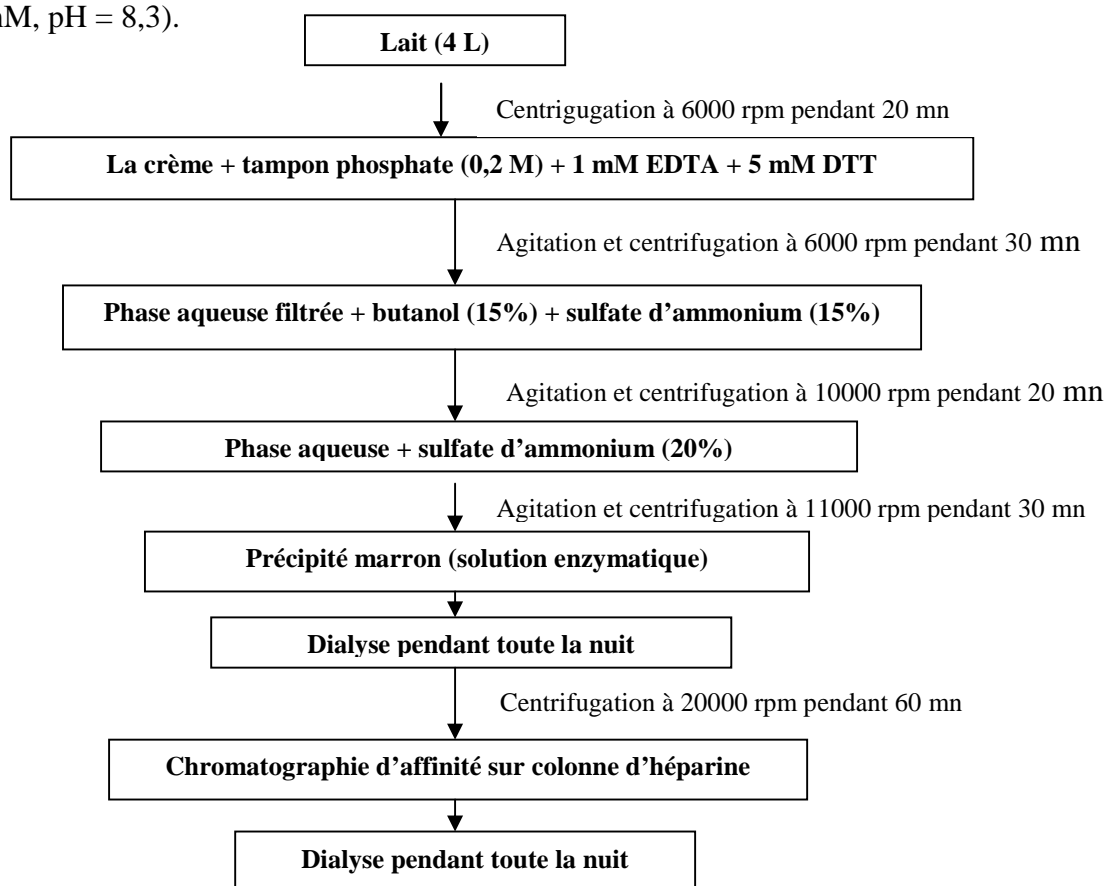


Figure 27 : protocole de purification de la xanthine oxydase.

I-8-Test d'inhibition de la XO

La mesure de l'activité inhibitrice de la XO par les extraits de bourgeons de *Populus nigra* a été réalisée suivant le protocole entrepris par Sheu et Chiang, (1996). L'enzyme, la XO, catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique, qui a un λ_{\max} de 295 nm, constituant la base pour un dosage spectrophotométrique de l'activité de la XO (Sheu et Chiang, 1997).

-Préparation des solutions

Tampon bicine : 5 mM, 200 ml, pH = 8,3. 1,632 g/200 ml d'eau distillée.

Xanthine : 1 mM, 50 ml de tampon bicine. 0,007605 g de xanthine a été dissout par quelques gouttes de NaOH (0,2 M) puis, 50 ml de tampon bicine ont été rajoutés à la xanthine dissoute.

Solutions des extraits : Les extraits ont été dissouts dans du DMSO (10 mg/ml).

-Mode opératoire**-Test d'activité de la XO**

A 1760 μ l de tampon bicine ont été ajoutés 200 μ l de xanthine, 20 μ l de DMSO et après addition de 20 μ l de XO dans le mélange réactionnel, l'absorbance à 295 nm est mesurée pendant 3 mn chaque 5 secondes. Un blanc a été préparé sans l'enzyme.

-Test d'inhibition de la XO

20 μ l de solution de chaque extrait ont été ajoutés à la place des 20 μ l de DMSO. Un blanc ne contenant pas la XO a été préparé. L'inhibition de la XO est caractérisée par la diminution de l'absorbance à 295 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la XO par les extraits a été calculé suivant l'équation ci-dessous :

$$\% \text{ d'inhibition de la XO} = (P_A - P_I) / P_A \times 100$$

Où :

P_A : la pente du test d'activité.

P_I : la pente du test d'inhibition.

I-9-Activités antioxydants des extraits**I-9-1-Inhibition de la formation du radical hydroxyle**

L'activité scavenging du radical hydroxyle par les différents extraits de bourgeons de *Populus nigra* et des feuilles de *Fraxinus angustifolia* a été mesurée suivant la méthode de Smirnoff et Cumbes, (1996), in Gu et al., (2008).

Le principe de la méthode est basé sur la mesure de la décoloration de la solution contenant le complexe Fe^{2+} -salicylate de couleur violette après hydroxylation du salicylate par le radical hydroxyle généré par la réaction de Fenton.

1 ml des solutions d'extrait avec différentes concentrations, 0,3 ml de solution de FeSO_4 à 8 mM et 0,25 ml de solution de peroxyde d'hydrogène à 20 mM ont été mélangés dans un tube de centrifugation. En suite, 1 ml de solution d'acide salicylique à 3 mM a été introduit et incubé à 37°C pendant 30 mn. 0,45 ml d'eau distillée ont été ajoutés à chaque tube pour atteindre un volume final de 3 ml. Après centrifugation à 2000 rpm pendant 10 mn, l'absorbance des suspensions a été mesurée à 510 nm. La catéchine a été utilisée comme standard et à différentes concentrations.

La formule permettant de calculer le pourcentage d'inhibition de la formation du radical hydroxyle est la suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

Avec :

A_t : absorbance du test.

A_0 : absorbance du blanc.

I-9-2-Inhibition de la peroxydation lipidique (Test TBARS)

Le protocole TBARS, modifié, de Ohkawa et *al.*, (1979), in Pandey et *al.*, (2007), a été suivi en utilisant l'homogénat de jaune d'œuf comme un milieu riche en lipides. Le malondialdéhyde (MDA), un produit final secondaire de l'oxydation des acides gras polyinsaturés, réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) produisant un chromogène rouge rosâtre avec un maximum d'absorbance à 532 nm (Banerjee et *al.*, 2005).

0,5 ml d'homogénat de jaune d'œuf (10 % dans l'eau distillée v/v) et 0,1 ml de solution d'extrait (100 µg/ml) ont été mélangés dans un tube à essai et le volume a été complété à 1 ml avec de l'eau distillée. 0,05 ml de FeSO_4 (0,07 M) a été ajouté au mélange précédent et incubé pendant 30 mn à 37 °C pour induire une peroxydation lipidique. Ensuite, 1,5 ml d'acide acétique (20%) (pH ajusté à 3,5 avec de la NaOH), 1,5 ml de TBA (0,8%) (w/v) (préparé dans 1,1% de sodium dodecyl sulfates) et 0,05 ml de TCA (acide trichloroacétique) (20%) ont été additionnés, puis vortexés et chauffés à 100°C dans un bain marie pendant 60 mn. Après refroidissement, 5 ml de 1-butanol ont été rajoutés puis le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 mn. L'absorbance de la phase organique a été mesurée à 532 nm.

Pour le blanc, 0,1 ml d'eau distillée a été utilisé à la place de l'extrait. Des blancs d'extraits ont été préparés en mettant à la place du TBA du sodium dodecyl sulfates.

Le pourcentage d'inhibition est donné par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

Avec :

A_0 : Absorbance du blanc

A_t : Absorbance du test

I-10-Fractionnement des extraits

Dans le but de fractionner d'avantage les extraits de bourgeons de *Populus nigra*, et de tester l'activité des fractions récoltées sur l'inhibition de l'activité de la XO, une chromatographie sur colonne a été mise en œuvre sur un gel de silice.

Le gel de silice a été préparé à l'aide d'un solvant apolaire qui est le chloroforme. L'extrait éthanolique de bourgeons de *Populus nigra* à une concentration de 20 mg/ml, a été fractionné en introduisant, 1 ml de cette solution d'extrait soigneusement dans la colonne.

L'élution des fractions a été réalisée par une succession de systèmes de solvants de polarité croissante : chloroforme, chloroforme/acétate d'éthyle (1/1 : v/v), acétate d'éthyle, eau distillée et en fin eau/acide formique (1/0,1 : v/v).

Les fractions récupérées graduellement ont été séchées, puis soumises au test d'inhibition de la XO.

I-11-Etude statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne \pm écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Anova. Les différences ont été considérées d'être significatives à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC_{50} ont été calculées en utilisant le logiciel Origin 8.

Résultats et discussion

II-Résultats et discussion

II-1- Extraction

Le taux d'extraction des composés phénoliques dépend de la méthode, la nature du solvant, la température et de la taille des particules constituant la poudre de la plante (Chavan et *al.*, 2000; Goli et *al.*, 2004; Mukhopadhyay et *al.*, 2005). Dans notre travail, afin d'obtenir des combinaisons phénoliques distinctes, une extraction liquide-solide sélective a été réalisée en utilisant plusieurs solvants de différentes polarités, à savoir, des solvants polaires : l'eau, l'éthanol et l'acétate d'éthyle, et des solvants apolaires tels que : l'hexane et le chloroforme. Commencer l'extraction par l'éthanol est intéressant car ce dernier représente un solvant permettant la dissolution de la majorité des composés phénoliques (Cowan, 1999).

En outre, dans le but d'augmenter le rendement d'extraction, la poudre très fine (diamètre < 63 µm) a été utilisée afin d'élargir la surface d'échange entre la plante et le solvant d'extraction. Ce diamètre a été choisi d'après l'expérience de M^{elle} Boudaoud H., (2003), qui a testé la dissolution de la poudre de plante à différents diamètres.

Une fois les extraits secs, le calcul des taux d'extraction dans chaque étape a donné les résultats suivants :

Tableau II : les pourcentages d'extraction des extraits de *Populus nigra* et de *Fraxinus angustifolia*

Extraits	% d'extraction (<i>P. nigra</i>)	% d'extraction (<i>F. angustifolia</i>)
Ethanolique	3,7	7,71
D'acétate d'éthyle	38,91	49,93
Aqueux d'acétate d'éthyle	20,29	34,63
D'hexane	76,64	51,67
Aqueux d'hexane	3,29	13,75
Du chloroforme	82,72	87,5
Aqueux du chloroforme	4,71	11,69

D'après ces résultats, nous remarquons que les taux d'extraction des extraits de bourgeons de *Populus nigra* les plus élevés sont ceux des extraits organiques. Egger et ses collaborateurs, (1969), ont montré que les bourgeons de *Populus nigra* L. exsudent un matériel lipophile dans la composition duquel entrent des aglycones flavoniques et des terpènes (Charrière-Ladreix, 1976).

Nous constatons que *Populus nigra* est riche en composés peu polaires ; cela pourrait supposer que la plante est riche en métabolites secondaires de différentes classes dont la polarité est réduite. Mais cela n'exclurait guère sa contenance en composés polaires qui pourraient posséder une efficacité fonctionnelle appréciable indépendante de la quantité mais de la nature biochimique des composés actifs.

D'après les taux d'extraction des feuilles de *F. angustifolia*, nous constatons que les rendements d'extraction les plus élevés concernent également les extraits organiques; toutefois, les taux d'extraction dans les phases aqueuses ne sont pas négligeables; ce qui montre l'abondance de *Fraxinus angustifolia* en composés de polarité élevée, dont les composés phénoliques, due à leur teneur élevée en groupements polaires, particulièrement, les groupements OH qui représentent la fonction principale des composés phénoliques (Chen et Ho, 2007).

En comparant les pourcentages d'extraction des deux plantes, on en déduit que les feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont plus riches en composés polaires que ne le sont les extraits de bourgeons de *Populus nigra*.

II-2-Dosage des composés phénoliques

- Les phénols totaux

Les contenus en phénols totaux des extraits de bourgeons de *Populus nigra* et des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, exprimés en mg équivalent acide gallique/g d'extrait, sont représentés dans les figures ci-dessous :

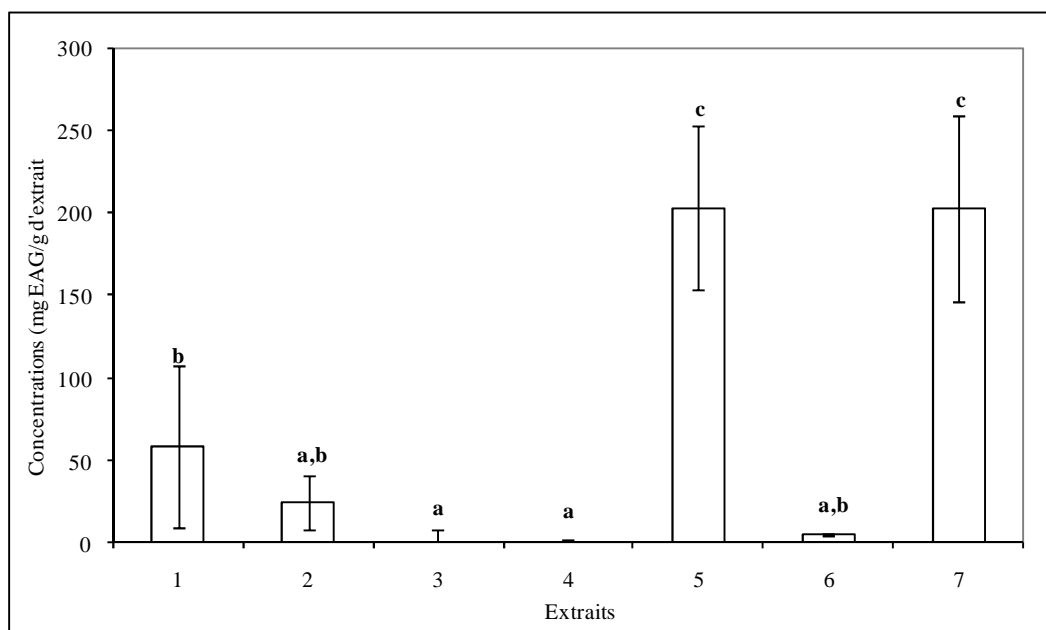


Figure 28 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits de bourgeons de *Populus nigra*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme.

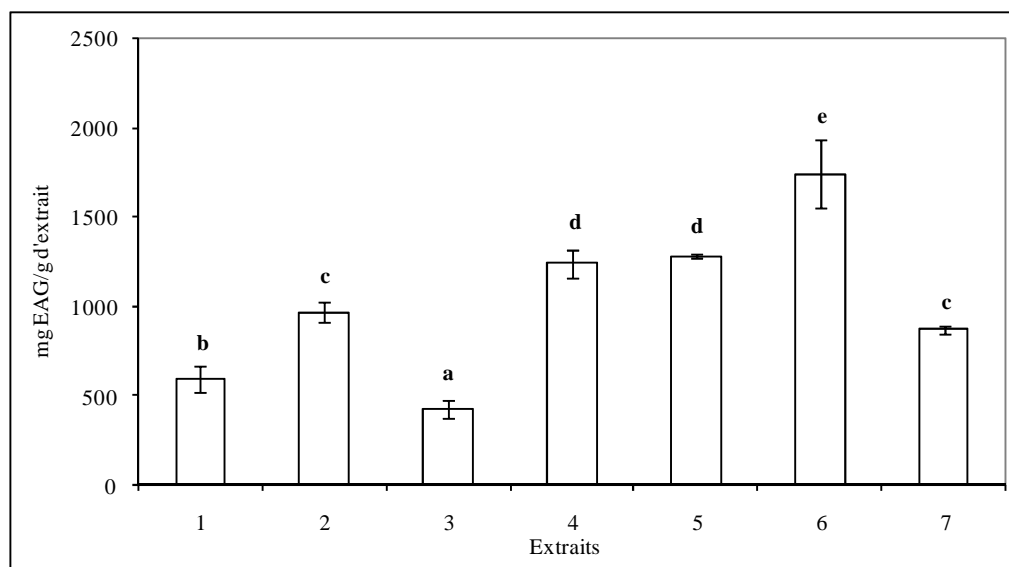


Figure 29 : Teneurs en phénols totaux des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme.

Si on calcule le taux en phénols totaux de l'extrait brut par rapport à un gramme de poudre, on obtient une concentration de 2,15 mg équivalent acide gallique/g de poudre de *Populus nigra* et une concentration de 45,82 mg équivalent acide gallique/g de poudre pour *Fraxinus angustifolia* ; ces taux nous permettent de classer les deux plantes d'après une étude faite par Kähkönen et al., (1999), qui ont montré que la quantité en phénols totaux variait beaucoup dans les plantes et sont classées de 0,2 à 155,3 mg équivalent acide gallique/g de poudre. *Populus nigra* fait partie de la classe à faible quantité. Alors que, *Fraxinus angustifolia* fait partie de la classe à quantité élevée.

-*Populus nigra* : D'après la figure 28, les extraits aqueux de *Populus nigra* ont montré les niveaux les plus élevés; les composés phénoliques sont riches en groupements hydroxyles qui sont polaires et leur permettent ainsi de se dissoudre dans les solvants polaires (Papagiannopoulos et Galensa, 2005).

Le taux en phénols totaux dans l'extrait éthanolique ($58,15 \pm 49,34$ mg EAG/g d'extrait) est légèrement inférieur par rapport à quelques extraits, cela pourrait être expliqué par le fait que les composés phénoliques n'ont pas été entièrement révélés par le réactif du Folin-Ciocalteu dans l'extrait natif (éthanolique), car il y aurait un encombrement stérique résultant non seulement de la présence de composés phénoliques mais aussi d'autres composés appartenant à des classes de métabolites secondaires ou bien au fait qu'il se formerait des interactions moléculaires, provoquant ainsi la diminution de la quantité des groupements réducteurs spécialement les groupements hydroxyles (Singleton et Rossi, 1965 ; Cicco et al., 2009).

Les teneurs en phénols totaux des extraits organiques sont très faibles vu leur richesse en tannins très condensés (figure 32) qui empêcheraient la détection de la majorité des composés phénoliques.

-*Fraxinus angustifolia* : la figure 29 montre que tous les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* contiennent des teneurs importantes en phénols totaux; avec l'extrait du chloroforme ayant montré la plus grande concentration en phénols totaux ($1743,07 \pm 190,15$ EAG/g d'extrait).

Nous déduisons que les feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont plus riches en composés phénoliques que les bourgeons de *Populus nigra*.

-Les flavonoïdes :

La figure 30 illustre les concentrations en flavonoïdes des extraits de bourgeons de *Populus nigra* exprimées en mg équivalent rutine/g d'extrait.

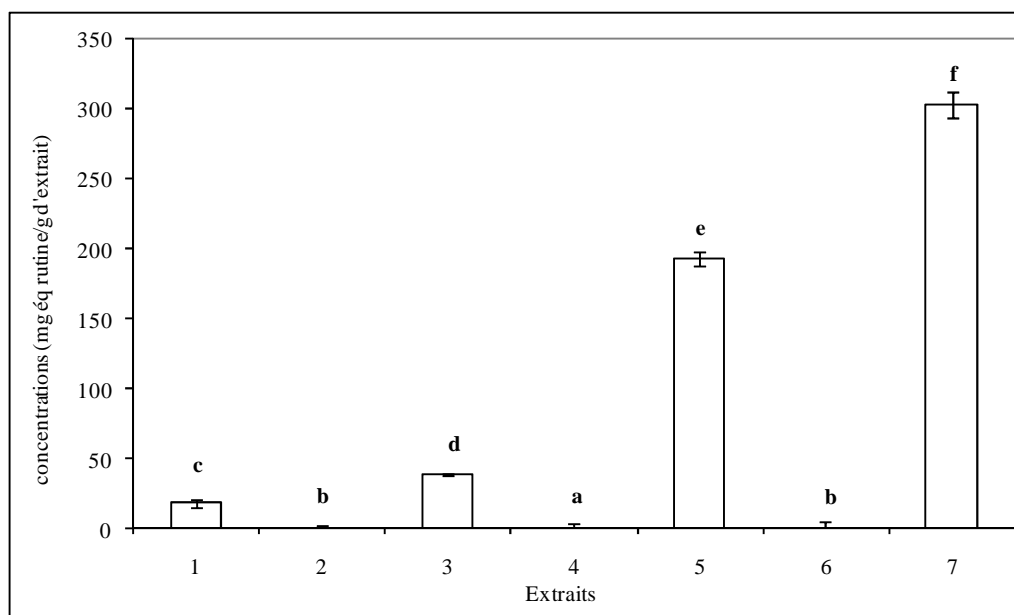


Figure 30 : Teneurs en flavonoïdes des extraits de bourgeons de *Populus nigra*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme.

D'après la figure 30 nous constatons que les extraits de *Populus nigra* contiennent des flavonoïdes . Une étude réalisée par Maciejewicz et ses collaborateurs, sur l'identification des flavonoïdes aglycones isolés à partir de *Populus nigra* a révélé que la plante possède 5 flavonoïdes : Pinostrobin chalcone, Pinocembrine, Tectochrysin, Chrysin, Galangine (Maciejewicz et al., 2001). On remarque que les extraits aqueux ont montré les concentrations les plus élevées, vu que les flavonoïdes sont de petites molécules très solubles dans les solvants polaires, grâce à leur teneur élevée en groupements hydroxyles (Papagiannopoulos et Galensa, 2005).

L'extrait éthanolique des bourgeons de *Populus nigra* a une très faible concentration; cela serait du au fait qu'il contiendrait beaucoup d'autres composés et entre autres des tannins condensés qui empêcheraient la détection des flavonoides par le réactif requis (Singleton et Rossi, 1965 ; Cicco et *al.*, 2009). La même observation est faite pour les extraits organiques.

La figure 31 montre les teneurs en flavonoides des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, exprimées en mg équivalent rutine/g d'extrait.

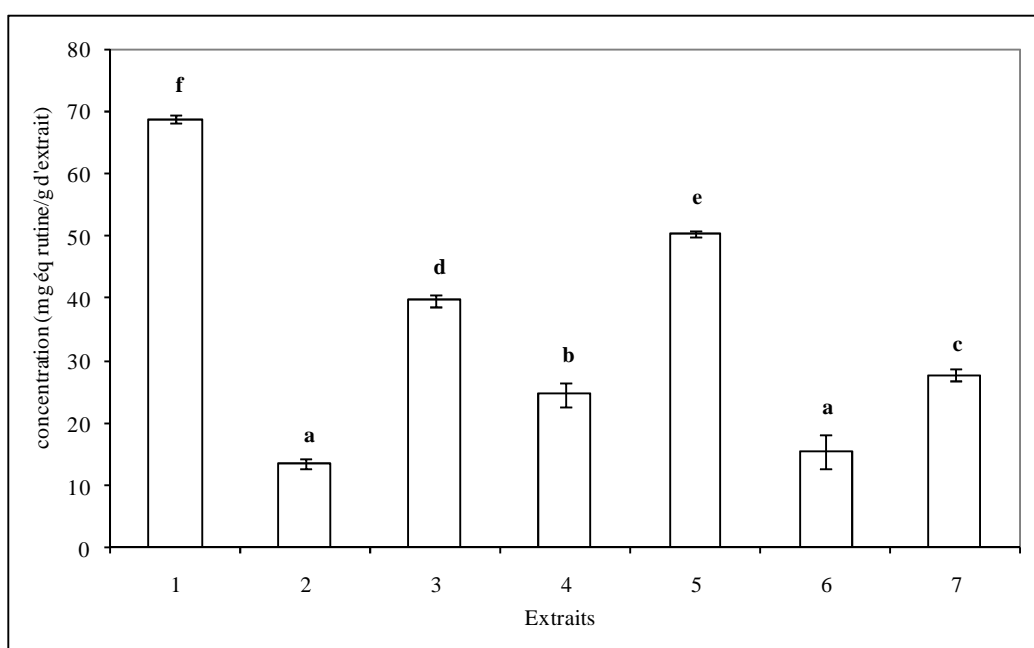


Figure 31 : Concentrations en flavonoides des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme.

En ce qui concerne les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, nous constatons également que ce sont les extraits aqueux qui ont montré les valeurs les plus élevées. La comparaison entre les concentrations en flavonoides de *Populus nigra* et celles de *Fraxinus angustifolia*, montre que les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane de *Populus nigra* possèdent les quantités les plus élevées en flavonoides, alors que celles des extraits organiques de *Fraxinus angustifolia* sont plus importantes que celles des extraits organiques de *Populus nigra*.

-Les tannins

Les taux en tannins mesurés en mg équivalent acide tannique/g d'extrait pour les extraits de *Populus nigra* et de *Fraxinus angustifolia* figurent dans les deux histogrammes suivants :

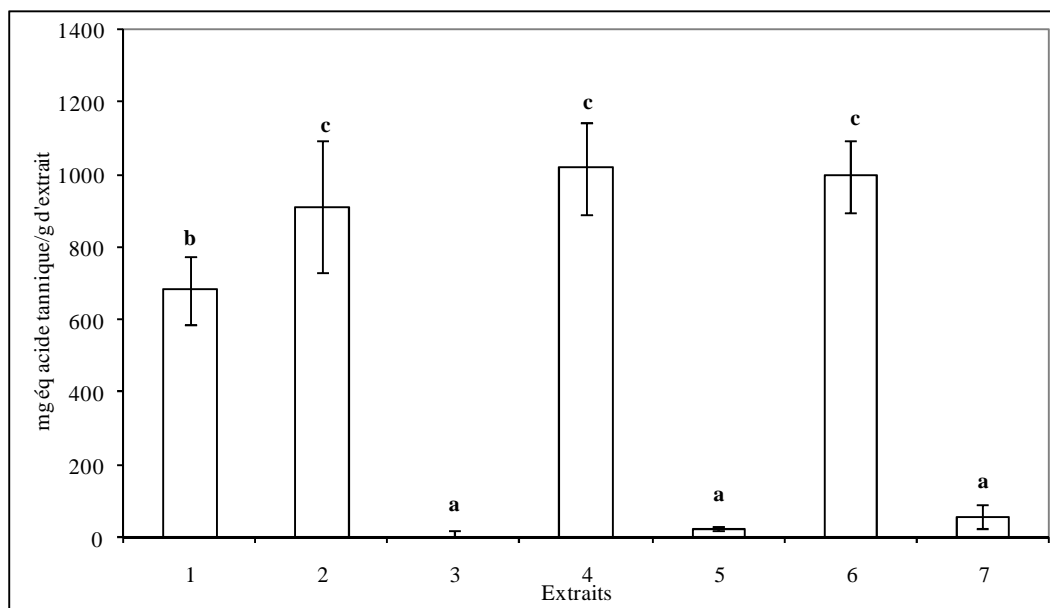


Figure 32 : Concentrations en tannins des extraits de bourgeons de *Populus nigra*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme.

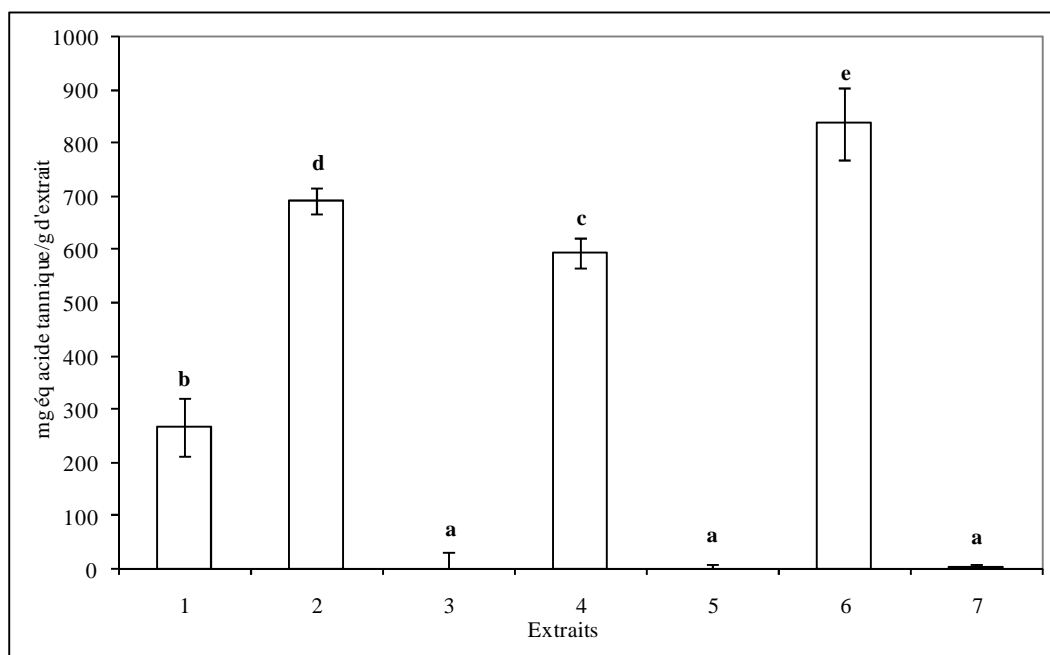


Figure 33 : Teneurs en tannins des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme.

Les extraits organiques des deux plantes ont montré les concentrations les plus élevées en tannins; les tannins constituent des structures polycycliques d'où leur caractère légèrement hydrophobe donc, se solubilisant dans les solvants organiques.

Une étude effectuée par Chunlong et ses collaborateurs, sur la détermination des concentrations phénoliques des composés d'une plante du même genre que le peuplier noir : *Populus euphratica*, a démontré la présence de phénols totaux, de flavonoïdes et de tannins condensés au niveau des différentes parties de la plante (Chunlong et *al.*, 2008).

II-3-Characterisation des extraits

La CCM permet de séparer les composants des extraits dans le but de les caractériser. L'analyse du profil chromatographique des extraits de bourgeons de *Populus nigra* à la lumière du jour (figure 34) nous permet de constater que l'extrait éthanolique a laissé apparaître toutes les bandes retrouvées dans les différents extraits.

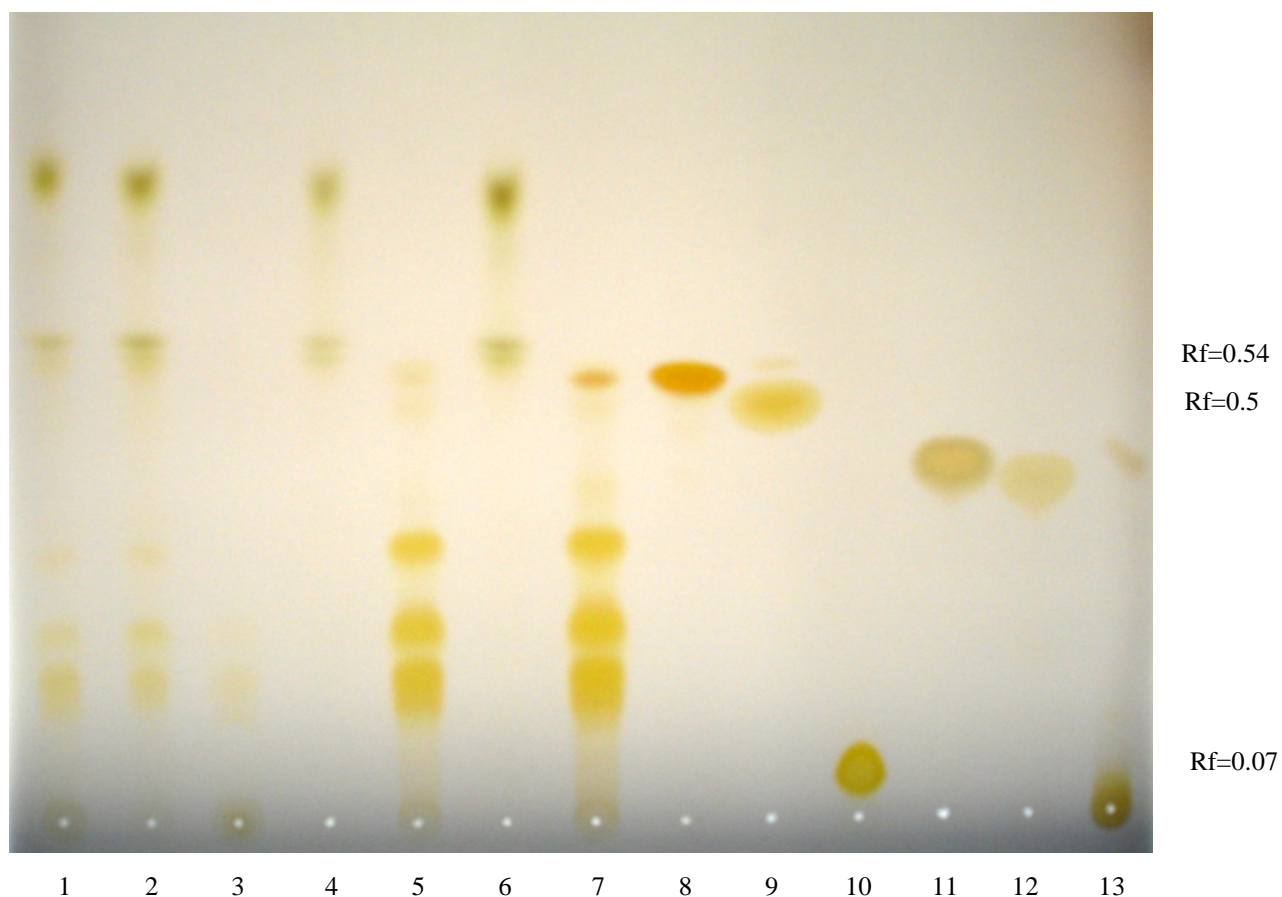
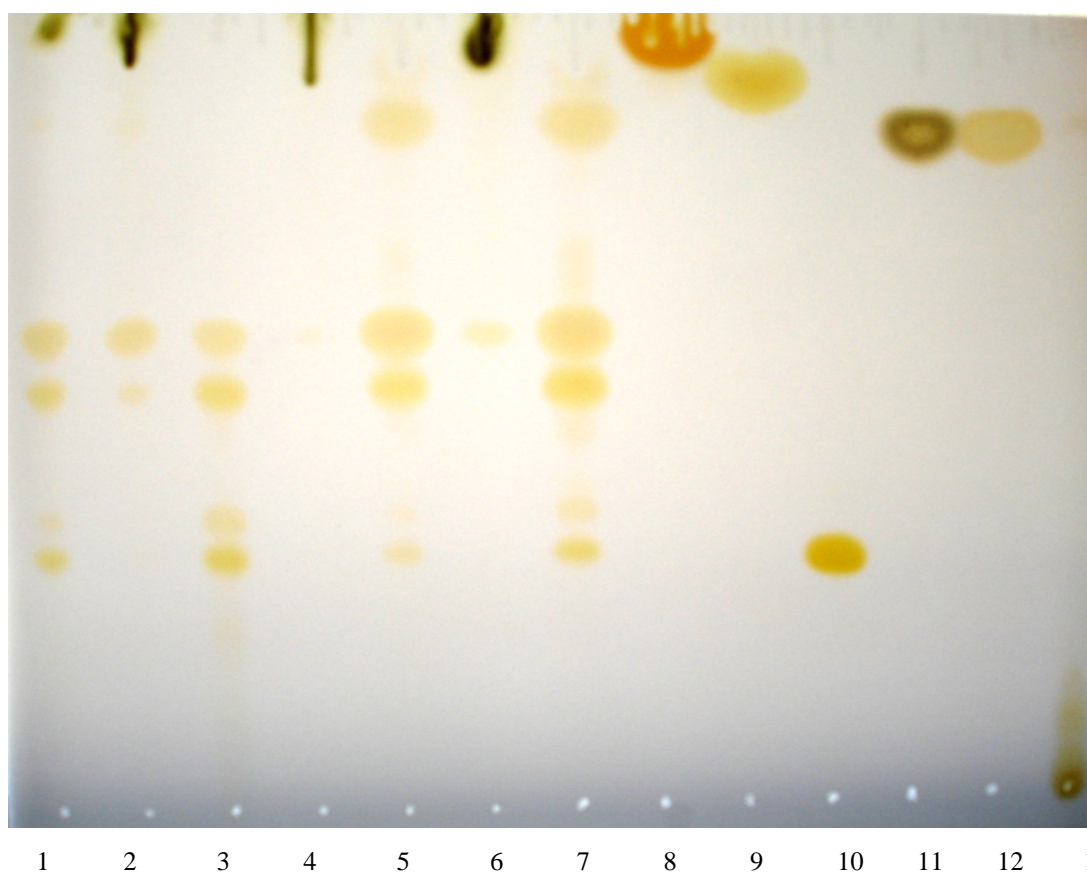


Figure 34 : profil chromatographique des extraits de bourgeons de *Populus nigra* réalisé à la lumière du jour. (1) : extrait éthanolique ; (2) : extrait d'acétate d'éthyle ; (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle ; (4) : extrait d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : extrait du chloroforme ; (7) : extrait aqueux du chloroforme ; (8) : quercétine ; (9) : acide caféique ; (10) : rutine ; (11) : acide gallique ; (12) : catéchine ; (13) : acide tannique.

Une observation importante a été faite au niveau des taches issues de l'extrait aqueux du chloroforme; on en déduit la présence d'une bande ayant le même rapport frontal que le standard utilisé, la quercétine (0,54) qui est un très bon scavenger des radicaux libres et un bon inhibiteur de la XO (Simic et *al.*, 2007 ; Lin et *al.*, 2002).

En outre, nous remarquons la présence de deux spots au niveau de l'extrait aqueux d'hexane de *Populus nigra* ayant le même rapport frontal que l'acide caféique (0,5) et la quercétine (0,54), ce qui permettrait de déduire que les bourgeons de *Populus nigra* contiendraient bien de l'acide caféique et de la quercétine. Ceci est en accord avec les résultats de Greenaway et *al.*, (1990) et Greenaway et Whatley, (1990), qui ont montré que les exsudats des bourgeons de *Populus nigra* contiennent les acides caféiques et isoferuliques avec leurs esters, des chalcones, des flavanones et des flavones comme étant les composés majoritaires (Vardar-Ünlü et *al.*, 2008).

D'après les résultats obtenus à partir de la CCM des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* à la lumière du jour (figure 35), nous déduisons que les extraits aqueux ont donné le maximum de bandes, ce qui montre que cette plante est riche en composés phénoliques.



Rf=0.32

Figure 35 : profil chromatographique de tous les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* réalisé à la lumière du jour. (1) : extrait éthanolique ; (2) : extrait d'acétate d'éthyle ; (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle ; (4) : extrait d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : extrait du chloroforme ; (7) : extrait aqueux du chloroforme ; (8) : quercétine ; (9) : acide caféique ; (10) : rutine ; (11) : acide gallique ; (12) : catéchine ; (13) : acide tannique.

Nous remarquons également que tous les extraits aqueux possèdent une tache ayant le même rapport frontal que la rutine (0,32), ce qui permettrait de supposer que les feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont riches en rutine. Cela est en accord avec les résultats d'une étude récente qui a montré également que *Fraxinus angustifolia* contiendrait de la rutine (Costova et Lossifova, 2007).

Le profile chromatographique révélé par la vanilline sulfurique des extraits de bourgeons de *Populus nigra* (figure 36) montre la présence de plusieurs taches violettes qui pourraient correspondre aux monoterpènes, stéroïdes et aux caroténoïdes (Jork et al., 1994). Ceci montre la richesse des bourgeons de *Populus nigra* en composés peu polaires.

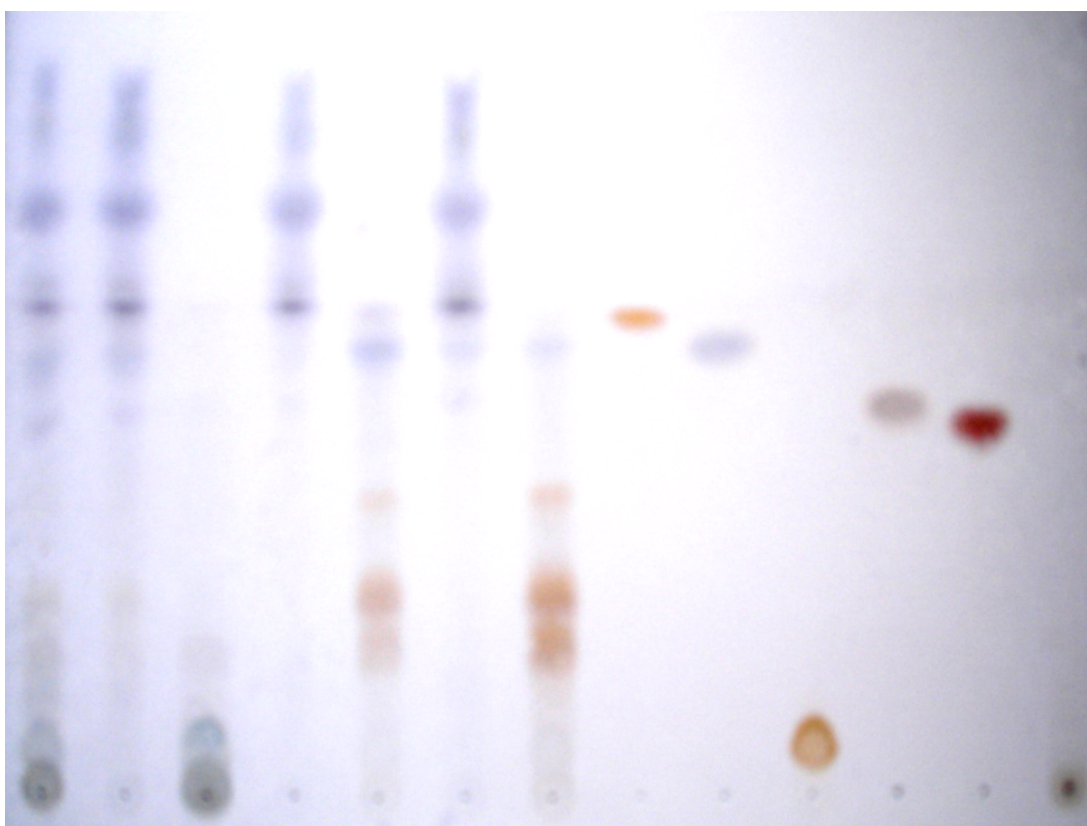


Figure 36 : profile chromatographique pour les extraits de bourgeons de *Populus nigra* obtenu après révélation par la vanilline sulfurique. (1) : extrait éthanolique ; (2) : extrait d'acétate d'éthyle ; (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle ; (4) : extrait d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : extrait du chloroforme ; (7) : extrait aqueux du chloroforme ; (8) : quercétine ; (9) : acide caféique ; (10) : rutine ; (11) : acide gallique ; (12) : catéchine ; (13) : acide tannique.

A partir du profile chromatographique sous UV des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* (figure 37) nous observons quelques spots de couleur bleue ce qui révèle que les feuilles de *Fraxinus angustifolia* contiendraient des acides phénoliques autres que l'acide caféique et l'acide gallique (Misirh et Özeker).

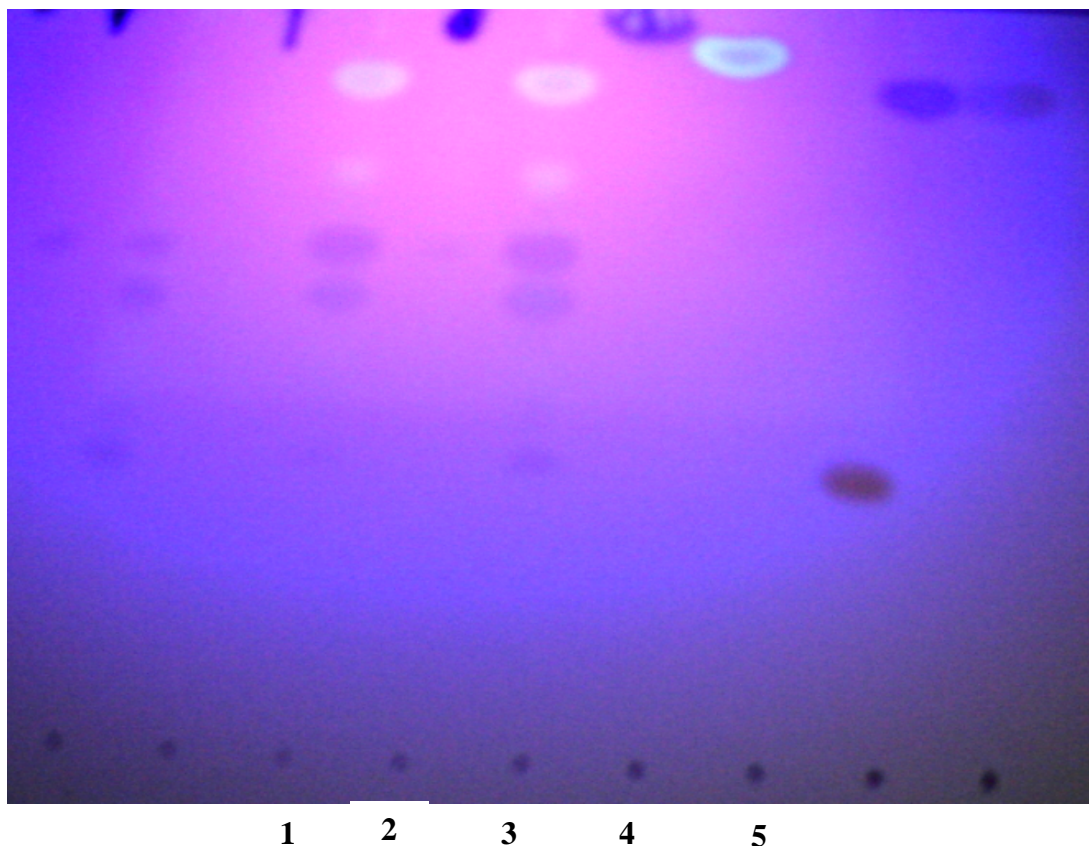


Figure 37 : vue sous UV de la plaque chromatographique des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*. (1) : extrait aqueux d'hexane ; (2) : extrait du chloroforme ; (3) : extrait aqueux chloroforme ; (4) : quercétine ; (5) : acide caféique.

II-4-Cinétique d'inhibition de la XO

L'inhibition de la XO peut être bénéfique pour traiter la maladie de la goutte caractérisée par une élévation de la concentration de l'acide urique et pour traiter les pathologies associées aux radicaux libres (Okamoto et Nishino, 1995). L'inhibition de la XO par les extraits de plante serait intéressante pour substituer les molécules synthétiques (l'allopurinol) ayant montré des effets secondaires chez l'homme (Hsieh et al., 2007).

Les résultats montrent que les extraits aqueux des bourgeons de *Populus nigra* (figure 38) ont donné les activités inhibitrices les plus élevées contre la XO. Les résultats des dosages ont révélé la richesse de ces extraits en flavonoïdes qui sont connus pour être de forts inhibiteurs de la XO (Hoorn et al., 2002).

Par contre, les extraits organiques sont de faibles inhibiteurs de la XO étant donné leur abondance en tannins qui seraient trop encombrants pour pouvoir se fixer au site actif de l'enzyme (Hatano et al., 1990).

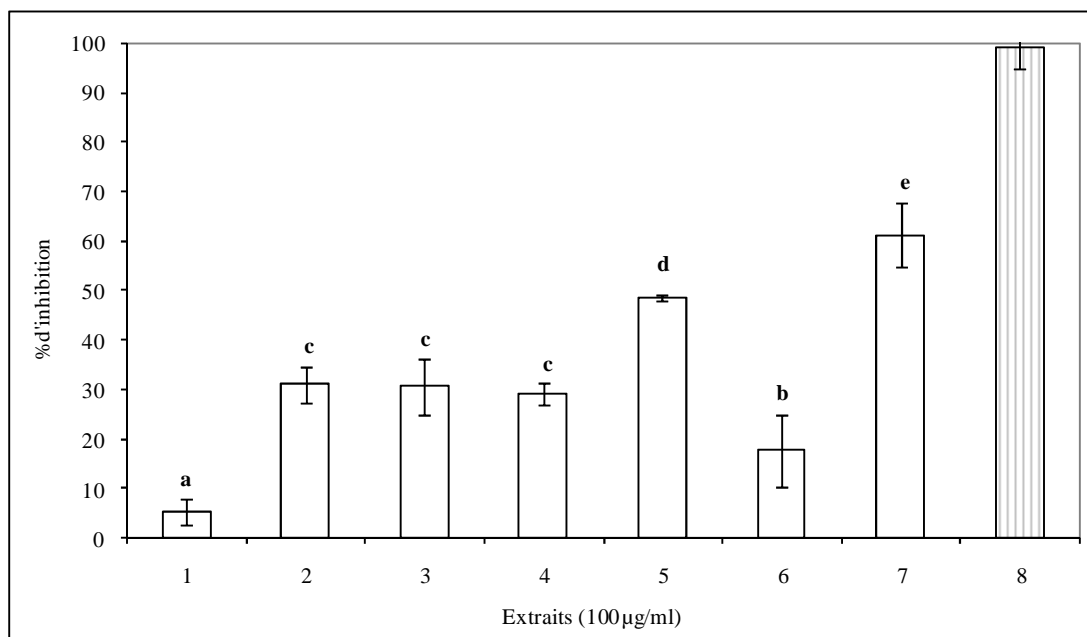


Figure 38 : Pourcentages d'inhibition de l'activité de la XO par les extraits de bourgeons de *Populus nigra*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme et (8) : l'allopurinol.

Il est à noter que le chloroforme et l'hexane sont les solvants les plus apolaires des solvants utilisés dans l'extraction ; ils ont peut être permis la séparation quasi totale des tannins des flavonoides, d'où la très grande inhibition de l'extrait aqueux du chloroforme ($61,16 \pm 6,51\%$ à $100 \mu\text{g/ml}$) et de l'extrait aqueux d'hexane ($48,55 \pm 0,48\%$). Ces taux sont relativement très élevés en les comparant à d'autres plantes. En effet, l'extrait éthanolique de *Phellinus linteus* a montré une $\text{IC}_{50} = 146,80 \mu\text{g/ml}$ (Song et al., 2003). En outre, les noix de cajou ont exhibé une activité inhibitrice de la XO de 37% à $100 \mu\text{g/ml}$ (Trevisan et al., 2006). Cependant, l'inhibition de l'activité de la XO par l'extrait aqueux du chloroforme de *Populus nigra* reste inférieure à celle donné par le standard utilisé, l'allopurinol ($99,42 \pm 4,67\%$ à $100 \mu\text{g/ml}$).

L'extrait aqueux du chloroforme et l'allopurinol inhibent l'enzyme d'une manière dépendante de la concentration avec des IC_{50} de $60,27 \mu\text{g/ml}$ et $1 \mu\text{g/ml}$, respectivement (figures 39, 40). D'après le chercheur Song et ses collaborateurs, (2003), l'allopurinol a montré une $\text{IC}_{50} = 5,15 \mu\text{g/ml}$ qui est légèrement supérieure à celle retrouvée.

Quatre flavonoides : l'ériodictyol, l'aromadendrine, le kaempferol et la néosakuranine ont été isolés à partir de la plante *Populus davidiana*, qui est du même genre que *Populus nigra*. Ces flavonoides ont exhibé une activité inhibitrice de la XO avec les valeurs de l' IC_{50} de : 23,6, 200, 11,6 et de $157,8 \mu\text{M}$, respectivement (Zhang et al., 2006).

L'extrait éthanolique n'est pas très actif sur l'inhibition de l'activité de la XO ($5,23 \pm 2,7\%$); cela est peut être du à la présence de la totalité des composés ce qui a engendré un encombrement stérique au niveau du site actif de l'enzyme.

Le pourcentage très élevé de l'inhibition de l'activité de la XO par l'extrait aqueux du chloroforme pourrait être du à la quercétine révélée par la CCM (figure 34) qui possède les groupements importants pour l'inhibition de la XO: les groupements hydroxyles en 5,7,3',4', la double liaison entre C₂ et C₃ et le groupement céto (Lin et *al.*, 2002).

L'extrait aqueux d'hexane a montré une très forte inhibition de l'activité de la XO peut être du à son contenu en acide caféique et en quercétine qui sont de très forts inhibiteurs de la XO. En outre, Vardar-Ünlü et *al.*, (2008), ont rapporté que les peupliers contiennent de l'acide salicylique qui est un puissant inhibiteur de la XO (Enroth et *al.*, 2000).

Des corrélations positives entre l'activité inhibitrice de la XO et les teneurs en phénols totaux ($R = 0,71$) et en flavonoides ($R = 0,84$) ont été enregistrées. Effectivement, ce sont les extraits aqueux riches en phénols totaux et en flavonoides qui ont exhibé les pourcentages d'inhibition les plus élevés.

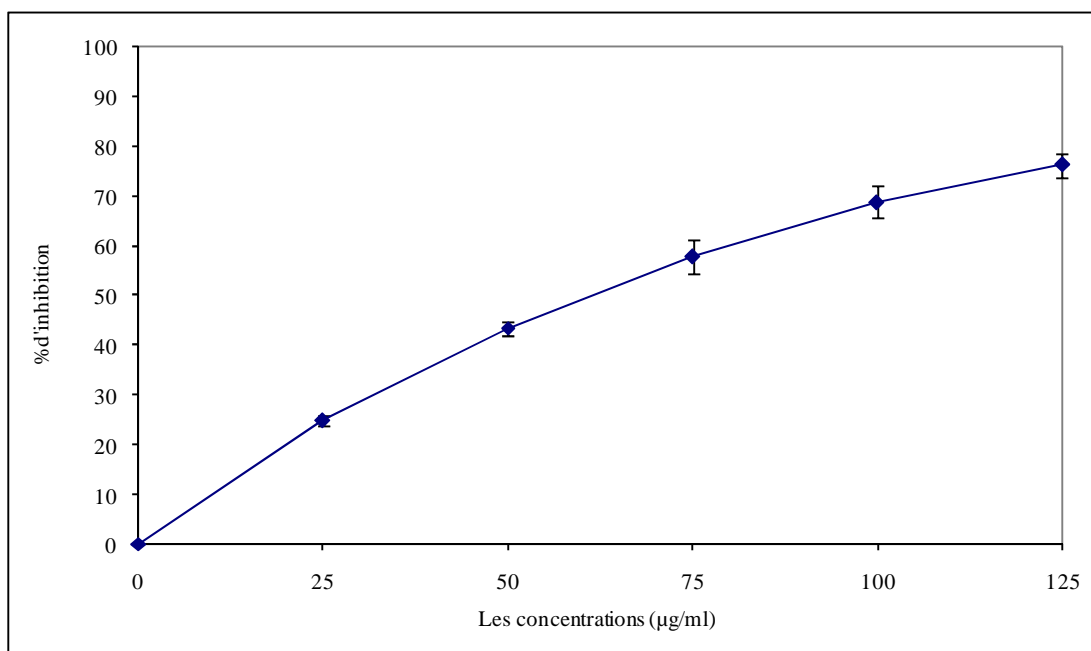


Figure 39 : Inhibition de l'activité de la XO par les différentes concentrations de l'extrait aqueux du chloroforme de *Populus nigra*

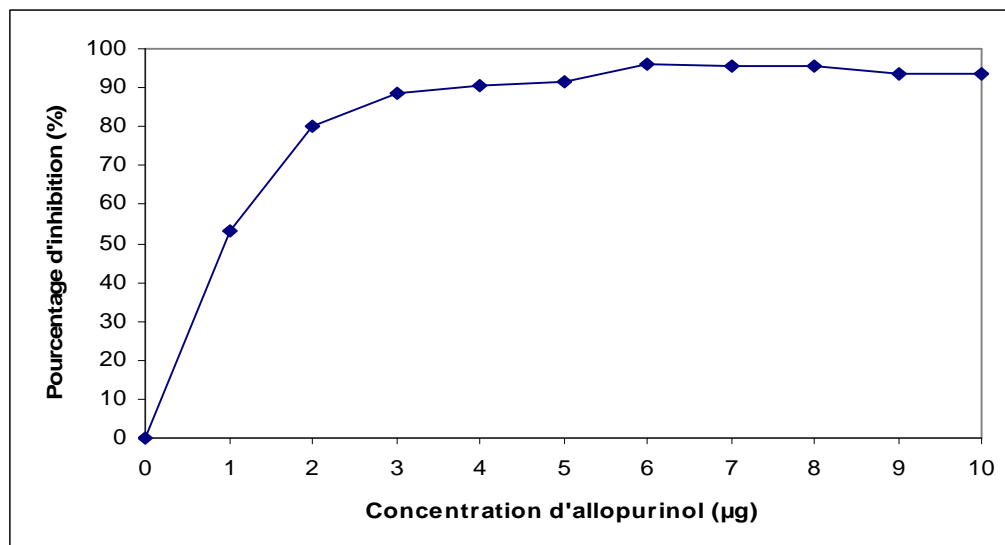


Figure 40 : Inhibition de l'activité de la XO par différentes concentrations en allopurinol.

II-5-Inhibition de la formation du radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est très réactif, capable d'oxyder les molécules biologiques qui seraient à l'origine du stress oxydant (Halliwell et Gutteridge, 1985). Les résultats indiquent que les extraits organiques (figure 41) ont montré les pourcentages d'inhibition les plus élevés de la formation du radical hydroxyle ; cela revient au fait que les extraits organiques sont riches en tannins lesquels contiennent beaucoup de groupements hydroxyles qu'ils soient doués du pouvoir de chélation des métaux ou bien de scavenging du radical hydroxyle. En effet, Gu et ses collaborateurs, ont montré que les extraits riches en tannins de *Diospyros kaki* possèdent une grande activité scavenging du radical hydroxyle (Gu et al., 2008).

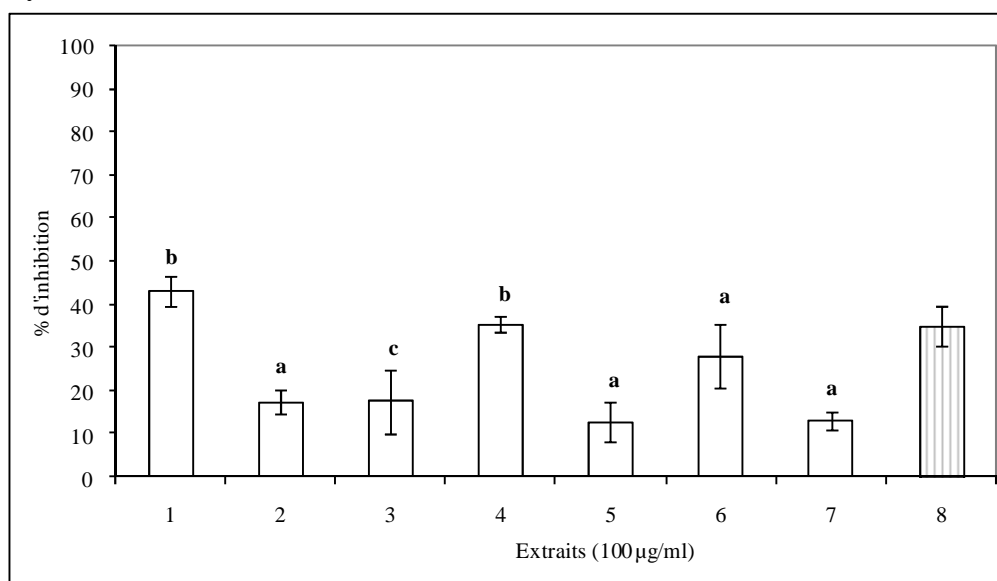


Figure 41 : Inhibition de la formation du radical hydroxyle par les extraits de bourgeons de *Populus nigra*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme et (8) : la catéchine.

Une corrélation positive entre l'activité scavenging du radical hydroxyle et la teneur en tannins des extraits de *Populus nigra* a été trouvée ($R = 0,63$).

L'inhibition du radical hydroxyle par les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia* (figure 42) montre que les extraits aqueux ont exhibé les pourcentages d'inhibition les plus élevés; cela pourrait être du à la nature biochimique des composés phénoliques.

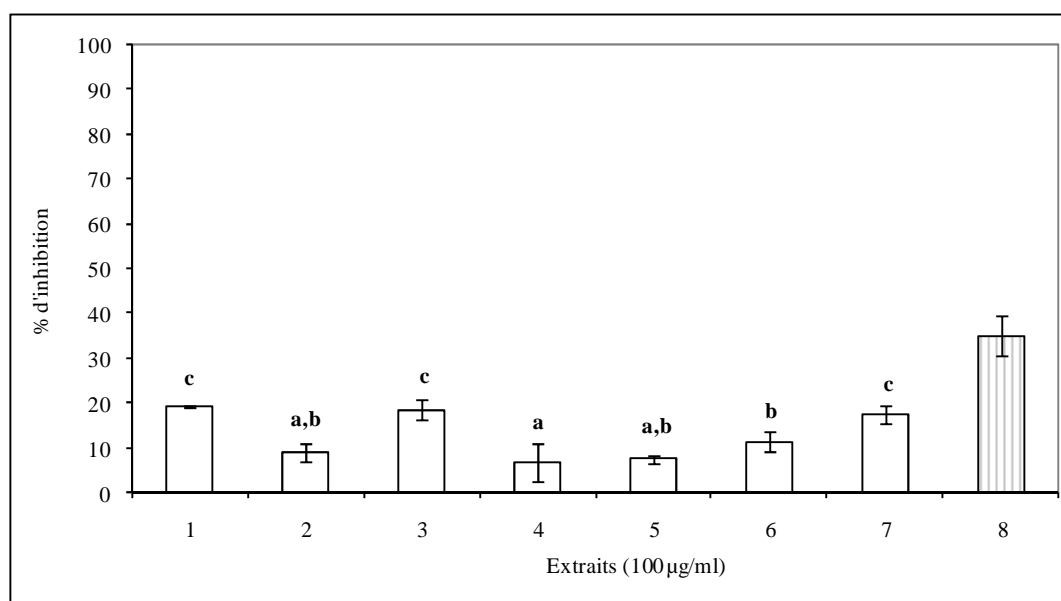


Figure 42: Inhibition de la formation du radical hydroxyle par les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme et (8) : la catéchine.

L'extrait méthanolique de *Fraxinus floribunda* a exhibé une activité scavenging du radical hydroxyle avec une IC_{50} de $166,63 \mu\text{g/ml}$ (Lingadurai et al., 2009) ; cela implique que les feuilles de *Fraxinus angustifolia* sont de faibles piègeurs du radical hydroxyle.

Aucune corrélation n'a été trouvée entre l'activité scavenging du radical hydroxyle et les teneurs en composés phénoliques.

Nous constatons que les extraits de bourgeons de *Populus nigra* ont montré les activités d'inhibition de la formation du radical hydroxyle les plus importantes vu leur plus grande richesse en tannins.

L'activité d'inhibition de la formation du radical hydroxyle est proportionnelle à la concentration en catéchine ($IC_{50} = 128,49 \mu\text{g/ml}$) (figure 43) qui est supérieure à celle retrouvée par Sharma et ses collaborateurs, (2007) ($IC_{50} = 78 \mu\text{g/ml}$), mais légèrement inférieure à celle de l' α tocophérol ($IC_{50} = 154,04 \mu\text{g/ml}$) rapporté par Lingadurai et ses collaborateurs en (2009).

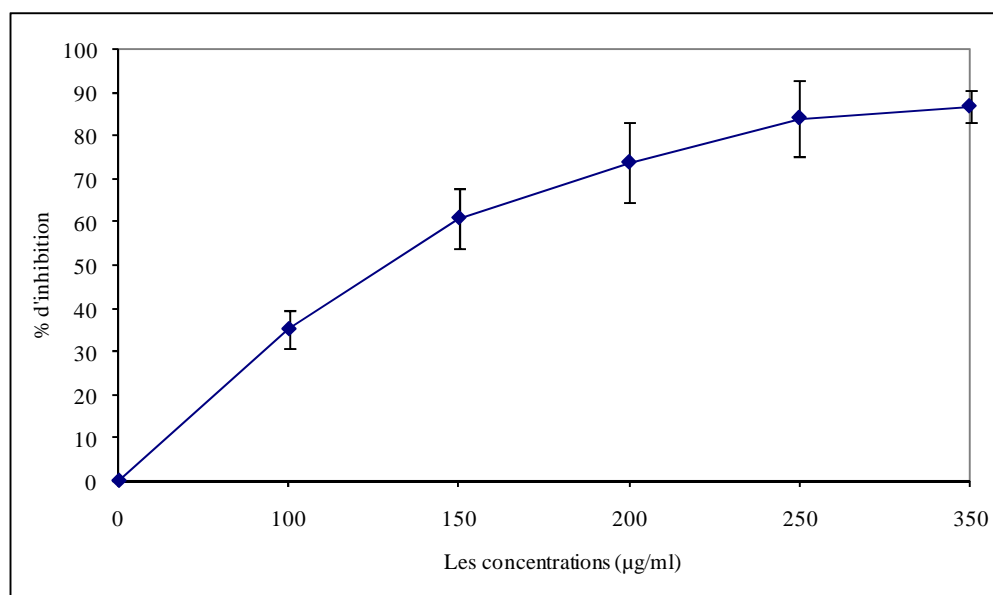


Figure 43 : Inhibition de la formation du radical hydroxyle par les différentes concentrations de catéchine.

Il est à noter que les extraits ont été dissous dans de l'eau distillée additionnée de Tween 80 (0,1%) à cause de la très grande réactivité du radical hydroxyle vis-à-vis de la majorité des solvants. En effet, ces derniers inhibent fortement la formation du radical hydroxyle. Ainsi, nous n'avons pas pu déterminer les IC_{50} des extraits de *Populus nigra* et de *Fraxinus angustifolia* car la solution de Tween 80 ne permet pas la préparation de grandes concentrations d'extraits.

II-6-Inhibition de la peroxydation lipidique

L'initiation de la peroxydation lipidique peut être induite par deux mécanismes dépendants du fer. Le mécanisme radical hydroxyle-dépendant a été adopté par la plupart des chercheurs (Gutteridge, 1984 ; Tang et *al.*, 2000; Yoshihito et *al.*, 2002). Dans ce cas le fer sert de catalyseur pour la réaction de Fenton, formant le radical hydroxyle OH^{\cdot} qui initie la peroxydation lipidique. Un mécanisme alternatif, radical hydroxyle-indépendant, propose que les complexes fer-oxygène, tels que l'ion perferryl ou l'ion ferryl, plutôt que le OH^{\cdot} , initie la peroxydation lipidique (Schafer et *al.*, 2000). C'est ce second mécanisme que nous avons choisi pour initier la peroxydation lipidique.

Les résultats de l'activité inhibitrice de la lipoperoxydation par les extraits de *Populus nigra* (figure 44) montrent que les activités les plus élevées ont été obtenues avec les extraits aqueux à 100 µg/ml, les résultats des dosages ont montré la richesse de ces extraits en flavonoïdes (figure 30) qui sont de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique (Ratty et Das, 1988; Frémont et *al.*, 1998)

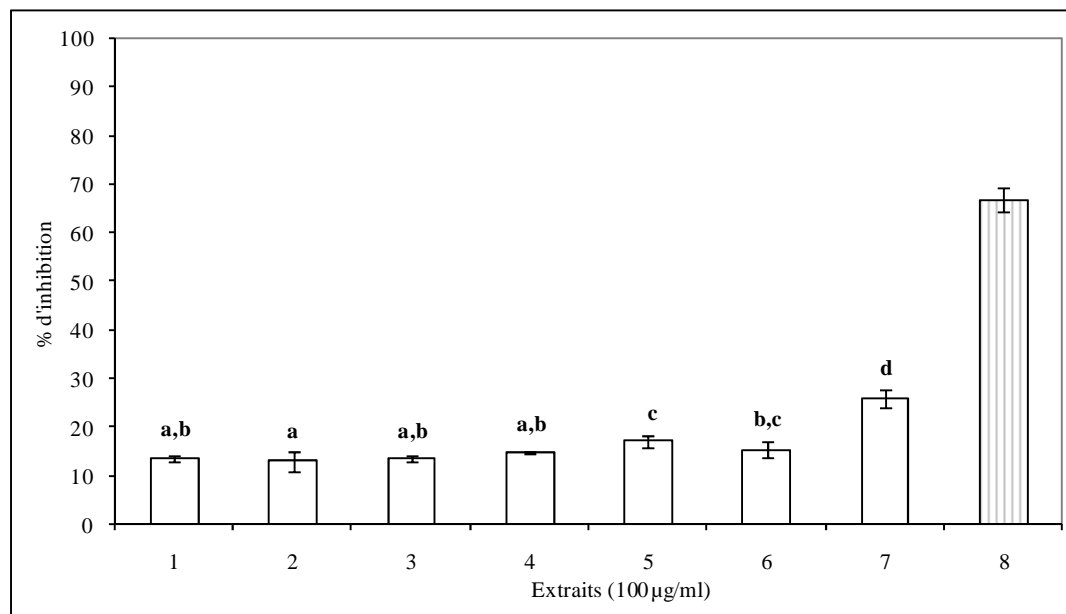


Figure 44 : Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de *Populus nigra*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme et (8) : la BHA.

L'extrait aqueux du chloroforme a été le plus actif ($25,82 \pm 1,69\%$) ; cela revient à la nature biochimique des flavonoïdes contenus dans cet extrait. Les résultats de la CCM réalisée pour les extraits de *Populus nigra*, révèlent que l'extrait aqueux du chloroforme contiendrait peut être de la quercétine qui est un piègeur des radicaux libres (McNiven et Richardson, 2006 ; Nakagawa et al., 2000), d'où le plus grand pourcentage d'inhibition de la formation du MDA par l'extrait aqueux du chloroforme.

Une plante du même genre que *Populus nigra*, *Populus tremula*, a montré une forte activité inhibitrice de la peroxydation lipidique ($IC_{50} = 12,3 \text{ nM}$) (Neacsu et al., 2007).

Une corrélation positive entre l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et les teneurs en phénols totaux ($R = 0,71$) et en flavonoïdes ($R = 0,89$) a été trouvée alors qu'une corrélation négative a été enregistrée dans le cas des tannins ($R = -0,44$).

L'extrait aqueux du chloroforme montre un effet inhibiteur de la peroxydation lipidique dépendant de la concentration ($IC_{50} = 3,91 \text{ mg/ml}$) (figure 45), qui est faible comparé à celui enregistré par la BHA ($IC_{50} = 41,72 \text{ µg/ml}$) (figure 46); Sharma et ses collaborateurs, (2007), ont montré que la BHA est un très fort inhibiteur de la peroxydation lipidique ($IC_{50} = 124 \text{ µg/ml}$) en mesurant les teneurs en MDA.

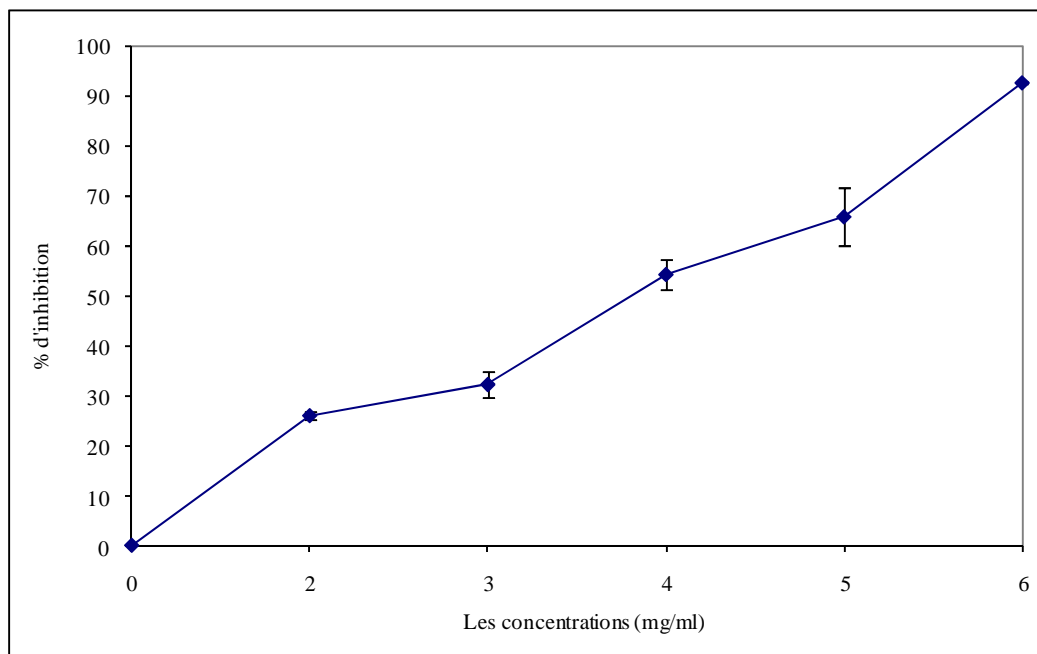


Figure 45 : Inhibition de la peroxydation lipidique par les différentes concentrations de l'extrait aqueux du chloroforme de *Populus nigra*.

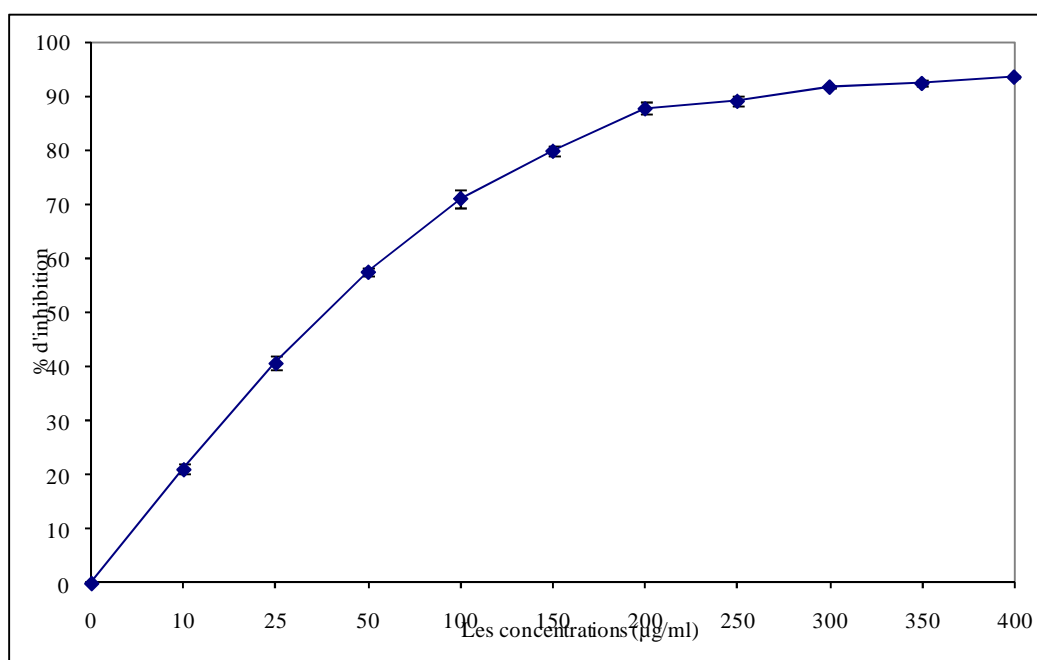


Figure 46 : Inhibition de la peroxydation lipidique par les différentes concentrations de BHA.

La figure suivante montre l'inhibition de la peroxydation lipidique par tous les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

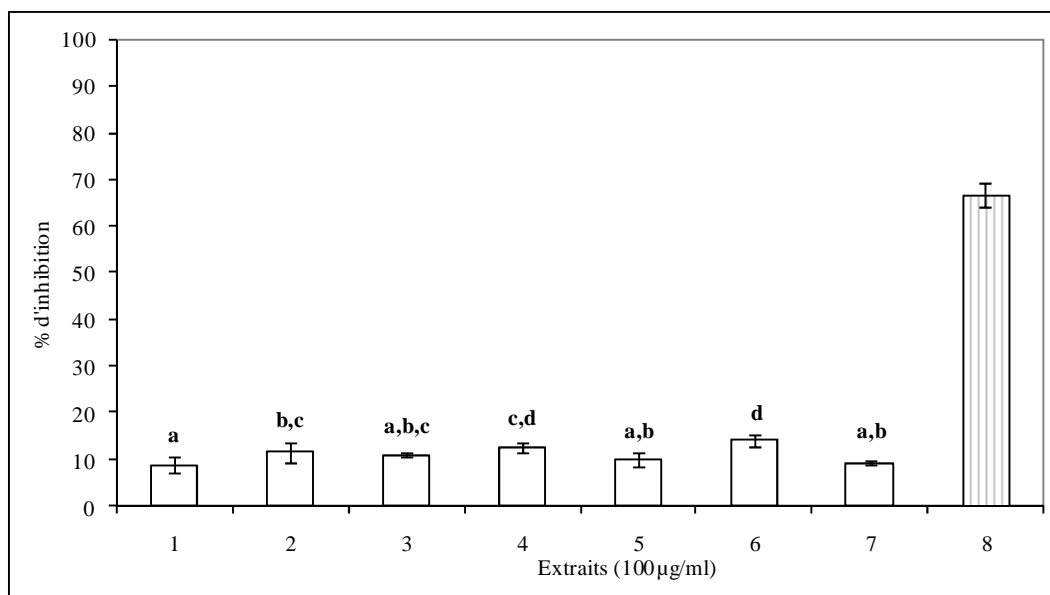


Figure 47 : Inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*. (1) : extrait éthanolique, (2) : extrait d'acétate d'éthyle, (3) : extrait aqueux d'acétate d'éthyle, (4) : extrait d'hexane, (5) : extrait aqueux d'hexane, (6) : extrait du chloroforme, (7) : extrait aqueux du chloroforme et (8) : la BHA.

Nous remarquons que les extraits organiques ont montré les plus grands pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique, les résultats précédents montrent que ces extraits contiendraient de grandes quantités de tannins et de flavonoides, d'où leur richesse en groupements hydroxyles donneurs d'hydrogènes ou d'électrons ou chélateurs de métaux.

En outre, les extraits aqueux ont donné des valeurs d'inhibition inférieures à celles des extraits de *Populus nigra* ; la CCM a révélé que les extraits aqueux des feuilles de *Fraxinus angustifolia*, contiendraient de la rutine qui est une quercétine glycosylée, et donc elle possède une moindre activité (Simic et al., 2007).

Aussi, nous faisons remarquer que c'est l'extrait du chloroforme qui a donné le plus grand pourcentage d'inhibition. Cela est en accord avec les résultats d'une étude réalisée par Wu et ses collaborateurs, (2007), qui ont trouvé que l'extrait du chloroforme du cortex de *Fraxinus chinensis* avait montré la meilleure activité inhibitrice de la peroxydation lipidique induite par le Fe^{2+} et l'ascorbate (Wu et al., 2007).

L'étude des corrélations de l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique a montré une corrélation positive avec les teneurs en phénols totaux ($R = 0,57$) et en tannins ($R = 0,68$), en revanche, une corrélation négative a été enregistrée avec les taux en flavonoides ($R = -0,63$).

La comparaison des résultats des deux plantes montre que les activités les plus élevées sont celles données par les extraits de *Populus nigra*; cela reviendrait à la richesse des bourgeons de *Populus nigra* en tannins et donc en groupements hydroxyles, et également à leur contenance en quercétine et en acide caféique, de très bons antioxydants (Lin et *al.*, 2002 ; Chang et *al.*, 2007).

II-7-Caractérisation des fractions

La chromatographie sur colonne de gel de silice nous a permis de récolter quatre fractions, f_1 , f_2 , f_3 et f_4 , éluées par les systèmes de solvants, le chloroforme, le chloroforme/acétate d'éthyle, l'eau distillée et l'eau/acide formique, respectivement. Ces fractions ont été testées pour leur activité inhibitrice de la XO et les pourcentages d'inhibition (figure 48) montrent que les fractions organiques ont donné les activités les plus élevées comparées à celles données par les fractions aqueuses. Cela pourrait être expliqué par le fait que le site actif de la XO possède une région hydrophobe qui permettrait de mieux fixer les composés phénoliques ayant cette propriété hydrophobe (Lin et *al.*, 2002).

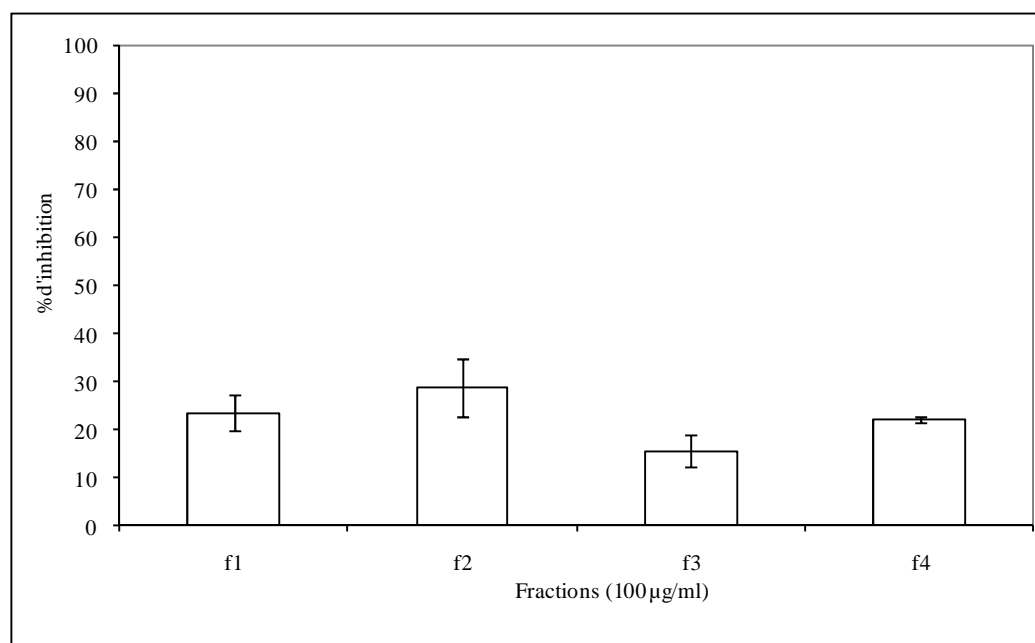


Figure 48 : Inhibition de l'activité de la XO par les fractions éthanoliques des bourgeons de *Populus nigra*.

Nous remarquons que le fractionnement de l'extrait éthanolique, ayant donné un pourcentage d'inhibition de $5,23 \pm 2,7\%$, en quatre fractions a augmenté l'inhibition de la XO de trois et quatre fois pour les fractions aqueuses, f_3 et f_4 , et de 4 et 5 fois pour les fractions organiques, f_1 et f_2 , respectivement. Le fractionnement a permis l'élimination ou bien la diminution de l'encombrement stérique du au nombre élevé de composés biochimiques ou bien à l'interaction des molécules entre elles (Adebo et *al.*, 2006).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les deux plantes, *Populus nigra* et *Fraxinus angustifolia*, sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter un certain nombre de pathologies, dont les maladies inflammatoires et les rhumatismes. Notre étude réalisée sur les bourgeons de *Populus nigra* et les feuilles de *Fraxinus angustifolia* nous a permis d'aboutir aux résultats suivants :

- Les CCM ont révélé que les bourgeons de *Populus nigra* contiendraient de la quercétine ; par contre, les feuilles de *Fraxinus angustifolia* seraient riches en rutine.
- Concernant l'inhibition de la formation du radical hydroxyle, que ce soit par les extraits de bourgeons de *Populus nigra* ou ceux des feuilles de *Fraxinus angustifolia*, c'est l'extrait natif (éthanolique) qui a montré le plus grand pourcentage d'inhibition. En outre, ce sont les extraits organiques de *Populus nigra* qui ont inhibé fortement la formation du radical hydroxyle ; cela est dû à leur abondance en tannins qui sont riches en groupements hydroxyles donateurs d'électrons ou d'hydrogènes ou chélateurs de métaux. Ce qui n'a pas été le cas pour les extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*, où les extraits aqueux ont été relativement les plus forts.
- Quant à l'inhibition de la peroxydation lipidique, ce sont les extraits aqueux de bourgeons de *Populus nigra* qui ont donné les pourcentages les plus élevés contrairement aux extraits des feuilles de *Fraxinus angustifolia*; cela reviendrait à leur teneur en quercétine qui est un très bon scavenger des radicaux libres.
- L'inhibition de la XO par les extraits de bourgeons de *Populus nigra* a révélé que ce sont les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane qui étaient les plus forts grâce, principalement, à la quercétine contenue dans l'extrait aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme et à l'acide caféique que possède l'extrait aqueux d'hexane.
- L'inhibition de la XO par les fractions éthanoliques des bourgeons de *Populus nigra*, nous a permis de conclure que les fractions organiques ont donné de plus grands pourcentages comparées aux fractions aqueuses et que les fractions étaient plus fortes que l'extrait éthanolique brut.

- En fin, l'activité antioxydant peut être attribuée à la présence des polyphénols dans les extraits, les résultats indiquent une forte corrélation entre les activités antioxydants testées et les composés phénoliques suggérant que les composés phénoliques sont probablement responsables de cette activité.

Ce travail nous a permis d'avoir un aperçu général sur les activités anti-xanthine oxydase et anti-radicalaire des extraits de bourgeons de *Populus nigra* et des feuilles de *Fraxinus angustifolia*. Ainsi, nous souhaitons aller au-delà des tests des extraits bruts, et de tenter d'isoler, de purifier et d'identifier les constituants biochimiques responsables de ces différentes activités.

En outre, les tests antioxydants réalisés : le dosage du malondialdéhyde, qui représente un très bon marqueur de la peroxydation lipidique, la mesure de l'inhibition du radical hydroxyle qui est le radical libre le plus réactif et l'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase sont très importants pour la santé humaine, il serait très intéressant d'aller plus loin en essayant de réaliser ces tests *in vivo* afin de s'assurer de l'efficacité et de la non toxicité des extraits ou des constituants biochimiques isolés.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aberoumand, A. and Deokule, S. S. (2008). Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*, **7** (4): 582-585.
- Adebo, I. B.; Doumbia, I.; Aka, N.; Dosso, M. and Guede Guina, F. (2006). Amélioration de l'activité antibactérienne de *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae) contre *Mycobacterium tuberculosis*. *Annales des sciences Agronomiques du Bénin*, **8** (1): 1-5.
- Afonso, V.; Champy, R.; Mitrovic, D.; Collin, P. and Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, **74** : 636-643.
- Ames, B. N.; Cathcart, R.; Schewier, E. and Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defence in humans against oxidant and radical caused aging and cancer. A Hypothesis. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **78**: 6858-6862.
- Amić, D. ; Davidović-Amić, D. ; Bešlo, D. and Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, **76** (1): 55-61.
- Aruoma, O. I.; Bahorun, T. and Jen, L.-S. (2003). Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research*, **544**: 203-215.
- Aurousseau, B. (2002). Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Productions Animales*, **15** (1) : 67-82.
- Ayaz, F. A. ; Hayirlioglu-Ayaz, S. ; Hipay-Karaoglu, S. ; Gruz, J. ; Valentová, K. ; Ulrichová, J. and Strnad, M. (2008). Phenolic acid contents of Kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, **107**: 19-25.
- Baba Aïssa, F. (1991). Les plantes médicinales en Algérie. *Coédition Bouchène et Ad. Diwan, Alger* : 75.
- Balasundram, N.; Sundram, K. and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products : antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**: 191-203.
- Ballinger, S. W. (2005). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine*, **38**: 1278-1295.
- Banerjee, A.; Dsgupta, N. and De, B. (2005). In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, **90** : 727-733.

- Barreira, J. C. M.; Ferreira, I. C. F. R.; Oliveira, M. B. P. P. and Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, **107**: 1106-1113.
- Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*, **2** (1) : 43-52.
- Beaudeau, J-L. ; Delattre, J. ; Therond, P. ; Bonnefont-Rousselot, D. ; Legrand, A. and Peynet, J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **21** : 144-150.
- Becker, M. A.; Schumacher, H. R.; Wortmann, R. L.; Mac Donald, P. A.; Eustace, D.; Palo, W. A.; Streit, J. and Joseph-Ridge, N. (2005). Febuxostat compared with allopurinol in patients with hyperuricemia and gout. *New England Journal of Medicine*, **353** (23): 2450-2461.
- Beloued, A. (1998). Plantes médicinales d'Algérie. Edition Office des Publications Universitaires. Alger: 277.
- Berger, M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20** : 48-53.
- Berry, C. E. and Hare, J. M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease : molecular mechanisms and pathophysiological implications. *Journal of Physiology*, **555** (3): 589-606.
- Borges, F.; Fernandes, E. and Roleira, F. (2002). Progress to wards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, **2**: 195-217.
- Borochoy-Neori, H.; Judeinstein, S.; Greenburg, A.; Fuhrman, B.; Attias, J.; Volkova, N.; Hayek, T. and Aviram, M. (2008). Phenolic antioxidants and antiatherogenic effects of Marula (*Sclerocarrya birrea subsp. Caffra*) fruit juice in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56** (21): 9884-9891.
- Bossu, C. M. ; Ferreira, E. C. ; Chaves, F. S. ; Menezes, E. A. and Nogueira, A. R. A. (2006). Flow injection system for hydrolysable tannin determination. *Microchemical Journal*, **84**: 88-92.
- Boudaoud H. (2003). Etude de l'activité inhibitrice des extraits de plantes médicinales sur la xanthine oxydoréductase. *Mémoire de Magister*.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56** (11): 317-330.

- Briley, M. S. and Eisenthal, R. (1974). Association of xanthine oxidase with the bovine milk-fat-globule membrane. Catalytic properties of the free and membrane-bound enzyme. *Biochemical Journal*, **143**: 149-157.
- Cai, Y.-Z.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q. and Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, **78**: 2872-2888.
- Céspedes, C. L.; El-Hafidi, M.; Pavon, N. and Alarcon, J. (2008). Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elacocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry*, **107**: 820-829.
- Chang, Y. C.; Lee, F.-W.; Chen, C.-S.; Huang, S.-T.; Tsai, S.-H.; Huang, S.-H. and Lin, C.-M. (2007). Structure-activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Free Radical Biology & Medicine*, **43**: 1541-1551.
- Charriere-Ladreix, Y. (1976). Répartition intracellulaire du secrétât flavonique de *Populus nigra* L. *Planta (Berl)*, **129** : 167-174.
- Chavan, U. D.; Shahidi, F. and Naczki, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, **75**: 509-512.
- Chen, C.-W. and Ho, C.-T. (2007). Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of Food Lipids*, **2** (1): 35-46.
- Chiang, H.-C.; Lo, Y.-J and Lu, F.-J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. *Enzyme Inhibition*, **8** (1): 61-71.
- Chunlong, C.; Song, L.; Rongsu, L.; Fengping, W. and Junqing, L. (2008). Concentration of phenolic compounds of *Populus euphratica* and soil water contents in Ejina oasis, Inner Mongolia, china. *Acta Ecologica Sinica*, **28** (1) : 69-75.
- Cicco, N. T.; Lanorte, M.; Paraggio, M.; Viggiano, M. and Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, **91** (1): 107-110.
- Cillard, J. and Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **13** (1) : 24-29.

- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Poel, B. V.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J. and Berghe, D. V. (1998). Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, **61** (1): 71-76.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* : 564-582.
- da Silva, S. L. ; da Silva, A. ; Honório, K. M. ; Marangoni, S. ; Toyama, M. H. and da Silva, A. B. F. (2004). The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure*, **684**: 1-7.
- Dastmalchi, K.; Dorman, H. J. D.; Oinonen, P. P.; Darwis, Y.; Laakso, I. and Hiltunen, R. (2007). Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *Food Science and Technology*, **41**: 391-400.
- De Goursac, C. (2006). Facteurs contribuant à augmenter le stress oxydant. *Actualités Immagé. Anti-age* : 1-2.
- Dykes, L. and Rooney, L. W. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World*, **52** (3): 105-111.
- Edeas, M. (2005). Les antioxydants dans la tourmente. *Phytothérapie*, **6**: 271-273.
- Enroth, C.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Nishino, T. and Pai, E. F. (2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase : Structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **97** (20): 10723-10728.
- Eschwège, P. (2005). Quelles sont les informations fournies par la transplantation rénale sur la protection rénale? *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, **24** : 182-193.
- Falleh, H.; Ksouri, R.; Chaieb, K.; Karray-Bouraoui, N.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M. and Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331** (5): 372-379.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*: 108-115.
- Ferrari, A. M.; Sgobba, M.; Gamberini, M. C. and Rastelli, G. (2007). Relationship between quantum-chemical descriptors of proton dissociation and experimental acidity constants of various hydroxylated coumarins. Identification of the biologically active species for xanthine oxidase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **42**: 1028-1031.

- Fogliani, B.; Raharivelomanana, P.; Bianchini, J.-P.; Bouraïma-Madjébi, S. and Hnawia, E. (2005). Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic cunoniaceae from New Caledonia. *Phytochemistry*, **66**: 241-247.
- Frederiks, W. M. and Vreeling-Sindelárova, H. (2002). Ultrastructural localization of xanthine oxidoreductase activity in isolated rat liver cells. *Acta Histochemica*, **104**(1): 29-37.
- Frémont, L.; Gozzélino, M. T.; Franchi, M. P. and Linard, A. (1998). Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. *Journal of Nutrition*, **128** (9): 1495-1502.
- Gardès-Albert, M. ; Bonnefont-Rousselot, D. ; Abedinzadeh, Z. and Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité chimique*: 91-96.
- Godber, b. L. J.; Doel, J. J.; Sapkota, G. P.; Blake, D. R.; Stevens, C. R.; Eisenthal, R. and Harrison, R. (2000). Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, **275** (11): 7757-7763.
- Goli, A. H.; Barzegar, M and Sahari, M. A. (2004). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, **92**: 521-525.
- Granger, D. N.; Mc Cord, J. M.; Parks, D. A. and Hollwarth, M. E. (1986). Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology*, **90** (1): 80-84.
- Groussard, C. (2006). Stress oxydatif et exercice anaérobie. *Science & Sport*, **21** : 62-67.
- Gu, H.-F.; Li, C.-M.; Xu, Y.-J.; Hu, W.-f.; Chen, M.-h. and Wan, Q.-h. (2008). Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International*, **41**: 208-217.
- Guichardant, M. ; Bacot, S. ; Molière, P. and Lagarde, M. (2006). Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **13** (1) : 31-34.
- Gutteridge, J. M. C. (1984). Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS*, **172** (2): 245-249.
- Haenen, G. R. M. M.; Arts, M. J. T. J.; Bast, A. and Coleman, M. D. (2006). Structure and activity in assessing antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*. A critical appraisal illustrated with the flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **21**: 191-198.
- Hagerman, A. E. and Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **26**: 809-812.

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, **8** (2): 89-193.
- Hancock, J. T.; Salisbury, V.; Ovejero-Boglione, M. C.; Cherry, R.; Hoare, C.; Eisenthal, R. and Harrison, R. (2002). Antimicrobial properties of milk : Dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46** (10) :3308-3310.
- Häne, K. and Dobbertin, M. K. (2006). Les arbres en question. Le peuplier noir. Un géant aux pieds d'argile. *Echos de la recherche* : 28-29.
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase : Where are we now ? *Free Radical Biology & Medicine*, **33** (6): 774-797.
- Harrison, R. (2006). Milk xanthine oxidase : properties and physiological roles. *International Dairy Journal*, **16** : 546-554.
- Hatano, T.; Yasuhara, T.; Yoshihara, R.; Agata, I.; Noro, T. and Okuda, T. (1990). Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **38** (5): 1224-1229.
- Hayder, N.; Bouhlel, I.; Skandrani, I.; Kadri, M.; Steiman, R.; Guiraud, P.; Mariotte, A.-M.; Ghedira, K.; Dijoux-Franca, M.-G. and Chekir-Ghedira, L. (2008). In vitro antioxidant and antigenotoxic potentiels of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis* : Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology in vitro*, **22**: 567-581.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoids antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572-584.
- Hellsten, Y. (2000). The role of xanthine oxidase in exercise. Handbook of oxidants and antioxidants in exercise. Part III. Chapter 7: 153-176.
- Hille, R. (2002). Molybdenum and tungsten in biology. *Trends in Biochemical Sciences*, **27** (7): 360-367.
- Hille, R. and Stewart, R. C. (1984). The inhibition of xanthine oxidase by 8-Bromoxanthine. *Journal of Biological Chemistry*, **259** (3): 1570-1576.
- Hoorn, D. E. C. V.; Nijveldt, R. J.; Leeuwen, P. A. M. V.; Hofman, Z.; M'Rabet, L.; De Bont, D. B. A. and Norren, K. V. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*, **451**: 111-118.

- Hsieh, J.-F.; Wu, S.-H.; Yang, Y.-L.; Choong, K.-F. and Chen, S.-T. (2007). The screening and characterization of 6-aminopurine-based xanthine oxidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**: 3450-3456.
- Iio, M.; Morigama, A.; Matsumoto, Y.; Takaki, N. and Fukumoto, M. (1985). Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agricultural Biology and Chemistry*, **49** (7): 2173-2176.
- Jercović, I. and Mastelić, J. (2003). Volatile compounds from leaf-buds of *Populus nigra* L. (salicaceae). *Phytochemistry*, **63** : 109-113.
- Jork, H.; Funk, W.; Fischer, W. and Wimmer, H. (1994). Thin-Layer Chromatography: reagents and detection methods. Volume 1b: 448.
- Judde, A. (2004). Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanisme, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications? *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **11** (6) : 414-418.
- Kähkönen, M. P.; Hopta, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J.-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S. and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47** (10): 3954-3962.
- Kahl, R. and Kappus, H. (1993). Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z Lebensm Unters Forsch*, **196** (4): 329-338.
- Kalra, S.; Jena, G.; Tikoo, K. and Mukhopadhyay, A. K. (2007). Preferential inhibition of xanthine oxidase by 2-amino-6-hydroxy-8-mercaptapurine and 2-amino-6-purine thiol. *BMC Biochemistry*, **8** (8): 1-11.
- Khallouki, F.; Haubner, R.; Hull, W. E.; Erben, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. and Owen, R. W. (2007). Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of *Anisophyllea dichostyla* R. Br. *Food and Chemical Toxicology*, **45**: 472-485.
- Khlebnikov, A. I.; Schepetkin, I. A.; Domina, N. G.; Kirpotina, L.N. and Quinn, M. T. (2007). Improved quantitative structure activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**: 1749-1770.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20** : 165-177.

- Kong, L. D.; Zhang, Y.; Pan, X.; Tan, R. X. and Cheng, C. H. K. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **57**: 500-505.
- Kostova, I. and Lossifova, T. (2007). Chemical components of Fraxinus species. *Fitoterapia*, **78** : 85-106.
- Kuwabara, Y.; Nishino, T.; Okamoto, K.; Matsumura, T.; Eger, B. T.; Pai, E. F. and Nishino, T. (2003). Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **100** (14): 8170-8175.
- Laguerre, M. ; López-Giraldo, L. J. ; Lecomte, J. ; Pina, M. and Villeneuve, P. (2007). Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **14** (5) : 278-292.
- Le, K.; Chiu, F. and Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, **105**: 353-363.
- Levasseur-Acker, G.; Zalma, R.; Copin, E.; Fournier, I.; Pezerat, H. and Jankowski, R. (1995). Peroxydation de l'acide linoléique en présence des fibres d'amiante ou de némalite. Résultats préliminaires avec des cellules épithéliales. *Canadian Journal of Chemistry*, **73**: 453-459.
- Lewis, A. S.; Murphy, L.; Mc Calla, C.; Fleary, M. and Purcell, S. (1984). Inhibition of mammalian xanthine oxidase by folate compounds and amethopterin. *Journal of Biological Chemistry*, **259** (1): 12-15.
- Li, H.; Samouilov, A.; Liu, X. and Zweier, J. L. (2001). Characterisation of the magnetude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed Nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **276** (27): 24482-24489.
- 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.
- Lin, H.-C.; Tsai, S.-H.; Chen, C.-S.; Chang, Y.-C.; Lee, C.-M.; Lai, Z.-Y. and Lin, C.-M. (2008). Structure activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical Pharmacology*, **75**: 1416-1425.

- Linder, N.; Lundin, J.; Isola, J.; Lundin, M.; Raivio, K. O. and Joensuu, H. (2005). Down-Regulated xanthine oxidoreductase is a feature of aggressive breast cancer. *Clinical Cancer Research*, **11** (12): 4372-4381.
- Lingadurai, S.; Kar, P. K.; Nath, L. K.; Besra, S. E. and Joseph, R. V. S. (2009). Free radical scavenging activity of leaves of *Bischofia Javanica* Blume and *Fraxinus floribunda* Wallich. *Pharmacologyonline*, **1**: 1324-1332.
- Liu, R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, **46**: 207-219.
- Maciejewicz, W.; Daniewski, M.; Bal, K. and Markowski, W. (2001). GC-MS Identification of the flavonoid aglycones Isolated from Propolis. *Chromatographia*, **53** (5/6) : 343-346.
- Maksimović, Z.; Malenčić, D. and Kovačević, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technology*, **96**: 873-877.
- Martin, H. M.; Hancock, J. T.; Salisbury, V. and Harrison, R. (2004) (b). Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infection and Immunity*, **72** (9): 4933-4939.
- Martin, H. M.; Moore, K. P.; Bosmans, E.; Davies, S.; Burroughs, A. K.; Dhillon, A. P.; Tosh, D. and Harrison, R. (2004) (a). Xanthine oxidoreductase is present in bile ducts of normal and cirrhotic liver. *Free Radical Biology & Medicine*, **37** (8): 1214-1223.
- Martin, S. and Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, **51** : 304-315.
- Martinez-Cayueta, M. (1995). Oxygen free radical and human disease. *Biochimie*, **77**: 147-161.
- Mc Cord, J. M. (1985). Oxygen-derived free radicals in post ischemic tissues injury. *New England Journal of Medicine*, **318**: 159-163.
- McManaman, J. L. and Bain, D. L. (2002). Structural and conformational analysis of the oxidase to dehydrogenase conversion of xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, **277** (24): 21261-21268.
- McNiven, M. A. and Richardson, G. F. (2006). Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preservation Technology*, **4** (3): 169-177.
- Mello, L. D. and Kubota, L. T. (2007). Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. *Talanta*, **72**: 335-348.
- Messaoudi, S. (2005). Les plantes médicinales. *Dar El fiker, Tunis*: 80.

- Mishra, B.; Pryadarsini, K. I.; Kumar, M. S.; Unnikrishnan, M. K. and Mohan, H. (2003). Effect of O-Glycosylation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, Chrysoeriol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **11**: 2677-2685.
- Mohazzab, K. M.; Kaminski, P. M. and Wolin, M. S. (1994). NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *American Physiological AJP-Heart and Circulatory Physiology*, **266**: 2568-2572.
- Montoro, P.; Braca, A.; Pizza, C. and De Tommasi, N. (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*, **92**: 349-355.
- Moreland, L. W. (2005). Febuxostat-treatment for hyperuricemia and gout? *New England Journal of Medicine*, **353** (23): 2505-2507.
- Mukhopadhyay, S.; Luthria, D. L. and Robbins, R. (2005). Optimisation of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86** (1): 156-162.
- Naczki, M. and Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**: 95-111.
- Naik, G. H.; Priyadarsini, K. I. and Mohan, H. (2006). Free radical scavenging reactions and phytochemical analysis of triphala, an ayurvedic formulation. *Current Science*, **90** (8): 1100-1105.
- Nakagawa, K.; Kawagoe, M.; Yoshimura, M.; Arata, H.; Minamikawa, T.; Nakamura, M. and Matsumoto, A. (2000). Differential effects of flavonoid quercetin on oxidative damages induced by hydrophilic and lipophilic radical generators in hepatic lysosomal fractions of mice. *Journal of Health Science*, **46** (6): 509-512.
- Nakagawa, T. and Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*, **40** : 1745-1750.
- Neacsu, M.; Micol, V.; Pérez-Fons, L.; Willför, S.; Holmbom, B. and Mallavia, R. (2007). A novel antioxidant phenyl disaccharide from *Populus tremula* Knotwood. *Molecules*, **12**: 205-217.
- Nishino, T.; Okamoto, K.; Kawagushi, Y.; Hori, H.; Matsumura, T.; Eger, B. T.; Pai, E. F. and Nishino, T. (2005). Mechanism of the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. Identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogenase mutant. *Journal of Biological Chemistry*, **280** (26) : 24888-24894.

- Nunoshiba, T.; Obata, F.; Boss, A. C.; Oikawa, S.; Mori, T.; Kawanishi, S. and Yamamoto, K. (1999). Role of Iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **274** (49): 34832-34837.
- O'Byrne, S.; Shirodaria, C.; Millar, T.; Stevens, C.; Blake, D. and Benjamin, N. (2000). Inhibition of platelet Aggregation with glyceryl Trinitrate and xanthine oxidoreduction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **292** (1): 326-330.
- Ogryzlo, M. A.; Urowitz, M. B.; Weber, H. M. and Houpt, J. B. (1966). The treatment of gout and disorders of uric acid metabolism with allopurinol. *Canadian Medical Association Journal*, **95**: 1120-1127.
- Okamoto, K. and Nishino, T. (1995). Mechanism of inhibition of xanthine oxidase with a new tight binding inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, **270** (14): 7816-7821.
- Okamoto, K.; Eger, B. T.; Nishino, T.; Kondo, S.; Pai, E. F. and Nishino, T. (2003). An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, **278** (3): 1848-1855.
- Okamoto, K.; Matsumoto, K.; Hille, R.; Eger, B. T.; Pai, E. F. and Nishino, T. (2004). The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis : Implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **101** (21): 7931-7936.
- Pacher, P.; Nivorozhkin, A. and szabó, C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors : Renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews*, **58** (1): 87-114.
- Pandey, N.; Chaurasia, J. K.; Tiwari, O. P. and Tripathi, Y. B. (2007). Antioxidant properties of different fractions of tubers from *Pueraria tuberosa* Linn. *Food Chemistry*, **105** : 219-222.
- Papagiannopoulos, M. and Galensa, R. (2005). Increased retention of polar flavonoids in RP-HPLC on a polaris amide C18 column. *Application Food*: 12-13.
- Pincemail, J.; Bonjean, K.; Cayeux, K. and Defraigne, J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16** : 233-239.
- Pipenbahr, N.; Moeller, P. L.; Dolinšek, J.; Jakobsen, M.; Weingartl, H. and Avreljaj-Cencič (2009). Nitric oxide (NO) production in mammalian non-tumorigenic epithelial cells of the small intestine and macrophages induced by individual strains of lactobacilli and bifidobacteria. *International Dairy Journal*, **19**: 166-171.

- Prakash, D.; Singh, B. N. and Upadhyay, G. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*, **102**: 1389-1393.
- Rahim, A. A.; Rocca, E.; Steinmetz, J.; Kassim, M. J.; Ibrahim, M. S. and Osman, H. (2008). Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. *Food Chemistry*, **107**: 200-207.
- Rahmani, M. (2007). Méthodes d'évaluation de la stabilité oxidative des lipides. *Les Technologies de Laboratoire*, **2**: 18-21.
- Rashba, Y. É.; Nagler, L. G.; Vartanyan, L. S.; Oktyabr'skaya, L. A. and Bilenko, M. V. (1990). Is xanthine oxidase a universal source of superoxide radicals in liver damage induced by ischemia and reperfusion? *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **109** (6): 727-730.
- Ratty, A. K. and Das, N. P. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, **39** (1): 69-79.
- Ré, D. B. ; Nafia, I. ; Nieoullon, A. ; Le Goff, L. K. and Had-Aissouni, L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Francaises d'Anesthésie et de Réanimation*, **24** : 502-509.
- Rouquette, M.; Page, S.; Bryant, R.; benboubetra, M.; Stevens, C. R.; Blake, D. R.; Whish, W. D.; Harrison, R. and Tosh, D. (1998). Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Letters*, **426**: 397-401.
- Sakihama, Y.; Cohen, M. F.; Grace, S. C. and Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities : phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, **177**: 67-80.
- Sanders, S. A.; Eisenthal, R. and Harrison, R. (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. Generation of superoxide anion. *European Journal of Biochemistry*, **245**: 541-548.
- Saraf, S.; Ashawat, M. S. and Saraf, S. (2007). Flavonoids : A nutritional protection against oxidative and UV induced cellular damages. *Pharmacognosy Reviews*, **1** (1) : 30-40.
- Sasaki, M. and Joh, T. (2007). Oxidative stress and Ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **40** (1): 1-12.

- Schafer, F. Q.; Qian, S. Y. and Buettner, G. R. (2000). Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cellular and Molecular Biology*, **46** (3): 657-662.
- Sharma, N. K.; Dey, S. and Prasad, R. (2007). In vitro antioxidant potentiel evaluation of *Euphorbia hirta* L. *Pharmacologyonline*, **1**: 91-98.
- Shen, S.-Y. and Chiang, H-C. (1997). Inhibition of xanthine oxidase by hydroxylated Anthraquinones and related compounds. *Anticancer Research*, **17** : 3293-3296.
- Sheu, S.-Y. and Chiang, H-C. (1996). Inhibitory effects of plant growth regulators on xanthine oxidase. *Anticancer Research*, **16**: 311-316.
- Simić, A.; Manojlović, D.; Segan, D. and Todorović, M. (2007). Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, **12**: 2327-2340.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-Phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**: 144-158.
- Song, Y. S.; Kim, S.-H.; Sa, J.-H.; Jin, C.; Lim, C.-J. and Park, E.-H. (2003). Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Ethnopharmacology*, **88**: 113-116.
- Soobrattee, M. A.; Neergheen, V. S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O. I. and Bahorun, T. (2005). Phenolics as potentiel antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, **579**: 200-213.
- Spranger, I.; Sun, B.; Mateus, A. M.; de Freitas, V. and Ricardo-da-Silva, J. M. (2008). Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chemistry*, **108**: 519-532.
- Svobodová, A.; Psotová, J. and Walterová, D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. *Biomed. Papers*, **147** (2): 137-145.
- Tadić, V. M.; Dobrić, S.; Marković, G. M.; Dordević, S. M.; Arsić, I. A.; Menković, N. R. and Stević, T. (2008). Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of Hawthorn Berries ethanol extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56** (17): 7700-7709.
- Tang, L.; Zhang, Y.; Qian, Z. and Shen, X. (2000). The mechanism of Fe₂⁺-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxy radical. *Biochemical Journal*, **15** (352): 27-36.

- Trevisan, M. T. S.; Pfundstein, B.; Haubner, R.; Würtele, G.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. and Owen, R. W. (2006). Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology*, **44**: 188-197.
- Tsao, R. and Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, **812**: 85-99.
- Vardar-Ünlü, G.; Silici, S. and Ünlü, M. (2008). Composition and in vitro antimicrobial activity of Populus buds and poplar-type propolis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **24** : 1011-1017.
- Vatter, D. A.; Ghaedian, R. and Shetty, K. (2005). Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment : focus on cranberry. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, **14** (2): 120-130.
- Vorbach, C.; Harrison, R. and Capecchi, M. R. (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immun system. *Trends in Immunology*, **24** (9) : 512-517.
- Wu, C.-R.; Huang, M.-Y.; Lin, Y.-T.; Ju, H.-Y. and Ching, H. (2007). Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. *Food Chemistry*, **104**: 1464-1471.
- Yang, J.; Guo, J. and Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *Food Science and Technology*, **41** : 1060-1066.
- Yesil-Celiktas, O.; Nartop, P.; Gurel, A.; Bedir, E. and Vardar-Sukan, F. (2007). Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis calli*. *Journal of Plant Physiology*, **164**: 1536-1542.
- Yilmaz, Y. and Toledo, R. T. (2004). Health aspects of functional grape seed-constituents. *Trends in Food Science & Technology*, **15**: 422-433.
- Yong-Xia and Zweier, J. L. (1995). Substrate control of free radical generation from xanthine oxidase in the postischemic heart. *Journal of Biological Chemistry*, **270** (32) : 18797-18803.
- Yoshihito, H.; Yuto, U.; Akira, N.; Hidekatsu, Y.; Yoshio, M.; Hiroaki, O.-N. and Hitoshi, K. (2002). Nitric oxide and hydroxyl radicals initiate lipid peroxidation by NMDA receptor activation. *Brain Research*, **941** (1-2): 107-112.
- Young, I. S. and Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, **54**: 176-186.

- Zhang, X. F.; Hung, T. M.; Phuong, P. T.; Ngoc, T. M.; Min, B-S; Song, K-S; Seong, Y-H and Bae, K. (2006). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. *Archives of Pharmacal Research*, **29** (12): 1102-1108.
- Zhao, G.-R.; Zhang, H.-M.; Ye, T.-X.; Xiang, Z.-J.; Yuan, Y.-J.; Guo, Z.-X. and Zhao, L.-B. (2008). Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. *Food and Chemical Toxicology*, **46**: 73-81.

Annexes

Annexes

Annexe N° 01 : Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoides et en tannins.

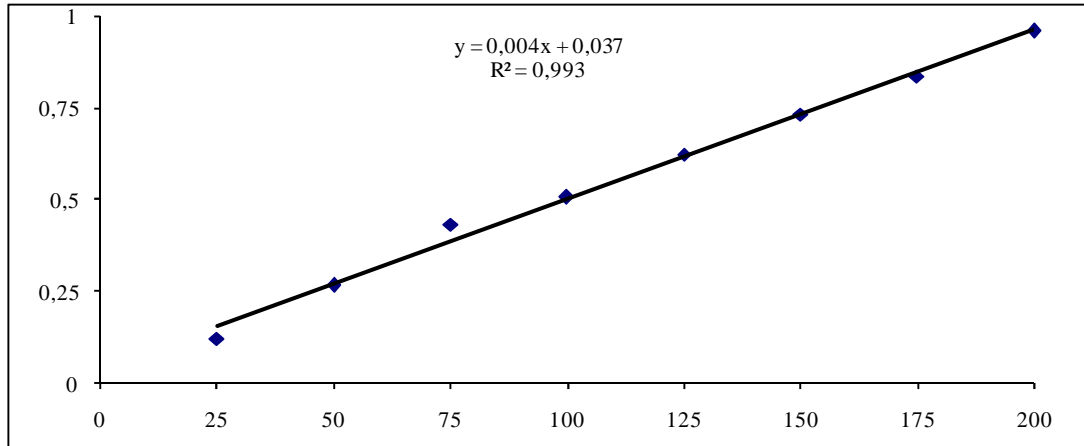


Figure 01 : courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ($\lambda = 765$ nm).

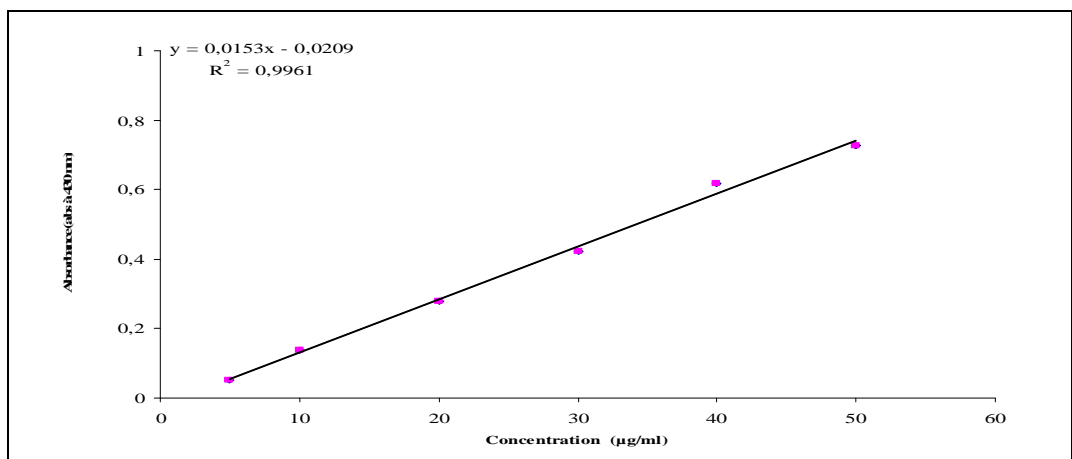


Figure 02: Courge d'étalonnage avec la rutine pour le dosage des flavonoides ($\lambda = 430$ nm).

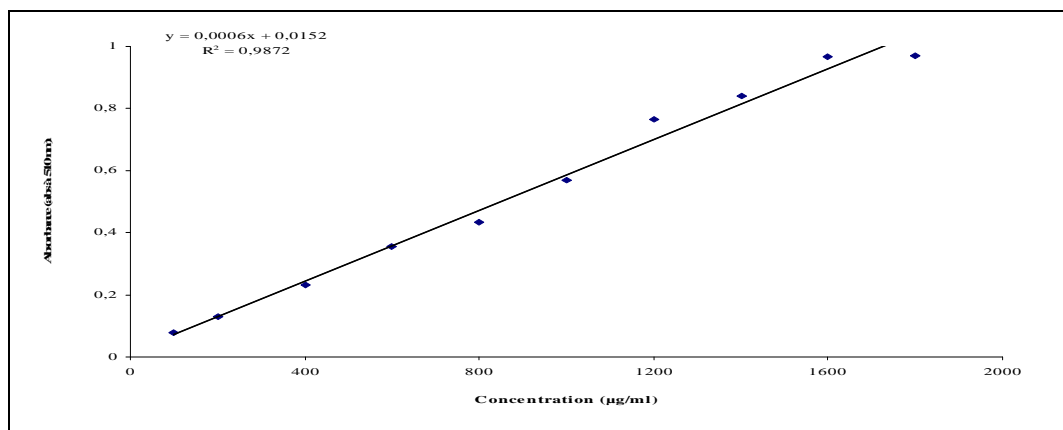


Figure 03: Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tannins ($\lambda = 510$ nm).

Annexe N° 02 : courbes obtenues par origin 8 utilisées pour le calcul des IC₅₀

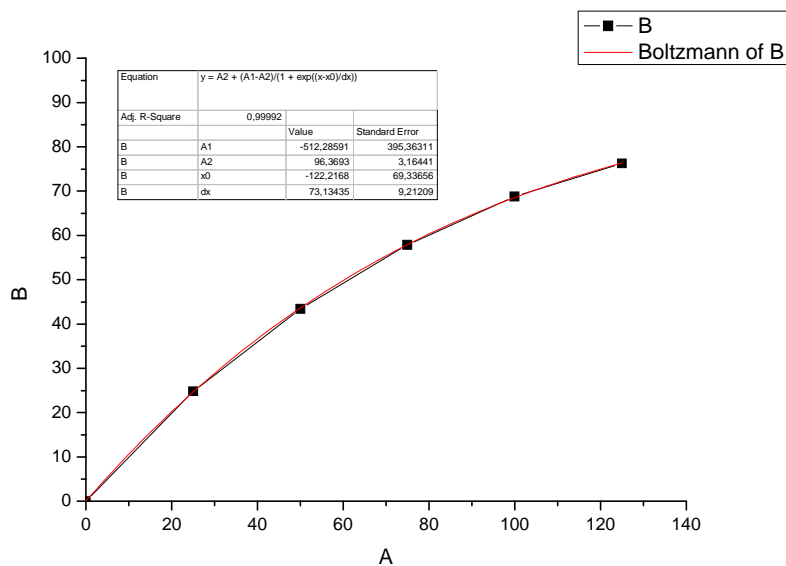


Figure 04: courbe pour le calcul de l'IC₅₀ pour l'inhibition de l'activité de la XO par l'extrait aqueux du chloroforme de *Populus nigra*

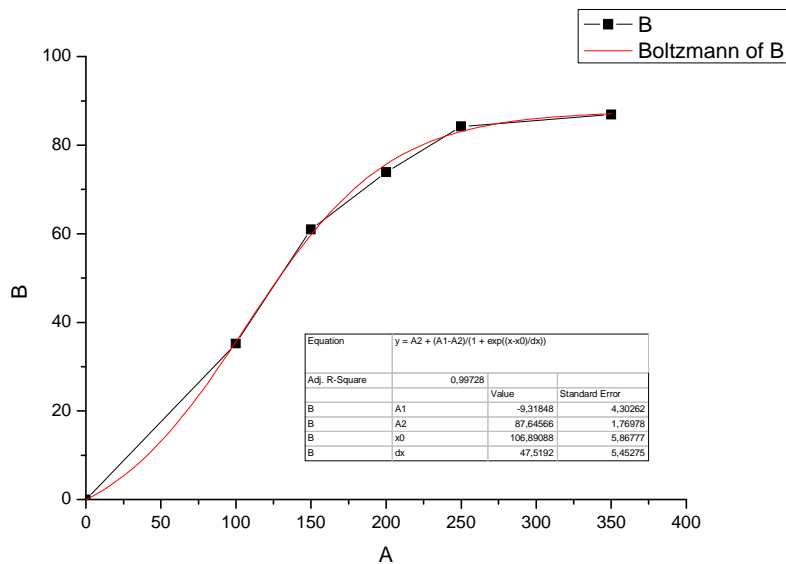


Figure 05: courbe pour le calcul de l'IC₅₀ pour l'inhibition de la formation du radical hydroxyle par la catéchine.

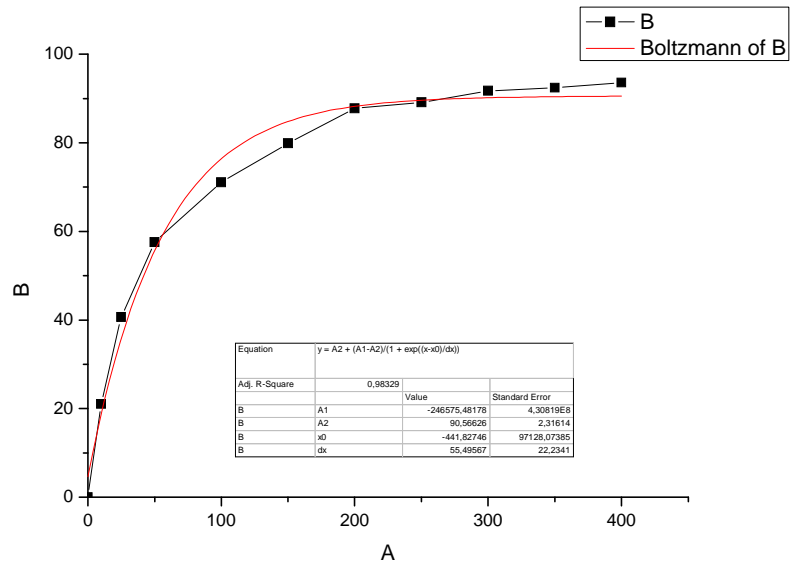


Figure 06: courbe pour le calcul de l'IC₅₀ pour l'inhibition de la peroxydation lipidique par la BHA

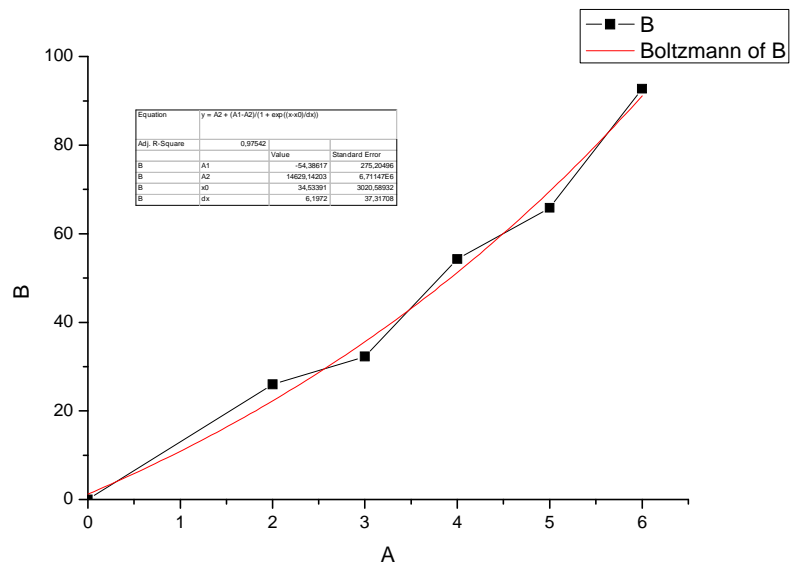


Figure 07: courbe pour le calcul de l'IC₅₀ pour l'inhibition de la peroxydation lipidique par l'extrait aqueux du chloroforme de *Populus nigra*.

Annexe N° 03 : courbes de corrélation des différentes activités avec les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et en tannins.

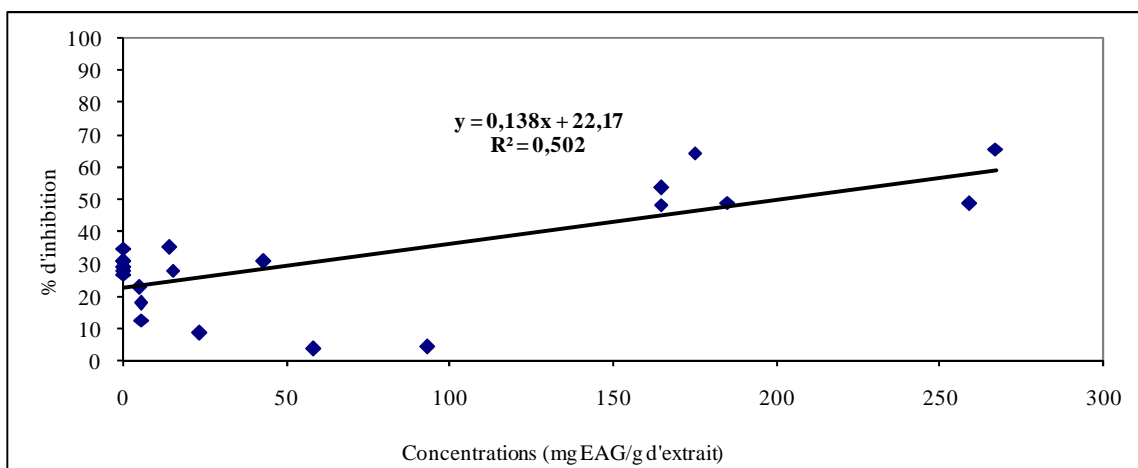


Figure 08 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice de la XO et la teneur en phénols totaux des extraits de *Populus nigra*.

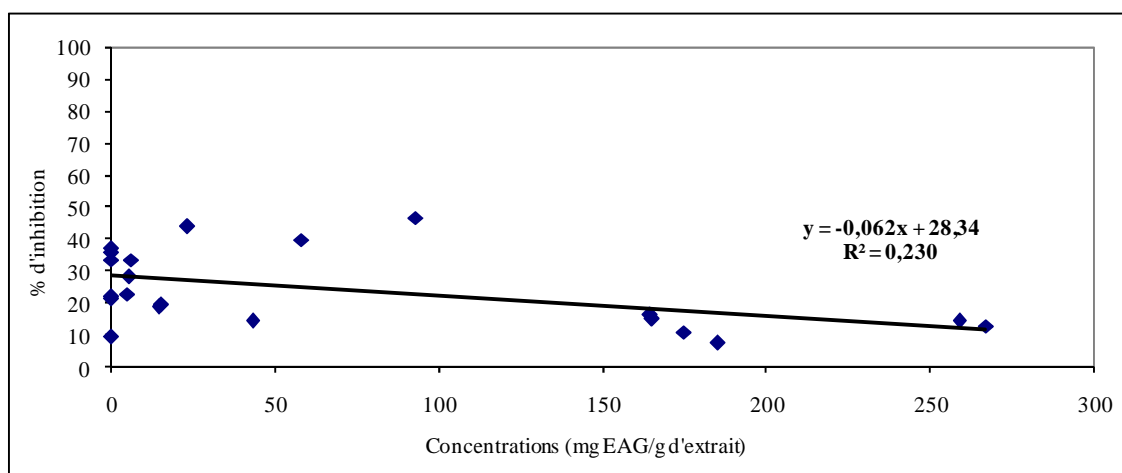


Figure 09 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice du radical hydroxyle et les teneurs en phénols totaux des extraits de *Populus nigra*

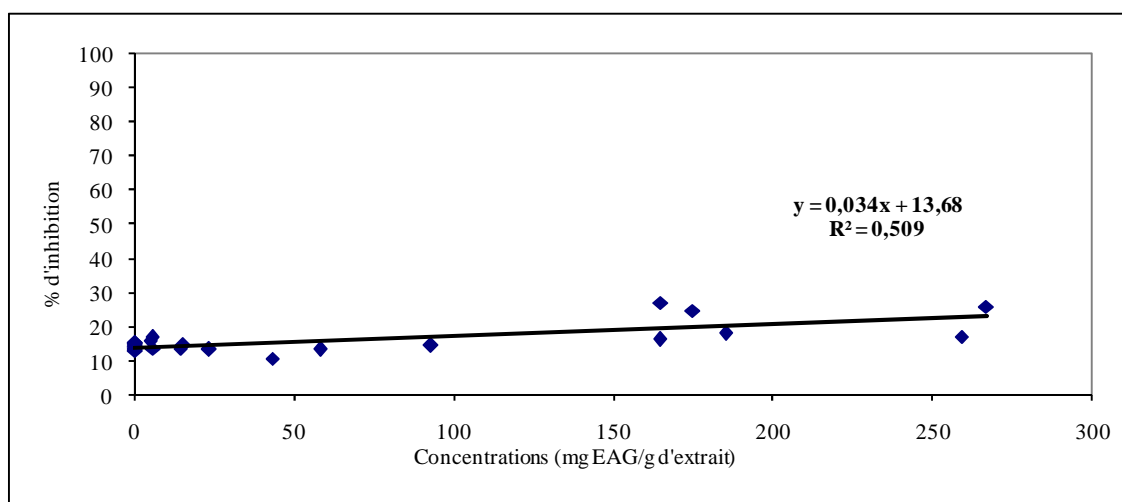


Figure 10 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et les teneurs en phénols totaux des extraits de *Populus nigra*.

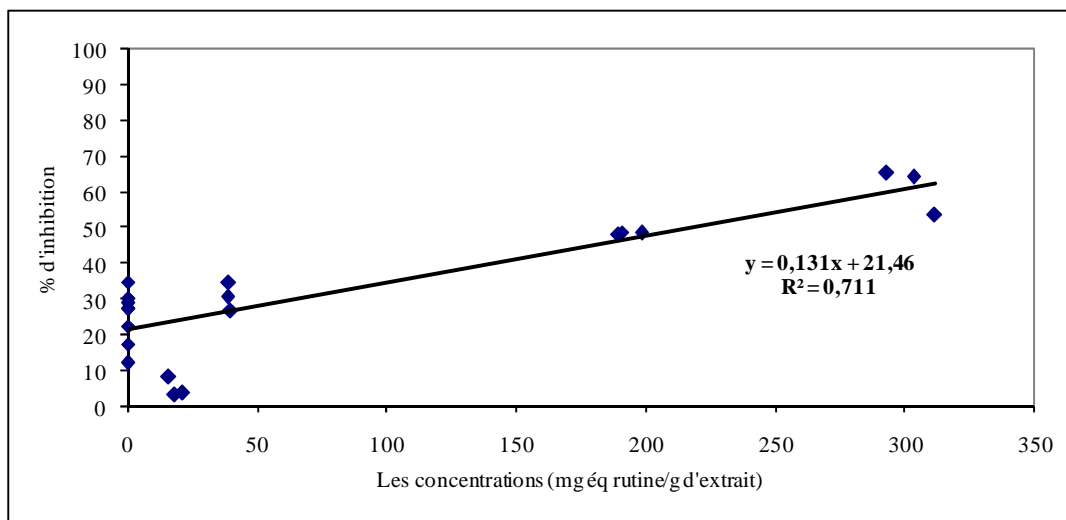


Figure 11 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice de la XO et les teneurs en flavonoides des extraits de *Populus nigra*

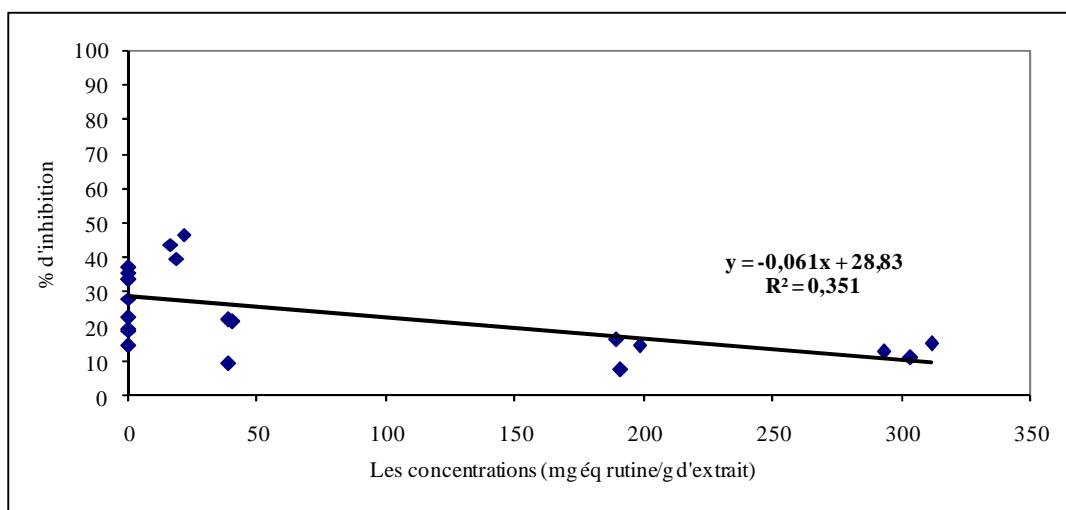


Figure 12 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice du radical hydroxyle et les teneurs en flavonoides des extraits de *Populus nigra*.

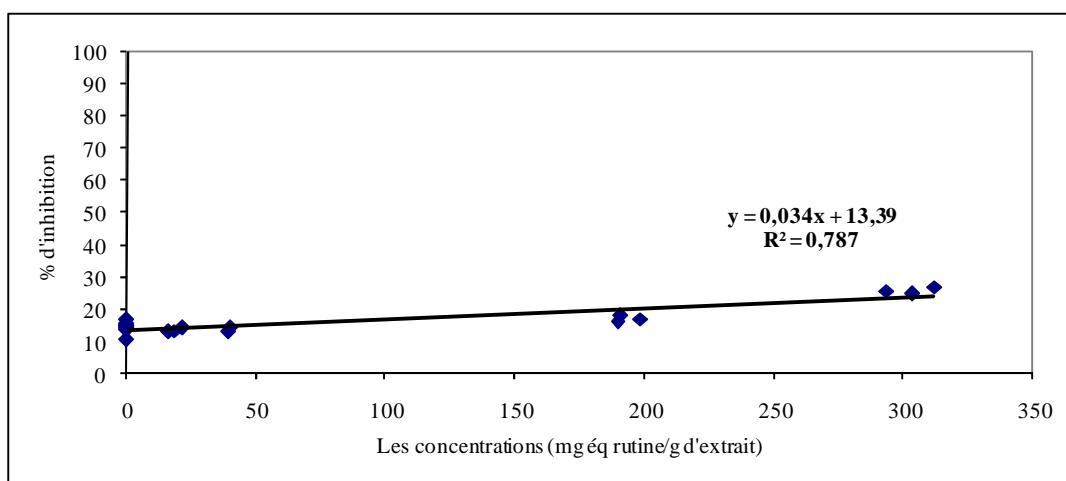


Figure 13 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et les teneurs en flavonoides des extraits de *Populus nigra*.

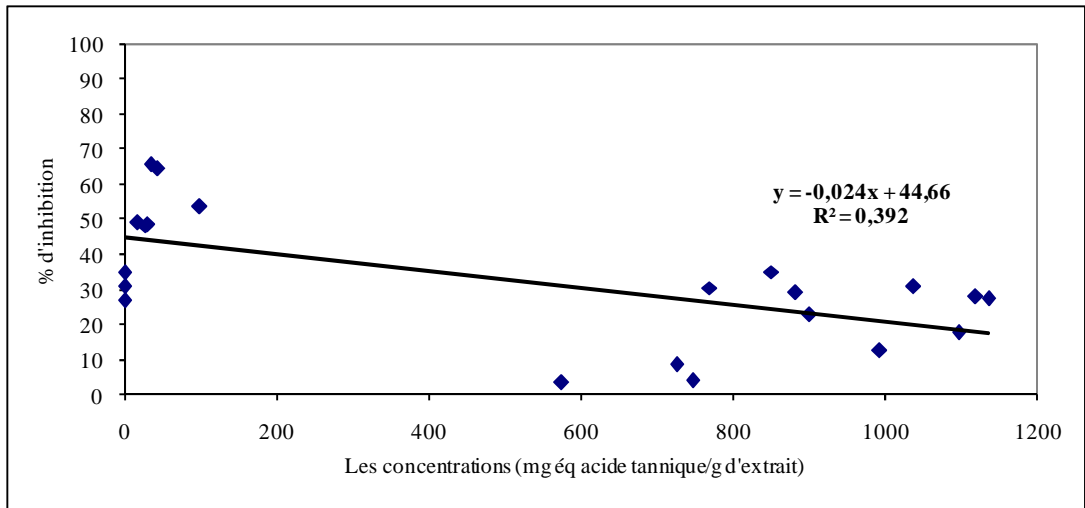


Figure 14 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice de la XO et les teneurs en tannins des extraits de *Populus nigra*.

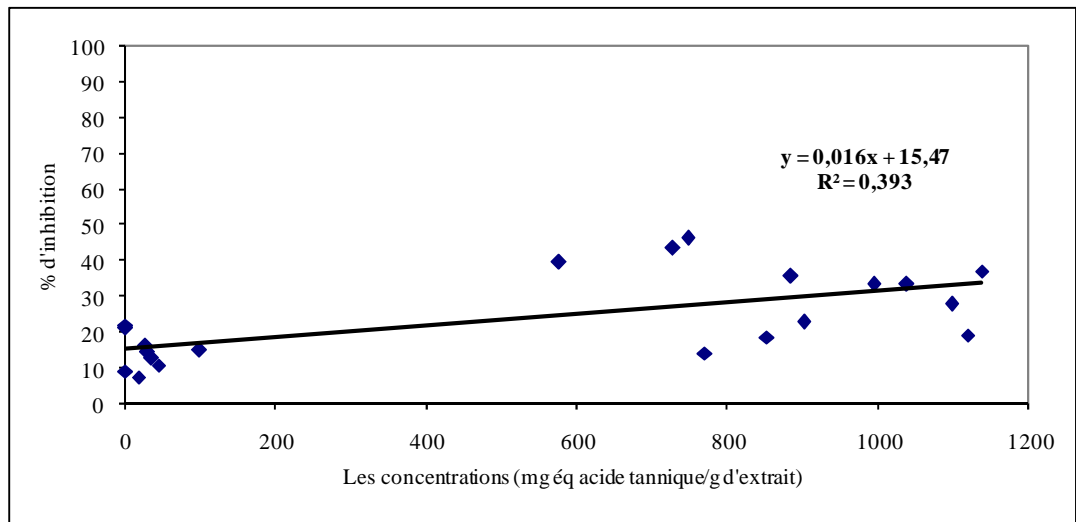


Figure 15 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice du radical hydroxyle et les teneurs en tannins des extraits de *Populus nigra*.

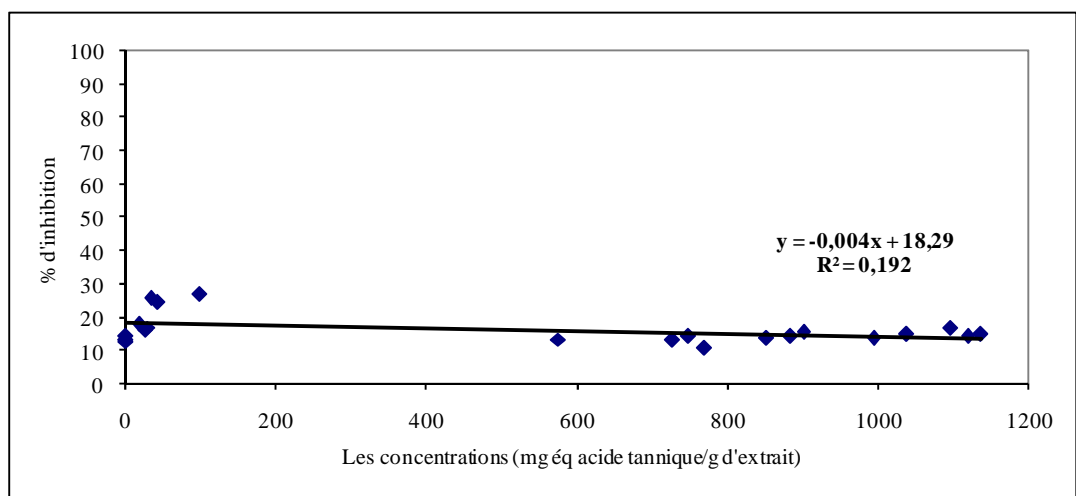


Figure 16 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et les teneurs en tannins des extraits de *Populus nigra*.

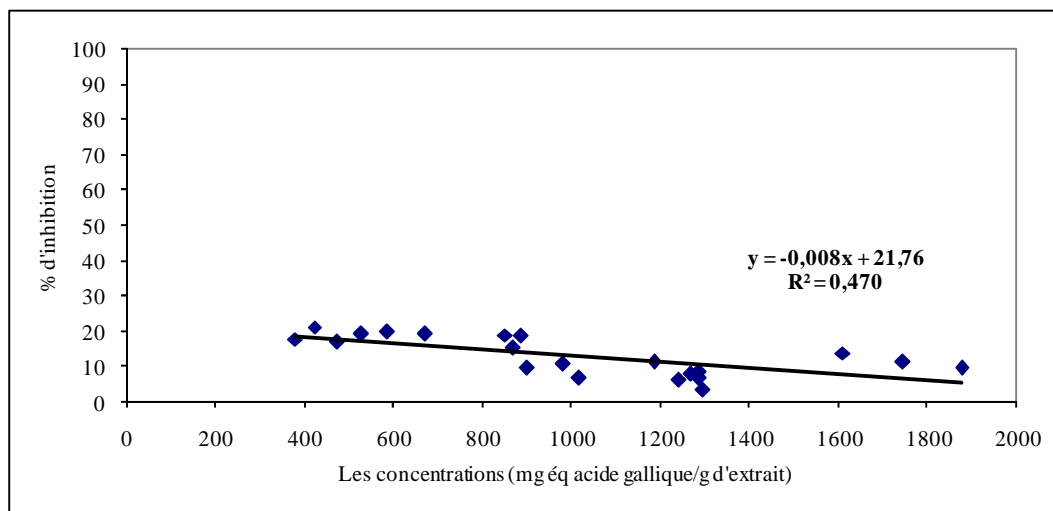


Figure 17 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice du radical hydroxyle et les teneurs en phénols totaux des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

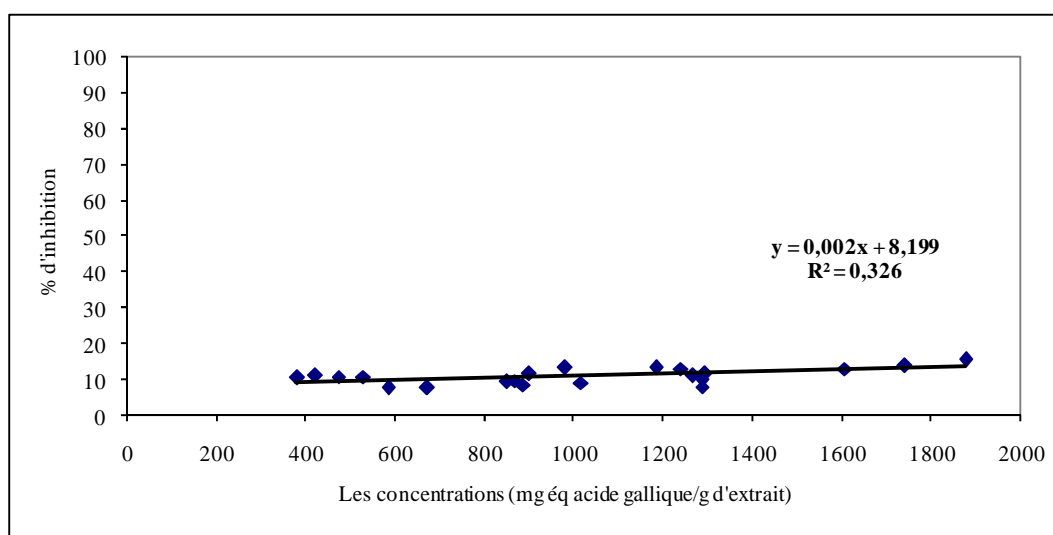


Figure 18 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et les teneurs en phénols totaux des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

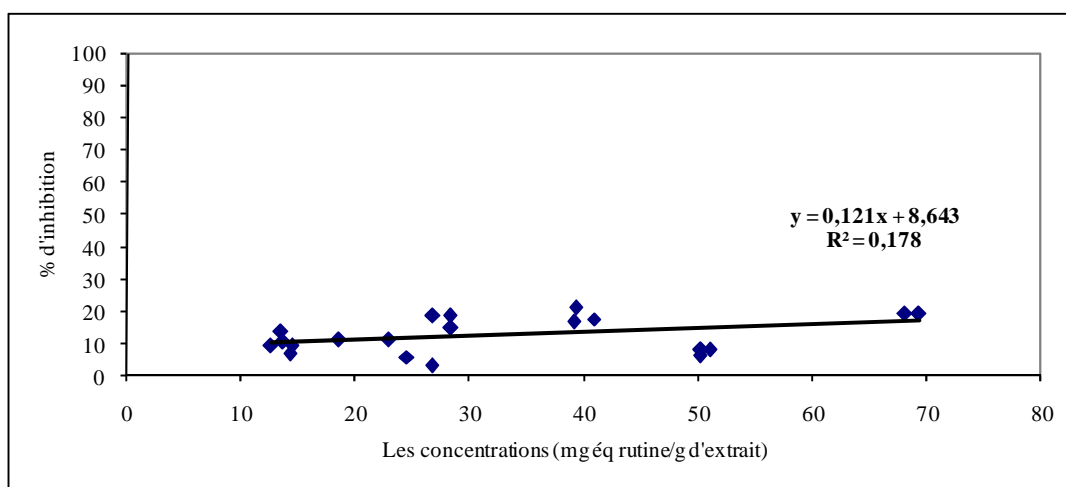


Figure 19 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice du radical hydroxyle et les teneurs en flavonoides des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

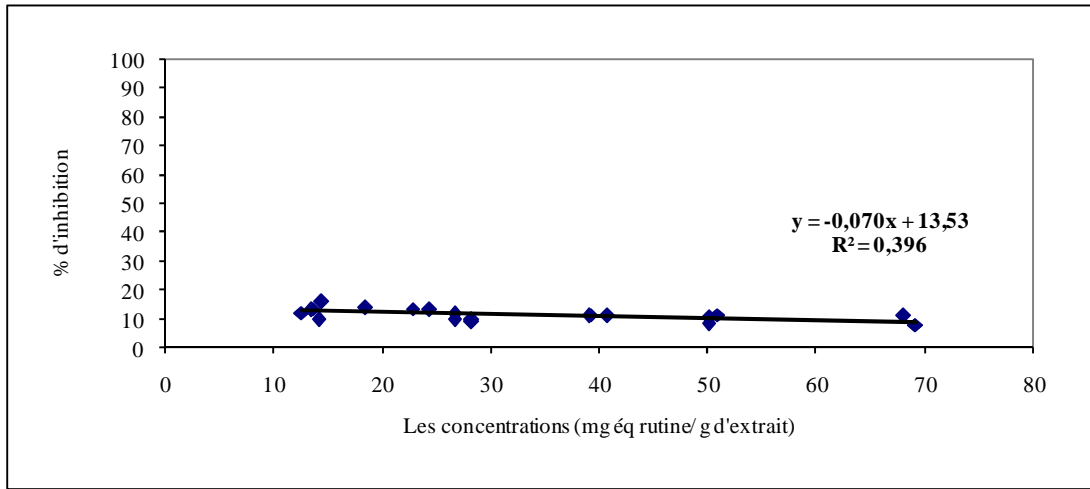


Figure 20 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et les teneurs en flavonoïdes des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

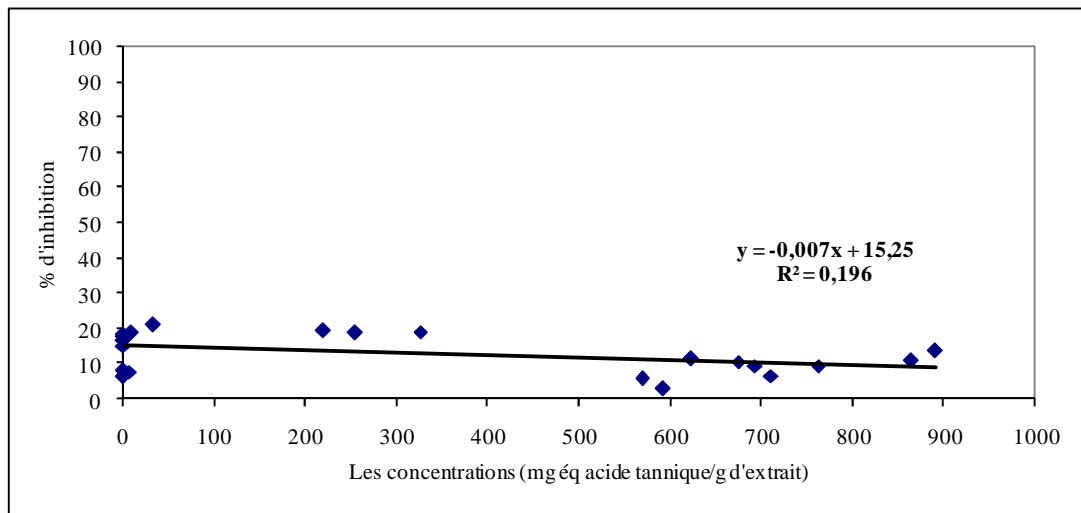


Figure 21 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice du radical hydroxyle et les teneurs en tanins des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

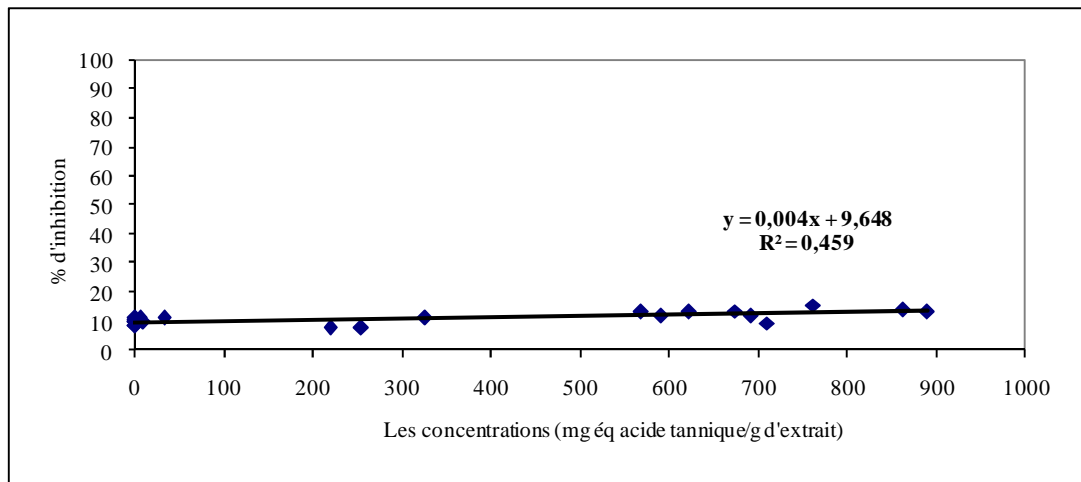


Figure 22 : courbe de corrélation entre l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et les teneurs en tanins des extraits de feuilles de *Fraxinus angustifolia*.

