

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico- Chimique



Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie et Biologie Moléculaire

Thème

Activité antioxydante de quelques molécules pures

Présenté par : OUALI Louiza & YAHIAOUI Kenza

Composition du jury

M ^r	M. TACHERFIOUT	MAA	Président
M ^{me}	N. BAHLOUL-CHERAFT	MAA	Promotrice
M ^{me}	S. KASMI	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

Avant tous, nous tenons à remercier le dieu, le tout puissant, pour nous avoir donnés la force et la patience.

Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement notre promotrice Mme BAHLOUL .N, qui nous a permis de bénéficier de son encadrement, ses conseils qu'elle nous a prodigués, sa patience, sa confiance ; qu'elle nous a témoignés et qui ont été déterminantes dans la réalisation de notre travail.

Nos remerciements s'étendent également à Mme ATMANI, Mme RAHMANI ainsi que à Mme YOUS FARAH pour leurs précieux conseils.

Nous voudrions également remercier les membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail : Mr TACHERFIOUT, qui nous a faits l'honneur de présider ce jury.

Mme KASMI, qui a accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements vont plus particulièrement à nos familles qui ont su nous soutenir tout au long de nos études. Merci à tous les personnes du laboratoire génétique, ainsi que toute personne de près ou de loin, qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

À la mémoire de : mon père ;

En hommage : À ma chère mère ;

*Ma source d'affectation de courage et d'inspiration qui a
autant sacrifié pour me voir atteindre ce jour, tu m'as tant donné, parfois un mot
suffisait pour me donner du courage, de suivre ma voie, merci pour ta présence.*

À mes très chère sœurs : Katia et son époux Layachi et

Siham et son époux Yassine

À mes très chers frères : Tarek 'Baby' et Massinssa

*À celui que je suis très fière de l'avoir mon très cher ami Adel qui a été
toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que dieu le garde
pour moi, et à toute sa famille.*

À ma très chère grand- mère Feroudja.

À mes adorables amies qui m'ont beaucoup aidée et m'encouragée :

Nouha & Saloua

*À toutes la famille YAHIAOUI et BOUFELIOUNE chacu'un avec
son nom.*

*À Ma chère binome et soeur Louiza qui m'accompagnée durant ce travail et
pendant toute les années d'études à l'université, bien sûr sans oublier sa famille.*

À toute la promotion de biochimie et biologie moléculaire 2017.

*En fin à toute personne qui est chère à mon coeur et qui m'a aidée de près ou de
loin.*

Kenza.

DEDICACES

A Dieu, le clément et miséricordieux, pour sa Grace. Puisse Allah le tout puissant m'éclairer de sa lumière divine.

A mes chers parents : Ma mère et mon père qui m'ont supportée et m'ont aidée dans les pires moments, je leur dédie avec fierté ce mémoire qui reflète le fruit de l'éducation et de l'attention qu'ils m'ont tant réservé.

A ma très chère sœur KAHINA et mon frère IMAD.

A ma très chère tante BIBA.

A mes chères grand mères et grand père.

A celui que je suis très fière de l'avoir mon très cher ami YOUNA qui a été toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager, que dieu le garde pour moi.

*A mes adorables amies qui m'ont beaucoup aidée et m'encouragée :
MERIEME, WIZA, KAKI.*

A mes adorables cousines :

MELISSA, LYDIA, SONIA, AKILA, AMEL, NADJET.

A toute la famille OUALI et ZAIDI chaqu'un avec son nom.

A Ma chère binôme et sœur KENZA qui m'a accompagnée durant ce travail et tout notre cursus à l'université, et à toute sa famille.

A toute la promotion de biochimie et biologie moléculaire 2017.

En fin à toute personne qui est chère à mon cœur et qui m'a aidée de près ou de loin.

Louiza (wizou).

Liste des abréviations

A : Absorbance

ABTS : 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique

ABTS⁺ : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique

ADN : Acides Désoxyribo-Nucléique

A_t : Absorbance du témoin.

BHA : Hydroxyanisole Butylé

CH₃O- : Groupes Méthoxyles

Cu : Cuivre

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EC-SOD : extracellular superoxyde dismutase

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

Fe²⁺ : Fer

FeCl₂ : chlorure de fer

GPx : Glutathion Peroxydase

GSH : Glutathion

GSSG : disulfure de glutathion

H⁺ : Hydrogène

H₂O : molécule d'eau

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène

H₃PO₄ : Acide Phosphorique

HCl : acide chlorhydrique

IC₅₀ : Concentrations Inhibitrices nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libre

K₂HPO₄ : Di-potassium Hydrogen Phosphate Anhydrous

KH₂PO₄ : Potassium Phosphate Monobasic

NaCl : Sodium Chloride

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NaOH : Hydroxyde de sodium

NEDD : Naphtylethylenediaminedichloride

NO : Oxyde Nitrite

NOS : Oxyde Nitrite Synthase

O₂⁻ : Anion Superoxyde

O₂: Oxygène

¹O₂: Oxygène Singulet

·OH: Radical Hydroxyle

ONOO⁻: Anion Peroxynitrite

P: Probabilité

pH: Potentiel d'Hydrogène

r: Coefficient de Corrélation

SH: Sulfhydryle

SOD: Superoxyde Dismutase

UV: Ultra-violet

Zn: Zinc

Liste des figures

Figure 1 : Schématisation de la balance entre les espèces réactives oxygénées et les antioxydants.....	4
Figure 2 : Piégeage des ERO (X [•]) par un noyau catéchol.....	9
Figure 3 : Sites de chélation des ions métalliques par la quercétine.....	10
Figure 4 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	11
Figure 5 : Structure des groupements hydroxyles pour la quercétine et la myricétine respectivement.....	12
Figure 6 : Comparaison de la présence ou l'absence de la double liaison C ₂ et C ₃ et la fonction 4-oxo chez la quercétine et catéchine.....	12
Figure 7 : Glycosylation de la quercétine en rutoside.....	13
Figure 8 : Structure de l'acide gallique.....	15
Figure 9 : Structure chimique de la quercétine.....	16
Figure 10 : Structure chimique de la catéchine.....	16
Figure 11 : Structure chimique de l'acide tannique.....	17
Figure 12 : Structure chimique de l'acide ascorbique.....	17
Figure 13 : Structure chimique de l'acide cinnamique.....	18
Figure 14 : Structure chimique d'acide caféique.....	18
Figure 15 : Structure chimique de la BHA.....	18
Figure 16 : Structure chimique d'EDTA.....	19
Figure 17 : Forme oxydée et réduite de l'ABTS.....	20
Figure 18 : Le radical DPPH [•] et sa forme stable.....	22
Figure 19 : L'effet anti-radicalaire contre le monoxyde d'azote des molécules pures à 100 µg/ml.....	24
Figure 20 : Activité scavenging des différentes molécules pures sur le radical ABTS ^{•+} à la concentration 100µg/ml.....	26
Figure 21 : Activité antiradicalaire contre le radical ABTS ^{•+} de quelques molécules pures à différentes concentration.....	27
Figure 22 : Effets scavenger contre le radical DPPH [•] des molécules pures à 100 µg/ml.....	30
Figure 23 : Effets scavenger contre le radical DPPH [•] des molécules pures à différentes concentrations.....	31
Figure 24 : Activité chélatrice du fer des molécules pures à une concentration de 100 µg/ml.....	33

Figure 25 : Activité chélatrice du fer des molécules pures à différentes concentrations.....**34**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Modèles de substitution de la série de quelques flavonoïdes testés pour leur activité antioxydant.....	25
Tableau II: Les IC₅₀ de différentes molécules pures testées contre le radical cationique ABTS ^{•+}	28
Tableau III : Les IC₅₀ du radical DPPH [•] de différentes molécules pures testées.....	32
Tableau IV : Les IC₅₀ de la chélation du fer des différentes molécules pures testées.....	35

Liste des annexes

Annexe I : Caractérisation structurelle de la catéchine et de la quercétine.

Annexe II : Corrélation entre différentes activités antioxydantes.

Introduction

Au cours de l'évolution, les organismes aérobies se sont adaptés à l'oxygène atmosphérique par le développement de systèmes métabolisant la molécule d'oxygène. Un déséquilibre de ce métabolisme, entraîne un stress oxydant dans l'organisme qui se manifeste par une synthèse accrue d'espèces très réactives à savoir le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyle ($HO\cdot$) et le monoxyde d'azote ($NO\cdot$). Ces derniers peuvent créer des dommages oxydatifs sur les macromolécules biologiques (les protéines, les lipides et l'ADN), induisant de ce fait de nombreuses maladies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer (**Favier, 2003 ; Gardès-albert *et al.*, 2003**).

Pour faire face à ces produits oxydants délétères, l'organisme possède tout un arsenal de défenses très efficace, représenté par des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Afin de renforcer ce système antioxydant, l'intervention de molécules antioxydantes exogènes est indispensable pour la neutralisation de radicaux libres produits (**Heim *et al.*, 2002**).

L'activité antioxydante d'un composé dépend essentiellement de sa capacité à neutraliser un radical libre en lui transférant un électron et /ou un atome d'hydrogène, grâce à sa structure et les différentes configurations à savoir le degré d'hydroxylation, de l'O-méthylation de glycosylation, de polymérisation et la présence de la fonction 4-oxo et la double liaison entre C₂ et C₃, jouent un rôle crucial dans cette activité antioxydante (**Heim *et al.*, 2002**).

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'activité antioxydante de quelques molécules pures naturelles (polyphénoliques, vitamines) et synthétique (BHA) et d'établir une relation probable entre l'effet enregistré de l'activité antioxydante de chaque molécule avec sa structure.

I. Généralités

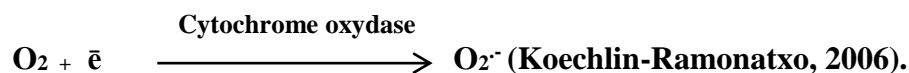
L'oxygène est un gaz indispensable à la vie, le dysfonctionnement de son métabolisme produit un excès des espèces chimiques très réactives connues sous le nom d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), qui sont capables d'entraîner des effets délétères dans l'organisme (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

I.1. Principales espèces réactives

I.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

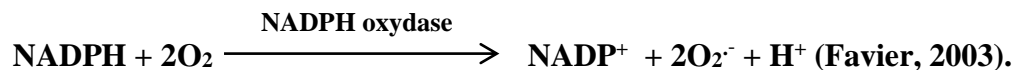
➤ Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

La source principale de la production d'anion superoxyde est la chaîne respiratoire mitochondriale. Il résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire qui est catalysé par le cytochrome oxydase (Koechlin-Ramonatxo, 2006) selon la réaction suivante :

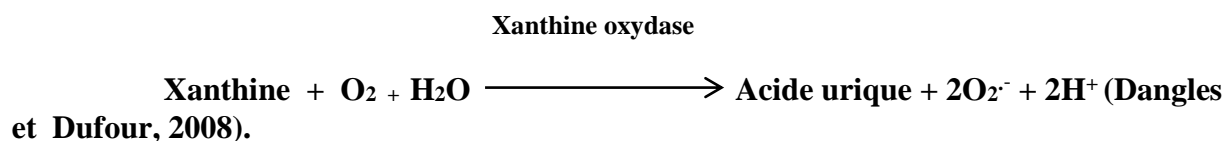


Il existe différentes sources de l'anion superoxyde :

❖ Lors de l'inflammation, les cellules phagocytaires activées produisent des radicaux oxygénés par activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Ce phénomène est appelé explosion oxydative (Favier, 2003) selon la réaction suivante :

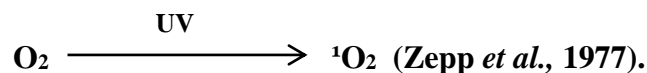


❖ Lors de l'activité enzymatique de xanthine oxydase, des peroxydases et d'autres oxydases (Dangles et Dufour, 2008).



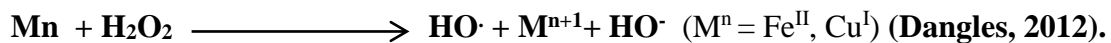
➤ **Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)**

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule excitée qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation où une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (**Zepp et al., 1977**).



➤ **Radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$**

Le radical $\cdot\text{OH}$ est l'une des espèces chimiques les plus oxydantes et peut attaquer très rapidement la plupart des molécules biologiques. C'est le produit de la réduction de H_2O_2 , en présence des ions métalliques (**Dangles, 2012**).



➤ **Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2**

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 n'est pas une espèce radicalaire, il n'est pas chargé et peut donc diffuser très facilement à travers les membranes. De ce fait, son action n'est pas restreinte à son lieu de production mais peut se dérouler dans différents compartiments cellulaires tel que le noyau, ce qui fait de lui une ERO assez toxique (**Barouki, 2006**).

I.1.2. Espèces réactives azotées

➤ **Le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$)**

Dans l'organisme, le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$) est synthétisé à partir de l'arginine en deux étapes, la première consiste en une conversion de la L-arginine en arginine-OH, cette réaction est catalysée par la NO synthase (NOS), la seconde consiste en une conversion de l'arginine-OH en $\text{NO}\cdot$ et citrulline (**Jagetia et Baliga, 2004**).

Le $\text{NO}\cdot$ joue le rôle de médiateur biologique au cours de la vasodilatation, la neurotransmission, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la défense immunitaire. Le

monoxyde d'azote est peu réactif et diffusible dans les milieux biologiques. Sa durée de vie est de l'ordre de quelques secondes (**Jagetia et Baliga, 2004**).

En forte concentration le $\text{NO}\cdot$ interagit avec l'anion superoxyde pour former le peroxynitrite (ONOO^-). Ce composé hautement réactif, cause des dommages aux protéines, lipides et acides nucléiques. L'exposition à de faibles concentrations de $\text{NO}\cdot$ conduit à la nitrosylation du glutathion réduit intracellulaire (**Kroncke et al., 2000**).

I.2. Stress oxydatif

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des EROs et leur destruction par le système de défense antioxydants (**Bonnefont-Rousselot et al., 2003**).

Les espèces réactives oxygénées et nitrogénées peuvent engendrer des dommages importants dans la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques (**Pincemail et al., 1999**).

Dans les conditions normales, les EROs sont produites en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou de résidus de réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de système de défense adaptatif par rapport au niveau des radicaux présents. Dans ces conditions la balance pro- oxydant/antioxydant est en équilibre (figure 1). Cette dernière peut être rompue par diverses raisons en faveur du système pro-oxydant, qui est à l'origine du stress oxydant (**Favier, 2003**).

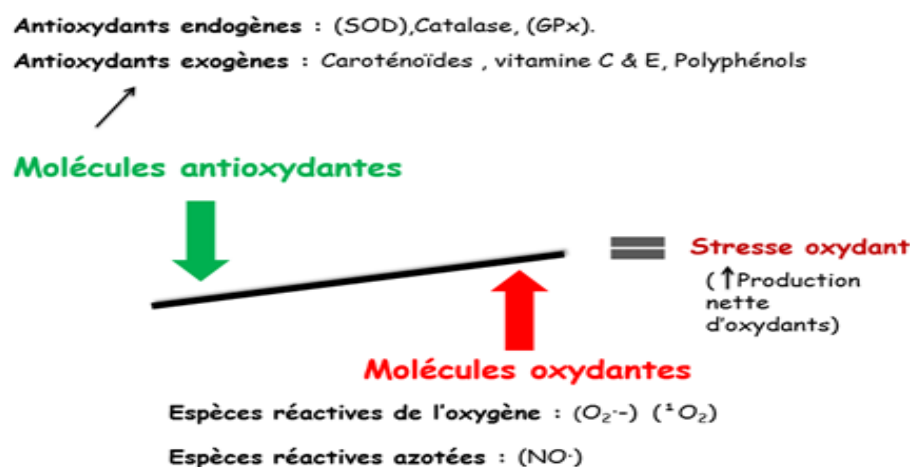


Figure 1 : Schématisation de la balance entre les espèces réactives oxygénées et les antioxydants (**Favier, 2003**).

I.2.1. Lésions liées au stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides) (**Favier, 2003**).

a. Altération des protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) (**Favier, 2003**). L'oxydation des acides aminés soufrés, entraînent des modifications structurales des protéines, conduisant à la formation de groupement carbonyles, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur digestion par les protéases (**Dalle-Donne et al., 2006**). Ces altérations concernent particulièrement les enzymes antioxydantes et l'intégrité des membranes cellulaires par la modification du caractère antigénique et des propriétés fonctionnelles des protéines membranaires (récepteurs ou enzymes) (**Gruber et al., 2006 ; Jacob et al., 2006**).

b. Peroxydation des lipides

La peroxydation des membranes lipidiques causée par le stress oxydatif peut être très dommageable puisqu'elle altère les propriétés biologiques de la membrane telles le degré de fluidité et peut aussi mener à l'inactivation d'enzymes et de récepteurs liés à la membrane. Ce qui risque d'affecter le fonctionnement cellulaire normal et d'augmenter la perméabilité de la membrane, aboutissant à sa désorganisation complète et altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (**Dalle-Donne et al., 2006 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

c. Altération des acides désoxyribonucléique (ADN)

Les espèces réactives oxygénées ainsi que nitrogénées, provoquent des lésions au niveau de l'ADN. Ceux-ci peuvent induire des altérations de bases nucléotidiques (purines et pyrimidines), ou des ruptures de brins d'ADN. Ces altérations structurales entraînent à long terme des altérations géniques lorsqu'elles ne sont pas réparées (**Shimizu, 2004**).

I.3. Antioxydants

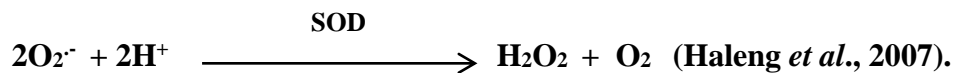
Les antioxydants sont des molécules capables de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme. Ces antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces radicaux (**Favier, 2003**). Les antioxydants sont classés en deux grandes classes, à savoir, les antioxydants endogènes et exogènes (**Baba et McGrath, 2008**).

I.3.1. Antioxydants endogènes

Les antioxydants endogènes se retrouvent sous forme d'enzymes produites par l'organisme, permettant de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal (**Baba et McGrath, 2008**). Les principaux systèmes enzymatiques comprennent :

a. Superoxyde dismutase (SOD)

Ce sont des métalloprotéines possédant une activité enzymatique : elles évitent l'accumulation de superoxyde en catalysant sa dismutation en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (**Haleng et al., 2007**). Selon la réaction suivante :



Chez l'homme, trois isoformes compartimentées de l'enzyme SOD ont été caractérisées. La Cu/Zn-SOD ou SOD1 cytosolique, et la EC-SOD ou SOD3 extracellulaire, qui utilisent le cuivre et le zinc comme cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique, alors que la SOD2 mitochondriale utilise le manganèse (**Afonso et al., 2007**).

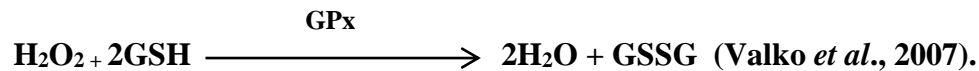
b. Catalase (CAT)

Le peroxyde d'hydrogène produit par les SODs doit être rapidement métabolisé par la catalase (enzyme localisée essentiellement dans les peroxysomes) (**Valko et al., 2006**) en entraînant la destruction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (**Rahman et al., 2006**).



c. Glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme à cofacteur de Sélénium, se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale, elle est capable de prendre en charge le peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme possède une grande spécificité pour le glutathion réduit (GSH) qui est utilisé comme donneur d'hydrogène au cours des réactions de décomposition, il s'en suit la formation du glutathion oxydé (GSSG) (Valko *et al.*, 2007) selon la réaction suivante :



La GPx est donc en compétition avec la catalase pour le substrat H₂O₂ et elle est la source majeure de protection contre les faibles niveaux de stress oxydant (Valko *et al.*, 2007).

I.3.2. Antioxydants exogènes

L'apport alimentaire fourni à l'organisme une large gamme d'antioxydants tels que les vitamines E et C, caroténoïdes, composé phénoliques (Adjadj, 2009) qui agissent en piégeant les radicaux en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (Favier, 2003) à cela s'ajoute un certain nombre d'oligo-éléments indispensables pour l'activité des enzymes antioxydants (Pincemail *et al.*, 2002).

a. Tocophérol (vitamine E)

La vitamine E est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, elle prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement (Burton et Ingold, 1986).

b. Polyphénols

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Ils sont des composés photochimiques poly hydroxylés comprenant au moins un noyau aromatique à 6 carbones (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Ce sont des antioxydants naturels puissants impliqués dans la défense contre les dommages oxydatifs au niveau de la cellule grâce à leurs structures chimiques. Ils sont subdivisés en sous classe principales, les acides phénols, les flavonoïdes, les lignines, les tannins (Osoy *et al.*, 2008).

- **Phénols simples**

Les phénols simples sont reconnus par des structures chimiques simples, ils sont divisés en acides benzoïques à sept atomes de carbones (C₆-C₁), en acides cinnamiques à neuf atomes de carbone (C₆-C₃) et en fin en coumarines qui possèdent un hétérocycle oxygéné à six atomes, accolé à un noyau benzoïque et qui dérivent des acides cinnamiques par cyclisation de leur chaîne latérale (**Macheix *et al.*, 2006**).

- **Flavonoïdes**

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres (**Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006**). Environ 4000 composés flavoniques sont connus et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C₆-C₃-C₆ à poids moléculaire faible (**Yao *et al.*, 2004**).

- **Tannins**

Tannin est un terme qui provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux (**Hopkins, 2003**). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités. Deux catégories sont distinguées (**Hopkins, 2003**).

- Les tannins hydrolysables
- Les tannins condensés

c. Oligo-éléments

Les oligoéléments (zinc, sélénium, cuivre, manganèse) constituent des cofacteurs nécessaires aux activités des enzymes antioxydantes (**Favier, 2003 ; Defraigne et Pincemail, 2007**).

I.4. Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. La plupart des antioxydants de synthèse ou naturelle possèdent des groupes hydroxy phénoliques dans leurs structures (**Popovici *et al.*, 2009**).

Du point de vue de leur activités, les antioxydants peuvent être classés en : antioxydants scavengers, chélateurs de métaux, inducteurs de synthèse des enzymes antioxydants et inhibiteurs des enzymes génératrices des radicaux libres (Pietta, 2000).

I.4.1. Antioxydants scavengers

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs responsables de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox, les polyphénols (Ar-OH), sont capables de réduire rapidement les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, les peroxydes, les alkoxydes et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène (Pietta, 2000)



Où

X· : Représente l'une des ERO mentionnées ci-dessus ;

Ar-O· : radical aryloxyde. S'il s'agit d'un noyau catéchol, peut réagir avec un autre radical pour former une o-quinone plus stable (figure 2).

En outre, le radical aryloxyde peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes. Ainsi, la capacité antioxydante des polyphénols dépend non seulement du potentiel redox du couple Ar-O/Ar-OH mais aussi de la réactivité du radical Ar-O· (Pietta, 2000).

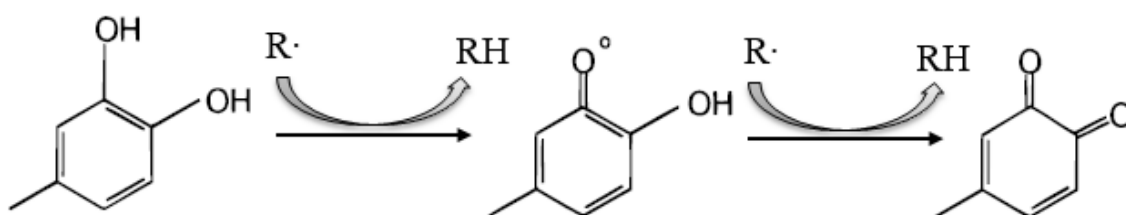


Figure 2 : Piégeage des ERO (X·) par un noyau catéchol (Pietta, 2000).

I.4.2. Chélation des ions métalliques

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+), en réduisant leur concentration par la complexation sous une forme qui inhibe leur activité redox au niveau de différents sites (figure 3) (Yuanzhen et Mingquan, 2015).

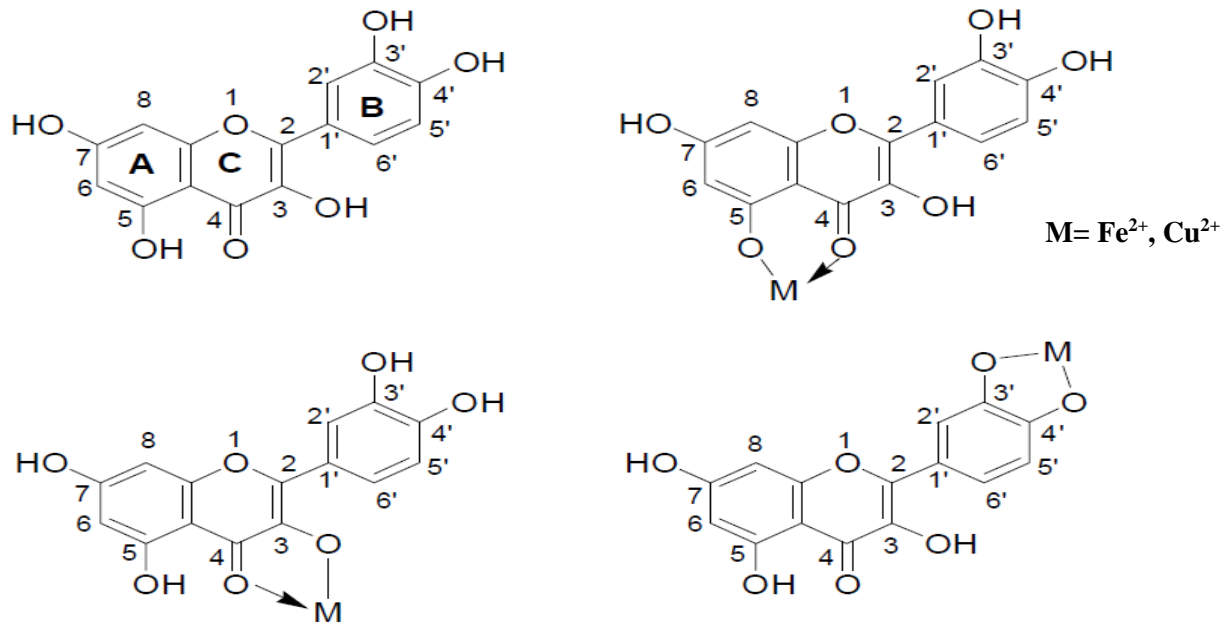


Figure 3 : Sites de chélation des ions métalliques par la quercétine (Yuanzhen et Mingquan, 2015).

De souza *et al.*, 2003 ont montré que la fixation du fer avec la quercétine se fait au niveau du groupement 3-hydroxy-4-oxo (cycle C) et au niveau du noyau catéchol (cycle B) qui est connu pour sa forte affinité pour fer.

I.4.3. Inhibition des enzymes génératrice des radicaux libres

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines (Dangles et Dufour., 2008), via des interactions de van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques). Par exemple, les aglycones des flavonoïdes, essentiellement les flavones et les flavonols (noyaux tricycliques plans et polarisables), ont une capacité de se lier avec beaucoup de protéines globulaires, notamment des enzymes, des récepteurs et transporteurs (Dangles, 2012).

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres (Xanthine oxydase, lipooxygénase, et cyclooxygénase) dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant pour les polyphénols. Plusieurs travaux ont rapportés que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet, par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ERO (Pietta, 2000).

I.4.4. Inducteurs de synthèse des enzymes antioxydants

La quercétine a été étudiée pour ses capacités à exprimer des propriétés antiprolifératives et induisent principalement la mort cellulaire par un mécanisme apoptotique dans les lignées cellulaires cancéreuses. Ce flavonol peut induire l'activation d'enzyme capable d'enclencher l'apoptose, la caspase-3 dans le processus d'apoptose. Ceci est dû à la substitution des groupes hydroxyles sur le cycle B et de l'insaturation de la liaison C₂-C₃ (Willians *et al.*, 2004).

I.5. Relation structure chimique et activité antioxydante des antioxydants

De nombreuses études ont établi la relation entre la quantité, la structure chimique des antioxydants et leur activité. Cependant, aucune conclusion n'a été prononcée sur la relation quantité /activité antioxydantes (Heim *et al.*, 2002).

Les résultats rapportés ont montré clairement que l'activité des composés phénoliques dépend essentiellement de leur structure plane, le nombre et la position de leur groupe hydroxyle, la présence de la double liaison C₂ et C₃, la fonction 4-oxo et enfin la polymérisation (Heim *et al.*, 2002).

D'autres auteurs ont cité que certaines modifications structurales notamment la glycosylation et l'O-méthylation de groupe hydroxyle des flavonoïdes, réduisent leurs activités antioxydantes (Atmani *et al.*, 2009).

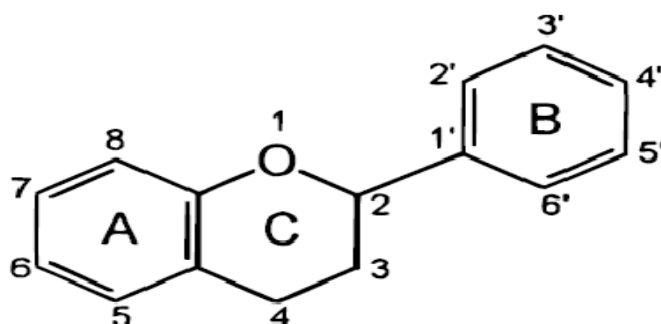


Figure 4 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Pietta, 2000).

I.5.1. Les groupements hydroxyles

Les positions et le degré d'oxydation jouent un rôle important dans l'activité antioxydante des polyphénols. Ces derniers porteurs d'un groupement catéchol (un noyau aromatique porteur de deux fonctions hydroxyles adjacentes) ont un potentiel antioxydant

élevé. Ainsi, tous les flavonoïdes portant une hydroxylation en 3' et 4' possèdent une activité antioxydante significative (Aberoumand et Deokule, 2008). Une hydroxylation supplémentaire en 5' comme sur la myricétine augmentera cette activité comparativement à des composés comme la quercétine qui en sont dépourvus (figure 5) (Cai *et al.*, 2005). L'hydroxylation du noyau B joue donc un rôle important dans l'activité antioxydante des flavonoïdes (Cai *et al.*, 2005).

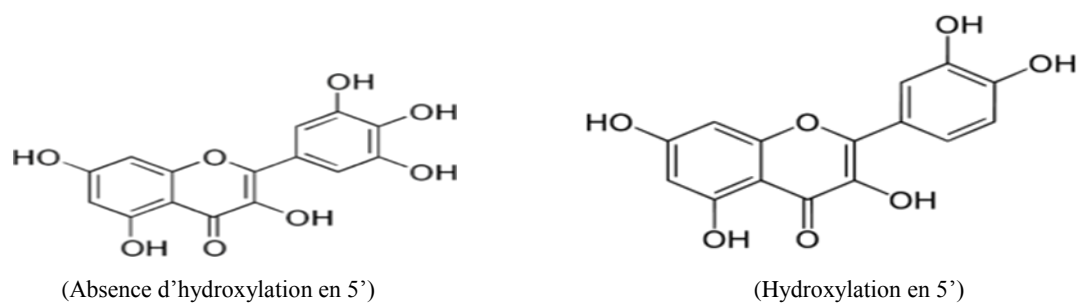


Figure 5 : Structure des groupements hydroxyles pour la myricétine et la quercétine respectivement (Cai *et al.*, 2005).

I.5.2. La double liaison C₂ et C₃ et la fonction 4-oxo

Une étude a montré que l'activité de la quercétine est deux fois plus élevée que celle de la catéchine. Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C₂-C₃ et une fonction 4-oxo (Atmani *et al.*, 2009).

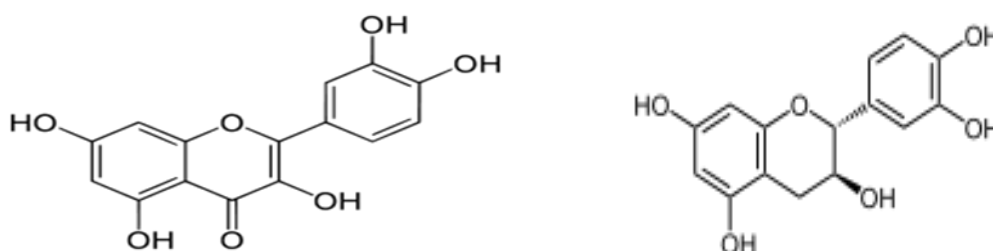


Figure 6 : Comparaison de la présence ou l'absence de la double liaison C₂ et C₃ et la fonction 4-oxo chez la quercétine et catéchine respectivement (Cai *et al.*, 2005).

I.5.3. Le degré de polymérisation

L'activité antioxydante des composés polymères (tannins) varie selon le degré de polymérisation. Les tannins condensés (Procyanodines) présentent d'une manière significative une plus grande propriété scavenging du radical superoxyde que les tannins trimères et tétramères (Heim *et al.*, 2002).

I.5.4. La glycosylation

La glycosylation en 3-OH des flavonoïdes par des mono- ou disaccharides réduit leur activité antioxydante comparativement à leurs aglycones, cela pourrait être dû au fait que la glycosylation peut réduire le nombre de groupes hydroxyles ou modifier la structure en bloquant ainsi l'accès du radical au site piègeur (**Atmani et al., 2009**), comme le rutoside un diglycoside de la quercétine (**Brewer, 2011**).

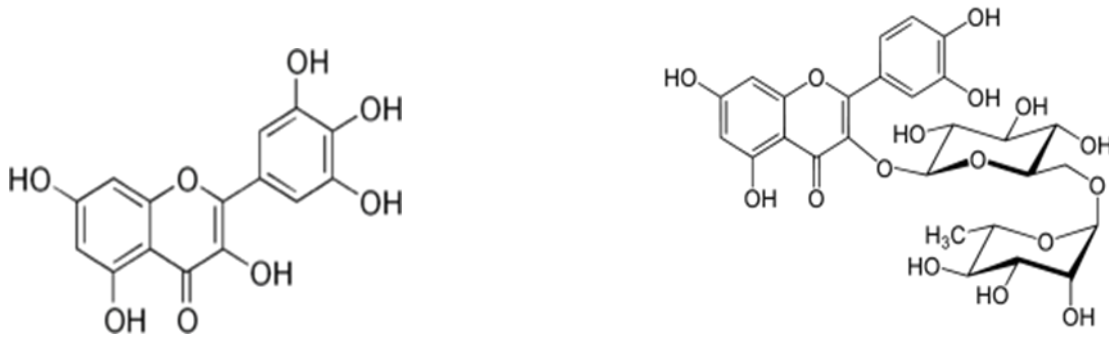


Figure 7 : Glycosylation de la quercétine en rutoside (**Brewer, 2011**).

I.5.5. L'O-méthylation

La suppression de l'activité antioxydante par O-méthelation peut refléter des effets stériques ce qui pourrait perturber la planarité structurelle des flavonoïdes. Il a été démontré qu'une substitution de groupes hydroxyle du cycle B par des groupes méthoxyles ($\text{CH}_3\text{O}-$) modifie le potentiel redox, ce qui affecte la capacité de piégeage (**Atmani et al., 2009**).

L'objectif de cette étude est de déterminé l'activité antioxydante de quelques molécules pures en utilisant quatre tests, le piégeage du radical monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$), le piégeage des deux radicaux synthétiques $\text{DPPH}\cdot$ et $\text{ABTS}^{\cdot+}$ et l'activité chélatrice des ions du fer.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Matériels divers

- ✓ Balance (RADWAG), Max = 220g, Min = 10mg ;
- ✓ Verre de montre, Spatule ;
- ✓ Bain marie (memmert), Thermomètre ;
- ✓ Spectrophotomètre à UV (UV-1800, SHIMADZU) ;
- ✓ Lecteur microplaque (Bio Tek Instruments, Inc);
- ✓ Etuve
- ✓ Vortex (VELP SCIENTIFICA) ;
- ✓ pH mètre (HANNA instrument) ;
- ✓ Béchers, Eprouvette graduée, Pipette graduée, Pipeteur, Erlenmeyer ;
- ✓ Eppendorf de 1000 μ l, Tubes à essais ;
- ✓ Pissette ;
- ✓ Micropipettes de 1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 20 μ l.
- ✓ Microplaques de 96 puits.

II.1.2. Produits chimiques

- ✓ Acide : Chlorure d'hydrogène (HCL) ;
- ✓ Base : Hydroxyde de sodium (NaOH) ;
- ✓ Sodium nitroprusside ;
- ✓ Sulfanilamide, NEDD: N-(1-Naphthyl) ethylnediamine dihydrochloride, ACS ;
- ✓ H₃PO₄ : Acide phosphorique ;
- ✓ NaCl (sodium chloride) ;
- ✓ KH₂PO₄ (potassium phosphate monobasic) ;
- ✓ K₂HPO₄ (di-potassium hydrogen phosphate anhydrous);
- ✓ Méthanol, Ethanol, Eau distillée ;
- ✓ ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), Persulfate de potassium ;
- ✓ DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) ;

- ✓ Standards (Acide tannique, acide cinnamique, acide gallique, acide caféique, acide ascorbique, quercétine, catéchine, Hydroxyanisole butylé : BHA, Ethylène Diamine Tétracétique : EDTA) ;
- ✓ Ferrozine, Chlorure de fer (FeCl_2).

II.1.3. Description des standards utilisés

a. Acide gallique

L'acide gallique est appelé également acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) (Figure 8). Ce composé organique aromatique appartient à la famille des acides phénoliques, il est largement distribué dans diverses plantes, fruits et aliments, où il est présent sous forme libre (Niemetz et Gross, 2005). Avec une structure cristalline, l'acide gallique est de couleur blanc jaunâtre pour une masse molaire de 188.14 g/mol (Polewski *et al.*, 2002).

L'acide gallique est considéré comme un antioxydant potentiel, il est ainsi utilisé comme additif dans les aliments (Polewski *et al.*, 2002).

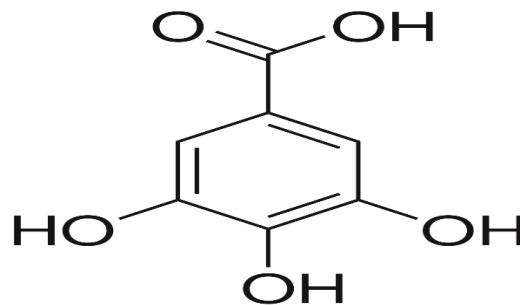


Figure 8 : Structure de l'acide gallique (Niemetz et Gross, 2005).

b. Quercétine

La quercétine est appelée aussi quercétol, appartient à la famille des flavonoïdes et de sous famille des flavonols de structure chimique ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) (Figure 9, annexe I) et d'une masse molaire 338.26g/mol. Ce composé est retrouvé en quantité raisonnable dans les plantes médicinales et l'alimentation quotidienne (pommes, oignons, le thé vert et les arachides) (Bukhari *et al.*, 2008).

La quercétine est fortement reconnue pour son forte activité antioxydante parmi plusieurs polyphénols grâce à sa structure chimique (Bukhari *et al.*, 2008).

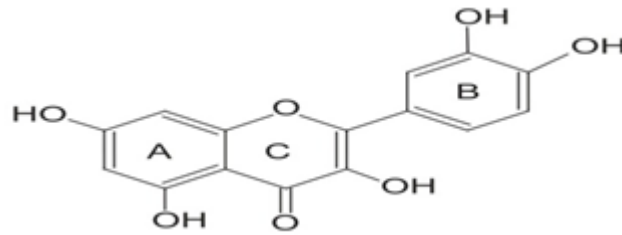


Figure 9 : Structure chimique de la quercétine (Bukhari *et al.*, 2008).

c. Catéchine

La catéchine est un composé de la famille des flavonoïdes de la sous classe des flavanols. Elle est aussi connue sous le nom de catéchol de formule brute ($C_{15}H_{14}O_6$) (Figure 10, annexe I), retrouvé principalement dans les plantes médicinales comme le thé vert (Zhao *et al.*, 2004).

La catéchine et ses nombreux isomères sont de puissants antioxydants qui aident à prévenir contre plusieurs maladies y compris les maladies inflammatoires (Zhao *et al.*, 2004).

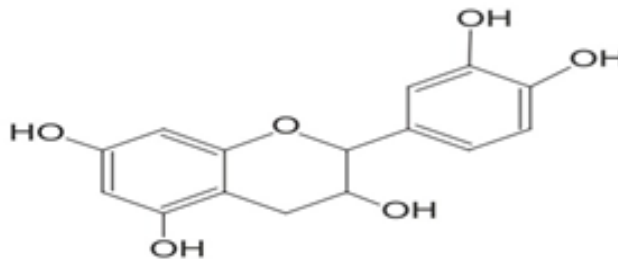


Figure 10 : Structure chimique de la catéchine (Zhao *et al.*, 2004).

d. Acide tannique

L'Acide tannique ou acide gallotannique est un polyphénol de la famille des tannins. Il est présent dans les noix de galle, l'écorce et d'autres parties des plantes (Popovici *et al.*, 2009).

La structure de l'acide tannique n'est pas bien établie (Figure 11) et elle peut contenir un nombre différent de groupements gallyol glycosylés et une structure de base ($C_{76}H_{52}O_{46}$) (Popovici *et al.*, 2009). Grâce à sa structure complexe, l'acide tannique a une activité antioxydante très puissante (Popovici *et al.*, 2009).

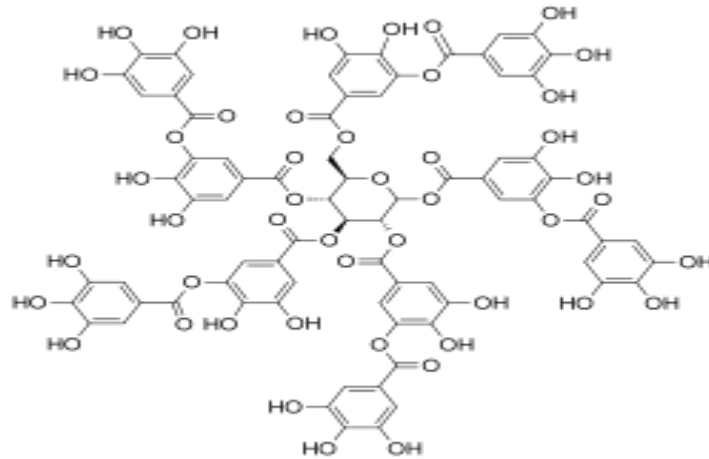


Figure 11 : Structure chimique de l'acide tannique (Popovici *et al.*, 2009).

e. Acide ascorbique

L'acide ascorbique possède plusieurs noms comme la Vitamine C, l'acide L-xyloascorbique. Il est présent dans les citrons, les jus de fruits et les légumes frais. Sa formule chimique est (C₆H₈O₆) (Figure 12) et de masse molaire égale à 176.13g/mol (Blokhina *et al.*, 2003)..

L'ascorbate (vitamine C) est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés très réactifs tels que les radicaux OH et peu réactif avec les radicaux O₂⁻ (Blokhina *et al.*, 2003).

L'acide ascorbique, a des effets synergiques avec les antioxydants et aident à prévenir l'oxydation lipidique (Blokhina *et al.*, 2003).

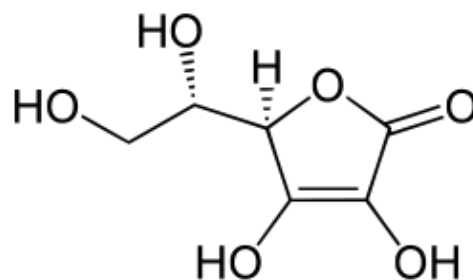


Figure 12 : Structure chimique de l'acide ascorbique (Gardèse *et al.*, 2003).

f. Acide cinnamique

L'acide cinnamique est un acide organique de formule moléculaire brute (C₉H₈O₂) (Figure 13) et d'un poids moléculaire de 141.16 g/mol, il est synthétisé par de nombreux

végétaux, particulièrement la cannelle. Il présente des propriétés antifongiques et antiseptiques (Pontiki *et al.*, 2014).

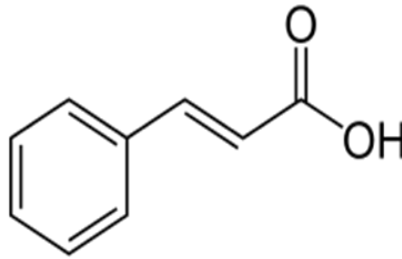


Figure 13 : Structure chimique de l'acide cinnamique (Pontiki *et al.*, 2014).

g. Acide caféique

L'acide caféique est un dérivé de l'acide cinnamique de structure chimique (C₉H₈O₄), (Figure 14), il est présent dans toutes les plantes. L'acide caféique comme tous les polyphénols, possède des groupement hydroxyle (-OH) capable de prévenir ou ralentir l'oxydation des lipide (Crozier *et al.*, 2006).

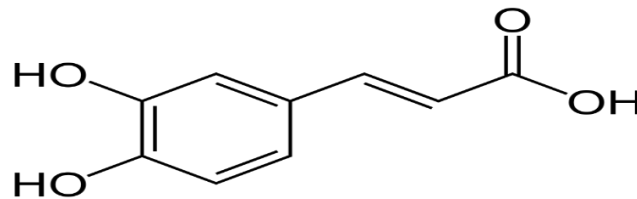


Figure 14 : Structure chimique d'acide caféique (Crozier *et al.*, 2006).

h. Hydroxyanisole butylé (BHA)

L'hydroxyanisole butylé ou BHA est un antioxydant synthétique principalement employé comme conservateur, à faible concentration, dans les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides contre l'oxydation (Carocho et Ferreira, 2013). Il a une structure chimique (C₁₁H₁₆O₂) (Figure 15) et une masse molaire 180.2435g/mol.

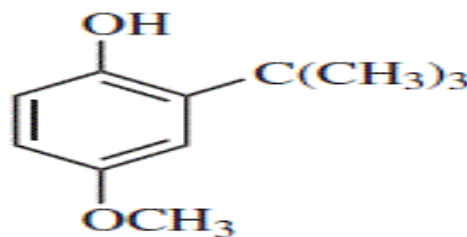


Figure 15 : Structure chimique de la BHA (Carocho et Ferreira, 2013).

i. Ethylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA)

L'EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique) ou acide éthylène diamine tétra-acétique est un agent chélateur d'ions métalliques de formule chimique ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) (Figure 16). Il possède des électrons non appariés lui permettant de former des complexes stables avec ces ions tels que le fer (Bazinet et Doyen, 2015).

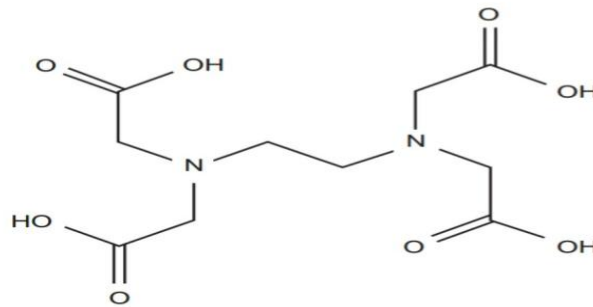


Figure 16 : Structure chimique d'EDTA (Bhavil *et al.*, 2011).

II.2. Méthodes

II.2.1. Activité scavenger du radical monoxyde d'azote ($NO\cdot$)

Le monoxyde d'azote est généré par la décomposition de sodium nitroprusside dans une solution à pH physiologique (7,4). Sous les conditions aérobiques, le $NO\cdot$ réagit avec l' O_2 et forme un produit stable (nitrate et nitrite). La concentration de nitrite dans une solution aqueuse est déterminée par la réaction des nitrites avec le réactif de Greiss. La mesure spectrophotométrie à 550 nm du produit formé permet de quantifier la quantité des nitrite en solution (Badami *et al.*, 2005).

- **Mode opératoire**

L'évaluation de l'activité antioxydant des molécules pures contre le radical $NO\cdot$ a été estimée selon la méthode de Marcocci *et al.*, 1994.

Ce test consiste à mélanger 1 ml de molécule pure (100 μ g/ml) dans des tubes à essai avec 1ml de la solution sodium nitroprusside (10mM) préparée dans un tampon pH = 7,4. Après incubation pendant 2h30 à 25°C, 1 ml de réactif de Greiss (Sulfanilamide, N-(1-Naphthyl) ethylndiamine dihydrochloride) a été additionné puis l'absorbance a été mesurée au spectrophotomètre à 550nm.

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical $\text{NO}\cdot$ pour chaque standard est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité scavenging de } \text{NO}\cdot = (A_{\text{Cont}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{Cont}} \times 100$$

A_{Cont} : Absorbance de contrôle.

A_{test} : Absorbance en présence de molécules pures.

Tous les tests ont été réalisés trois fois et les résultats sont exprimés par la moyenne des trois essais plus ou moins l'écart type.

II.2.2. Activité scaveger du radical cationique $\text{ABTS}^{\cdot+}$

Le radical cationique $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) est un radical synthétique de couleur bleu, il réagit avec des antioxydants qui peuvent céder un électron et/ou un atome d'hydrogène (Erel *et al.*, 2004).

- **Principe**

La méthode ABTS est basée sur la génération du radical cationique $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) par l'oxydation de l'ABTS avec le persulfate de potassium, formant un chromophore bleu/vert (Figure 17) qui absorbe à 630 nm. L'ajout d'un antioxydant va réduire l' $\text{ABTS}^{\cdot+}$ et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical cationique est proportionnelle à la concentration en antioxydants (Erel *et al.*, 2004).

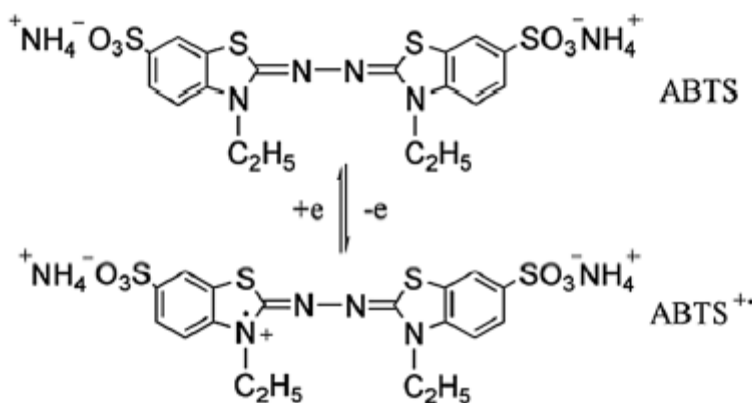


Figure 17 : Forme oxydée et réduite de l'ABTS (Huang *et al.*, 2005).

- **Mode opératoire**

L'évaluation de l'activité antioxydante des molécules pures contre le radical ABTS^{•+} a été réalisée sur microplaques selon la méthode de **Ayouni *et al.*, 2016**.

L'ABTS (7 mM) est mélangé avec une solution de persulfate de potassium (2,45 mM). Après incubation de ce mélange à l'obscurité pendant 16h et à température ambiante, la solution d'ABTS^{•+} obtenue est ensuite diluée jusqu'à obtention d'une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 630 nm. Un volume de 20 μ l de molécules pures est additionné à 180 μ l de la solution d'ABTS^{•+}.

L'absorbance est mesurée au lecteur microplaque à 630 nm après 6min d'incubation. Le pourcentage de l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} pour chaque molécule pure est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité scavenging de ABTS}^{\bullet+} = (A_{\text{Cont}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{Cont}} \times 100$$

A_{Cont} : Absorbance d'ABTS + Méthanol.

A_{test} : Absorbance d'ABTS + Molécule pure.

Tous les tests ont été réalisés trois fois et les résultats sont exprimés par la moyenne des trois essais plus ou moins l'écart type.

II.2.3. Activité scavenger du radical DPPH[•]

La méthode de DPPH a d'abord été décrite par **Marsden Blois en 1958**, et a ensuite été largement modifiée par de nombreux chercheurs. Le DPPH[•] (1,1-diphényl -2-picrylhydrazyle) (C₁₈H₁₂N₅O₆ ; M= 394,33g/mole) est un radical libre synthétique de couleur violette qui réagit avec des composés qui peuvent donner un atome d'hydrogène (**Sagar *et al.*, 2011**).

- **Principe**

Le radicale DPPH[•] possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette méthode est basée sur le principe que le DPPH[•] accepte un atome d'hydrogène (H) à partir d'une molécule scavenger (Figure 18), résultant une réduction du DPPH[•] en DPPH₂ (changement de la couleur violette en jaune), avec une diminution de l'absorbance à 515nm.

Le degré de changement de la couleur est proportionnel à la concentration et à la puissance des antioxydants (Popovici *et al.*, 2009).

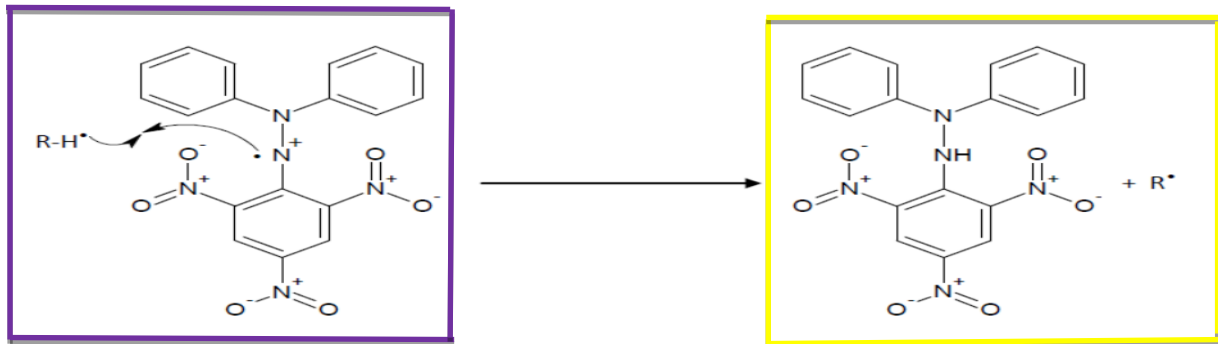


Figure 18 : Le radical DPPH• et sa forme stable (Sagar *et al.*, 2011).

- **Mode opératoire**

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'effet scavenger des molécules pures contre le radical DPPH• est celle de Ayouni *et al.*, 2016.

20 µl de chaque molécule pure sont additionné à 180 µl de la solution DPPH• dans des microplaques à 96 puits. Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes, l'absorbance est calculée par lecteur de microplaque à 480 nm. Chaque test est fait en trois répliques ainsi un pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH• est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'activité scavenging de DPPH} \cdot = (A_{\text{Cont}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{Cont}} \times 100$$

A_{Cont} : Absorbance de DPPH + Méthanol.

A_{test} : Absorbance de DPPH + Molécule pure.

Tous les tests ont été réalisés trois fois et les résultats sont exprimés par la moyenne des trois essais plus ou moins l'écart type.

II.2.4. Activité chélatrice du fer

- **Principe**

L'activité chélatrice du fer ferreux par les molécules pures est déterminée par la méthode décrite par Sharma et Singh (2012), qui consiste à suivre l'inhibition de la formation du complexe fer ferrozine de couleur violette qui présente un maximum d'absorption à 562 nm. Cependant, en présence d'agent chélateurs, la formation de complexe

est perturbé ce qui entraîne une diminution de la couleur. La mesure de la diminution de la couleur permet d'estimer l'activité de la chélation du fer (Sharma et Singh, 2012).

- **Mode opératoire**

Un volume de 0,5 ml de molécule pure est additionné à 0,05 ml de FeCl₂ (2 Mm) et 1,6 ml d'eau distillée. Après 30 secondes, 0,1 ml de ferrozine (5 Mm) sont ajoutés au mélange. L'absorbance est mesurée à 562 nm après 10 minutes d'incubation à température ambiante. Le pourcentage d'inhibition de la formation du complexe ferrozine-Fe²⁺ est calculé selon la formule suivante :

Les résultats sont exprimés en pourcentage selon la formule suivante

$$\% \text{ de chélation du fer} = (A_{\text{Cont}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{Cont}} \times 100$$

A_{Cont}: Absorbance de la solution sans molécule pure.

A_{test}: Absorbance de la solution contenant la molécule pure.

Tous les tests ont été réalisés trois fois et les résultats sont exprimés par la moyenne des trois essais plus ou moins l'écart type.

II.3. Détermination des concentrations inhibitrices (IC₅₀)

Après avoir testé toutes les molécules pures sélectionnées pour cette étude à une concentration de 100 µg/ml pour chaque activité anti-radicalaire à savoir anti- monoxyde d'azote, anti-ABTS⁺, anti-DPPH, et activité réduction du fer, des dilutions des molécules pures ont été effectuées dans le but de déterminer les concentrations d'inhibitions 50 (IC₅₀) pour tous les tests antioxydants appliqués à l'exception de test de monoxyde d'azote NO.

Par définition la valeur IC₅₀ est la concentration de la molécule pure qui peut réduire 50% un radical (Molyneux, 2004). Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des molécules testées à l'aide du logiciel « Graph Pad Prism 5 ».

II.4. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats a été réalisée avec l'application de logiciel « Graph Pad Prism 5 », en effectuant le test one way ANOVA, suivi par le test Dunett. Les différences

sont considérées significatives pour $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***). Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ($n = 3$).

III. Résultats et discussions

III.1. Evaluation de l'effet Anti-radicalaire

III.1.1. Evaluation de l'effet anti-radicalaire contre le radical monoxyde d'azote à 100 µg/ml

L'activité scavenging du radical monoxyde d'azote (NO \cdot) de différentes molécules pures à 100 µg/ml est illustrée dans la figure suivante :

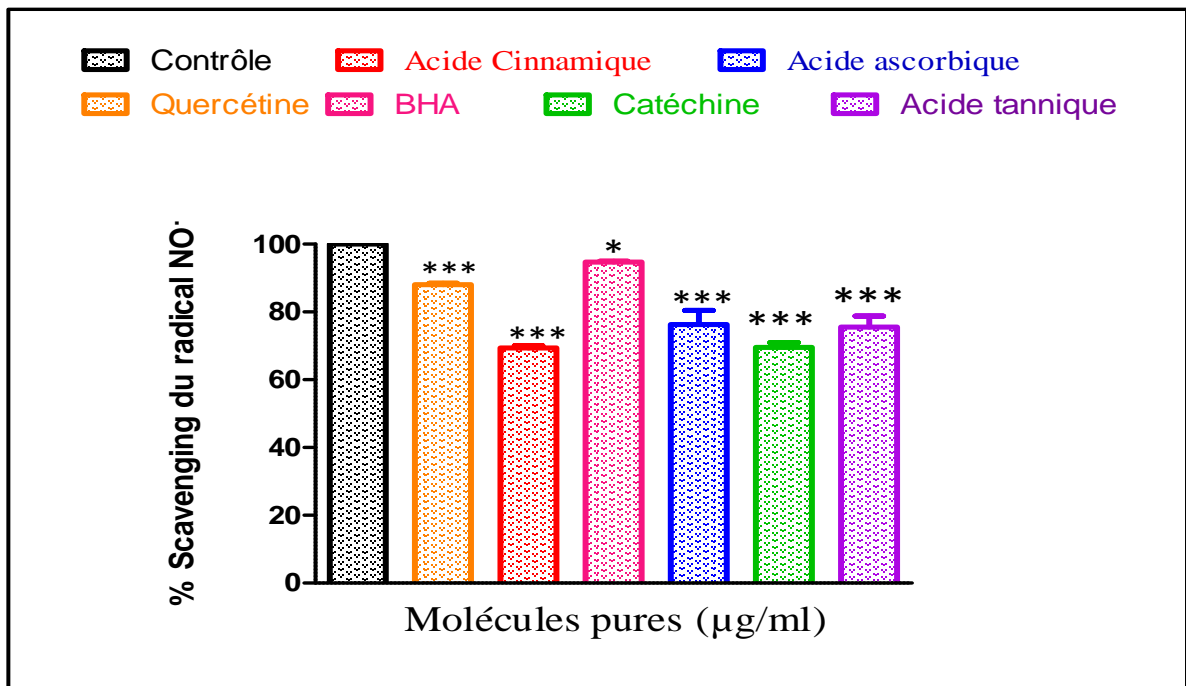


Figure 19 : L'effet anti-radicalaire contre le monoxyde d'azote des molécules pures à 100 µg/ml. Les données sont représentées en moyenne \pm ET, pour n=3 ; * P<0,05 différence significative, ** P<0,001 différence hautement significative, *** P<0,0001 différence très hautement significative par rapport au contrôle.

La figure 19 montre que toutes les molécules pures testées dans notre étude, présentent un bon effet scavenger contre le radical monoxyde d'azote (NO \cdot) avec un pourcentage d'inhibition supérieur ou égale à 70% à une concentration de 100 µg/ml.

D'après l'analyse statistique des résultats, une différence hautement significative ($p < 0,001$) a été notée entre les activités de toutes les molécules pures à savoir, l'acide cinnamique $69,37 \pm 0,64\%$, la catéchine $69,55 \pm 1,36\%$, la quercétine $88,05 \pm 0,35\%$, l'acide ascorbique $76,29 \pm 4,12\%$ et l'acide tannique $75,58 \pm 3,21\%$ par rapport au control, sauf la molécule

antioxydant synthétique (BHA) qui exhibe une différence significative ($p < 0,05$) avec un pourcentage d'inhibition de $94,74 \pm 0,2\%$.

Plusieurs études ont été réalisées sur la relation activité-structure des différentes classes de composés phénoliques (Pietta, 2000 ; Cai *et al.*, 2005). En effet, Atmani et ses collaborateurs (2009), ont rapporté l'effet des différentes substitutions de structure de base des flavonoïdes sur la relation de l'activité scavenging du radical $\text{NO}\cdot$ (Tableau I).

Tableau I : Modèles de substitution de la série de quelques flavonoïdes testés pour leur activité antioxydante (Atmani *et al.*, 2009).

Molécules pures	R3	R5	R7	R8	R'2	R'3	R'4	C ₂ =C ₃	%
Quercétine	OH	OH	OH	H	H	OH	OH	+	88
Catéchine	OH	OH	OH	H	H	OH	OH	-	69

La quercétine (flavonol), la catéchine (flavane-3-ols), dont la configuration des groupements hydroxyles est identique, montrent un bon pouvoir scavenger du radical $\text{NO}\cdot$ avec un pourcentage de $88,05 \pm 0,35\%$ et $69,55 \pm 1,36\%$ respectivement, avec une légère différence. Où, l'activité scavenging du $\text{NO}\cdot$ notée par la catéchine est inférieure à celle exhibée par la quercétine. Cette différence est probable due à la présence d'une double liaison C₂-C₃ et d'une fonction 4-oxo au niveau de la structure de la quercétine (Atmani *et al.*, 2009) permettant au radical de s'additionner et d'être piégé, alors que la catéchine est dépourvue de ces deux caractères structuraux (Gilbert et Colton, 1999). Heime et ses collaborateurs (2002), ont confirmé l'importance de cette configuration dans le piégeage du radical libre $\text{NO}\cdot$ (Heim *et al.*, 2002).

D'autre part, les acides phénoliques se sont avérés de bons scavengers du radical monoxyde d'azote, ceci est dû à la grande capacité des groupements hydroxyles présents au niveau de leur structure à donner un atome d'hydrogène pour piéger le radical $\text{NO}\cdot$ (Atmani *et al.*, 2009).

De même, la molécule pure synthétique (BHA) révèle un bon pourcentage d'inhibition $94,74 \pm 0,2\%$ grâce à la présence et la position du groupement hydroxyle dans sa structure.

L'acide cinnamique étant pauvre en groupements hydroxyles, un mécanisme probable de son l'effet scavenger de radical $\text{NO}\cdot$ peut-être expliqué par la présence de groupement aryloxy capable de céder un électron (Cai *et al.*, 2005).

III.2. Evaluation de l'effet Anti-radicalaire contre le radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$

III.2.1. Activité anti-radicalaire contre le radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ à 100 $\mu\text{g/ml}$

L'activité scavenger du radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ de différentes molécules pures a été testée à une concentration de 100 $\mu\text{l/ml}$ (figure 20).

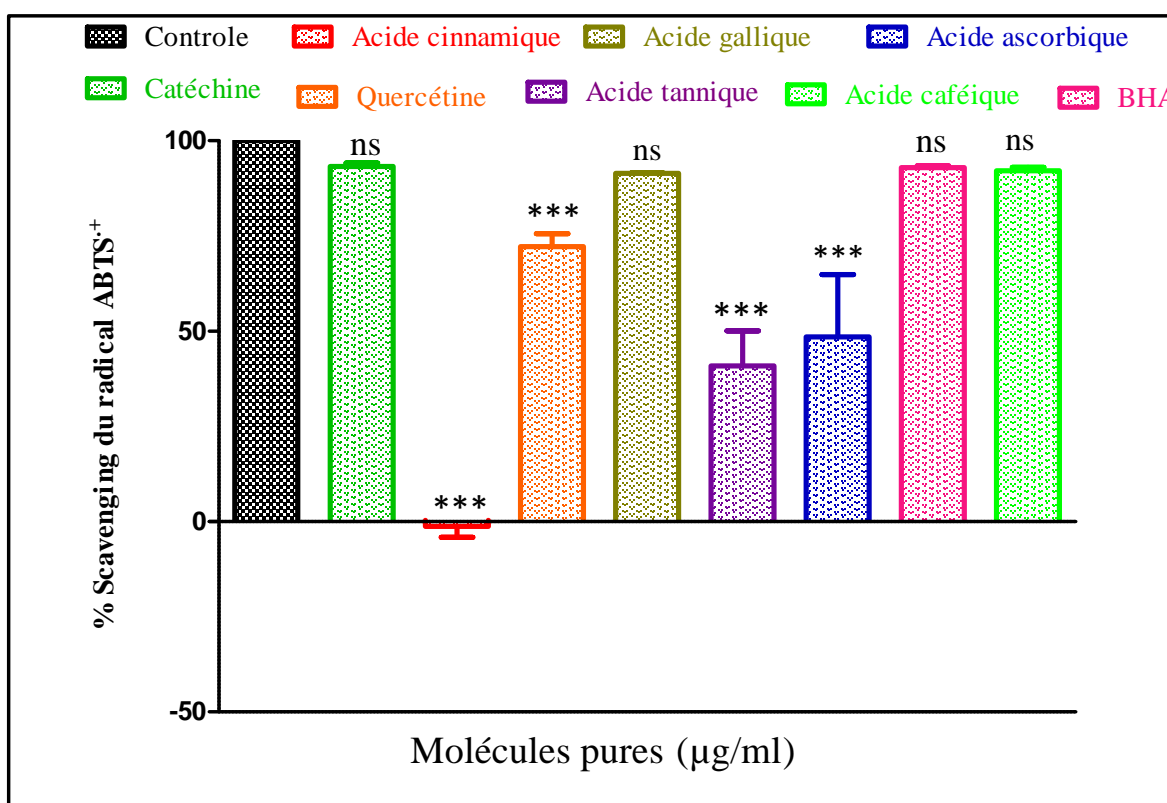


Figure 20 : Activité scavenging des différentes molécules pures sur le radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ à la concentration 100 $\mu\text{g/ml}$. Les données sont représentées en moyenne \pm ET, pour $n=3$; * $P<0,05$ différence significative, ** $P<0,001$ différence hautement significative, *** $P<0,0001$ différence très hautement significative par rapport au contrôle.

D'après les résultats illustrés dans la figure précédente, une bonne activité anti-radicalaire contre le radical cationique $\text{ABTS}^{\cdot+}$ à une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ a été exhibée par la catéchine, l'acide gallique, l'acide caféique et la BHA avec des valeurs de $93,24 \pm 0,91\%$, $91,39 \pm 0,21\%$, $92,1 \pm 0,89\%$, $92,96 \pm 0,41\%$ respectivement, avec une différence non significative par rapport au contrôle.

D'autre part, les autres molécules exhibent une différence hautement significative ($p < 0,001$) par rapport au contrôle. Où, des pourcentages d'inhibition de radical cationique $ABTS^{\cdot+}$: $72,2 \pm 3,39\%$, $40,82 \pm 9,23\%$, $48,5 \pm 16,32\%$ et $-1,3 \pm 2,86\%$ ont été notés pour la quercétine, l'acide tannique, l'acide ascorbique et l'acide cinnamique respectivement.

III.2.2. Activité anti-radicalaire contre le radical $ABTS^{\cdot+}$ à différentes concentrations

En faisant varier la concentration des molécules pures, nous avons établi le profil de variation d'activité anti radicalaire présenté dans la figure suivante, ainsi des valeurs d' IC_{50} ont été calculées, correspondantes à la concentration d'inhibiteur nécessaire pour piéger 50% du taux des radicaux libre (Molyneux, 2004).

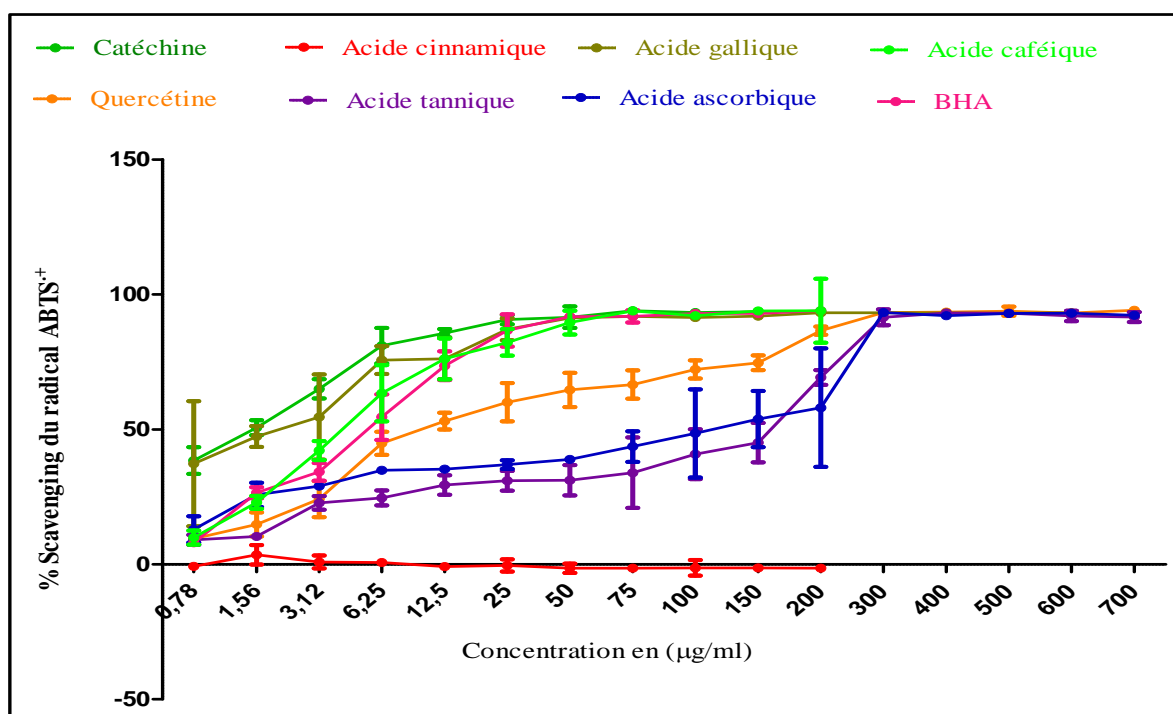


Figure 21 : Activité anti-radicalaire contre le radical $ABTS^{\cdot+}$ de quelques molécules pures à différentes concentration.

D'après la figure 21, le pourcentage de l'activité scavenging du radical $ABTS^{\cdot+}$ est proportionnel à la concentration de molécules pures, ainsi, le profil de variation de l'activité obtenu est dose dépendante, à l'exception de l'acide cinnamique qui ne marque aucune activité. L'absence de l'activité scavenging du radical $ABTS^{\cdot+}$ par l'acide cinnamique est due probablement à l'absence des groupements hydroxyles OH du cycle aromatique dans sa structure (Cai *et al.*, 2005).

La catéchine et l'acide gallique ont montré un pouvoir scavenger plus important par rapport à celui des autres molécules testées. A une concentration de 0,78 µg/ml, ils ont atteint un pourcentage d'inhibition égale à $38,44 \pm 4,94\%$; $37,25 \pm 23,16\%$ respectivement, alors que les autres molécules à la même concentration, ils ne présentent qu'une activité équivalente à 10%.

A une concentration de 25 µg/ml, l'activité scavenger du radical ABTS^{•+}, de toutes les molécules pures testées augmente au fur et à mesure que la concentration augmente pour atteindre un pourcentage d'inhibition égale à 90% , à l'exception de l'acide ascorbique, l'acide tannique et la quercétine qui présentent un pouvoir scavenger supérieur à 90% à une concentration de 300 µg/ml.

A partir de la concentration de 300µg/ml jusqu'à 700µg/ml, un profil de variation de l'activité est caractérisé par un plateau, signifiant une saturation et une réduction presque totale du radical cationique ABTS^{•+}.

Les valeurs d'IC₅₀ ainsi calculées, expliquent fortement le comportement des molécules pures testées vis-à-vis du radical ABTS^{•+}. Où des valeurs inférieures ou égales à 17 µg/ml ont été exhibées. En effet, la catéchine représente un IC₅₀ de 0,487 µg/ml, l'acide caféique 2,463 µg/ml, l'acide gallique 3,075 µg/ml, BHA 3,991 µg/ml et la quercétine 17,09 µg/ml. Par ailleurs, l'acide ascorbique et l'acide tannique expriment des IC₅₀ les plus élevées 306,6 et 278,8 respectivement. Manifestant ainsi leur faible effet scanevger de radical cationique ABTS^{•+}.

Tableau II : Les IC₅₀ de différentes molécules pures testées contre le radical cationique ABTS^{•+}.

Les molécules pures	La valeur d'IC ₅₀ (µg/ml)
Catéchine	0,487
Quercétine	17,09
BHA	3,991
Acide Ascorbique	306,6
Acide Tannique	278,8
Acide Gallique	3,075
Acide Caféique	2,463

A partir de ces résultats on constate que l'effet piègeur du radical ABTS^{•+} par les molécules pures reste notable même à faibles concentrations, ce qui peut être dû à l'importance de leur nature chimique comme rapporté par **Campos et Lissi (1999)**.

En effet, les flavonoïdes (quercétine et catéchine), montrent de faibles valeurs d'IC₅₀ en raison de leurs structures chimiques qui présentent d'une part, une configuration hydroxyles identique permettent au radical ABTS^{•+} d'arracher des hydrogènes pour se stabiliser, d'autre part, un groupement catéchol qui peut céder des électrons et/ou hydrogènes (**Pietta, 2000**).

Selon Heim *et al* 2002 et Atmani *et al* 2009, l'activité anti-radicalaire des acides phénoliques est due probablement au différentes critères à savoir, leur richesse en groupements hydroxyles, la présence des groupements galyoles (présent au niveau des acides galliques et tanniques), ainsi que le degré de polymérisation (**Heim et al., 2002 ; Atmani et al., 2009**).

La molécule synthétique (BHA) exhibe une faible valeur d'IC₅₀ ce qui indique son bon pouvoir scavenger contre le radical ABTS^{•+} expliqué par la présence et la position du groupement hydroxyle au niveau de sa structure (**Carocho et Ferreira, 2013**).

III.3. Evaluation de l'effet Anti-radicalaire contre le radical DPPH•

III.3.1. Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH• à 100µg/ml

L'activité anti-radicalaire contre le radicale DPPH• des molécules pures a été évaluée par la méthode décrite par **Ayouni et al., 2016**. Les absorbances notées ont permis de tracer l'histogramme suivant à l'aide d'un logiciel 'Graph Pad Pri

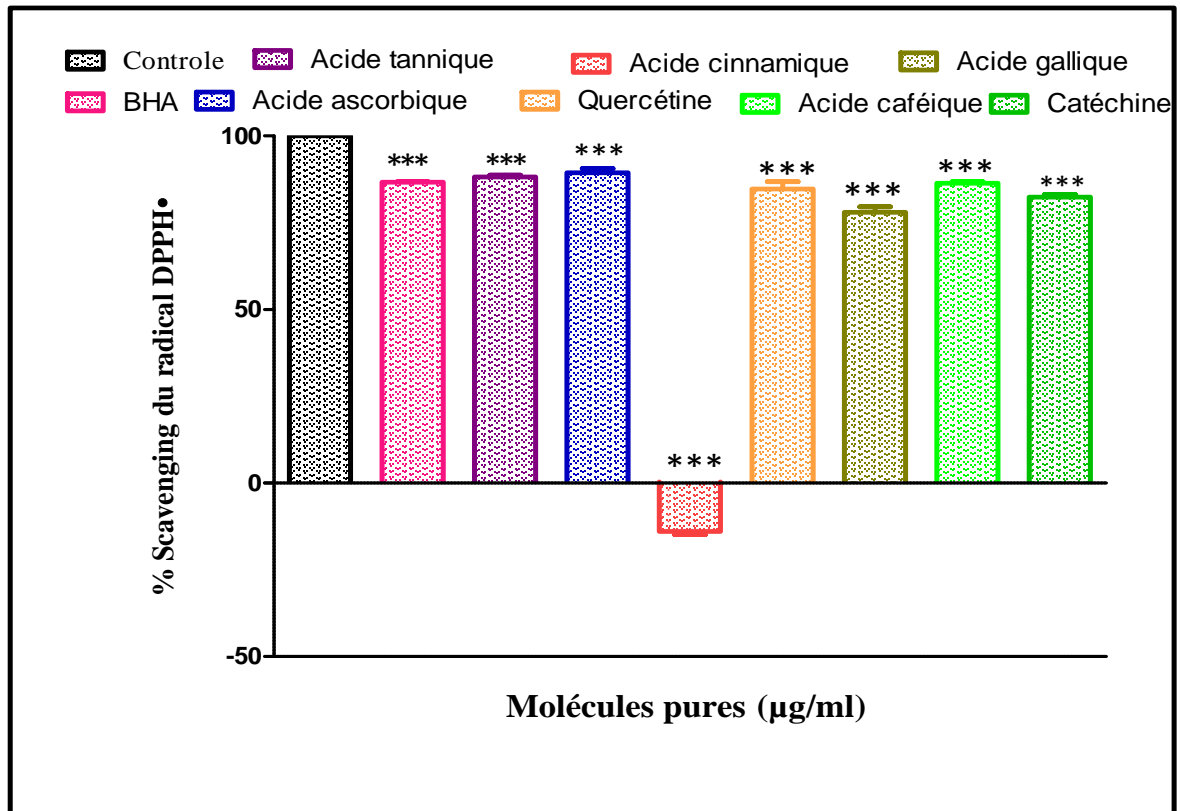


Figure 22 : Effets scavenger contre le radical DPPH• des molécules pures à une concentration de 100 µg/ml. Les données sont représentées en moyenne \pm ET, pour n=3 ; * P<0,05 différence significative, **P<0,001 différence hautement significative, *** P<0,0001 différence très hautement significative par rapport au contrôle.

Selon la figure 22, l'analyse statistique montre une différence hautement significative (P<0,001) entre les effets scavenger contre le radical DPPH• exhibés par les molécules pures en les comparant au contrôle.

En effet, les flavonoïdes testés ont enregistré des pourcentages d'inhibitions de $84,72 \pm 2,1\%$ pour la quercétine, $82,39 \pm 0,75\%$ pour la catéchine.

Pour les acides phénoliques, des activités anti-radicalaires contre le DPPH• ont été notées pour l'acide tannique, l'acide gallique et l'acide caféique avec les valeurs respectives $88,17 \pm 0,53\%$, $77,96 \pm 1,58\%$ et $86,33 \pm 0,47\%$. Alors que la BHA et l'acide ascorbique, notent des valeurs de $86,69 \pm 0,11\%$ et $89,38 \pm 1,25\%$ respectivement.

Dans le but d'exprimer les résultats en termes d'IC₅₀, les molécules pures ont été testées à différentes concentrations.

III.3.2. Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH \cdot à différentes concentrations

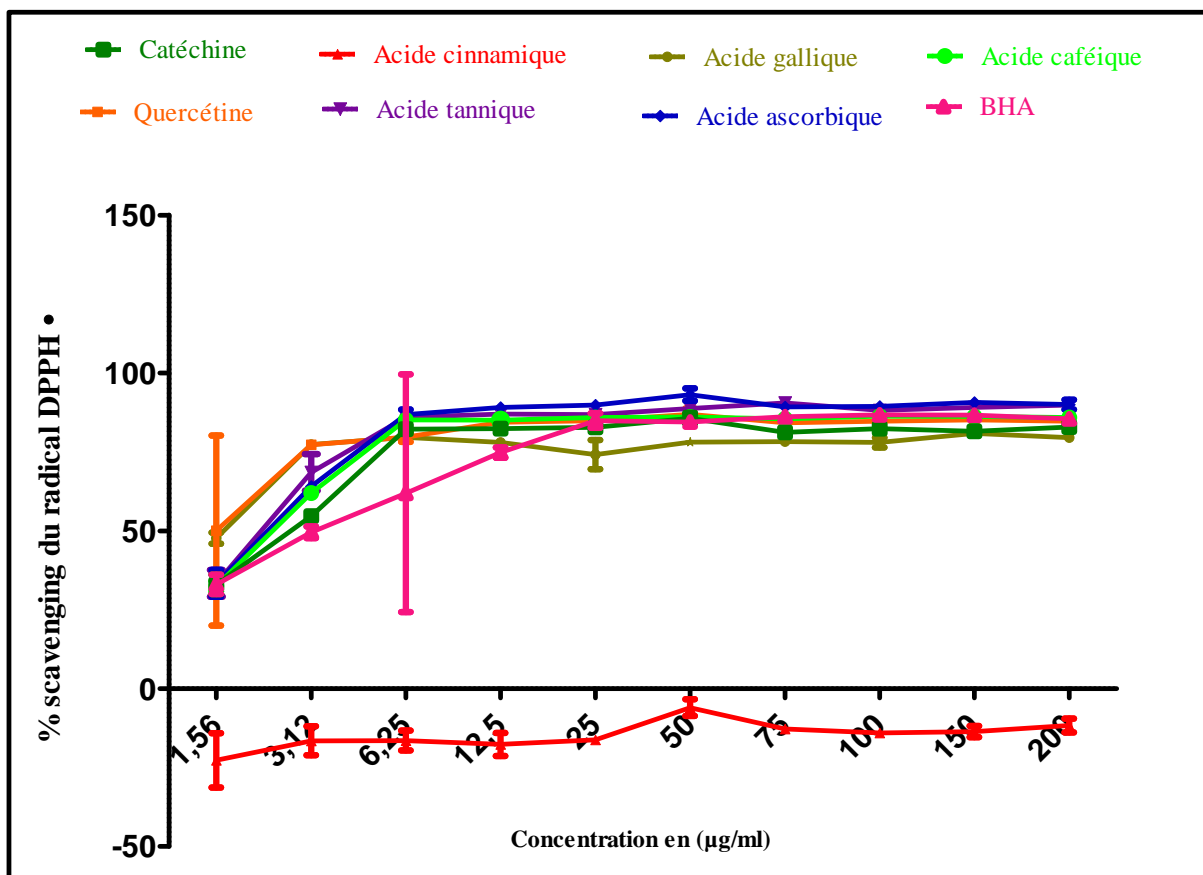


Figure 23 : Effets scavenger contre le radical DPPH \cdot des molécules pures à différentes concentrations.

D'après les résultats représentés de la figure 23, l'effet piègeur du radical DPPH \cdot par les molécules pures (la quercétine, BHA, catéchine, acide caféique, acide ascorbique, acide gallique et acide tannique) présentent un pourcentage d'inhibition proportionnel à la concentration, à l'exception de l'acide cinnamique qui ne présente aucune activité anti-radical DPPH \cdot .

L'absence de l'activité scavenging du radical DPPH \cdot par l'acide cinnamique est expliquée selon Cai *et al* 2005, par l'absence des groupements OH du cycle aromatique dans sa structure (Cai *et al.*, 2005). En plus, il a été rapporté que le nombre des groupements OH, la fonction 4-oxo conjuguais à la double liaison C₂-C₃ et le degré de polymérisation sont importants dans l'activité scavenging (Dasmalchi *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008 ; Atmani *et al.*, 2009).

L'acide gallique et la quercétine ont montré un profil de variation de l'activité scavenger plus marqué par rapport aux autres molécules (le BHA, catéchine, acide caféique, acide ascorbique et l'acide tannique). Où, à une concentration de 1,56 µg/ml, ils ont atteint un pourcentage d'inhibition égale à $47,68 \pm 1,78\%$ et $50,07 \pm 30,07\%$ respectivement, alors que les autres molécules à la même concentration présentent un pourcentage d'activité scavenging équivalent à 30%.

Toutes les molécules pures testées présentent une activité scavenging maximale à la concentration de 6,25 µg/ml, à l'exception de la BHA. Cette phase d'évolution brutale de l'activité est suivie d'une phase stationnaire qui signifie une réduction presque totale du radical DPPH· en sa forme non radicalaire DPPH-H, exhibant ainsi les valeurs des **IC₅₀**, présentées dans le tableau suivant

Tableau III : Les **IC₅₀** du radical DPPH· de différentes molécules pures testées.

Les molécules pures	La valeur d'IC ₅₀ (µg/ml)
Catéchine	0,0002231
Quercétine	$7,432 \cdot 10^{-5}$
BHA	2,145
Acide Ascorbique	0,0001086
Acide Tannique	$7,598 \cdot 10^{-5}$
Acide Gallique	0,0002393
Acide Caféique	9,945

Les résultats obtenus (tableau III) montrent que le pouvoir scavenger le plus élevé est celui de la quercétine et l'acide tannique, avec les **IC₅₀** les plus faibles ($7,432 \cdot 10^{-5}$; $7,598 \cdot 10^{-5}$ µg/ml, respectivement), suivies par celles de la catéchine, l'acide ascorbique et l'acide gallique (**IC₅₀**: $2 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$ µg/ml, respectivement). Alors que la BHA et l'acide caféique notent des valeurs d'**IC₅₀** les plus élevées de 2,145 et 9,945 µg/ml respectivement.

D'après nos résultats la quercétine a une activité scavenging deux fois plus élevée que celle de la catéchine, le même résultat a été rapporté par **Heim et al., 2002**. Ceci est probablement dû au fait que la quercétine possède une double liaison C₂-C₃ et une fonction 4-oxo (**Atmani et al., 2009**) permettant au radical d'être piégé par cette molécule, alors que la catéchine est dépourvue de ces deux caractères structuraux (**Heim et al., 2002**).

En comparant aux autres acides phénoliques, l'acide tannique possède une valeur d'IC₅₀ faible, en raison de la présence de la structure pyrogallyol lui permettant de céder des atomes d'hydrogènes pour piéger le radical DPPH[•], en plus de sa richesse en groupements hydroxyles (Popovici *et al.*, 2009).

III.4. Chélation du fer

III.4.1. Chélation du fer à une concentration de 100µg/ml

Les chélateurs forment des composés de coordination avec les métaux en inhibant ainsi le cycle redox du métal ou forment des complexes métalliques insolubles (Yuanzhen et Minhquan, 2015).

La capacité des molécules pures à chélater les ions ferreux est présentée dans la figure suivante :

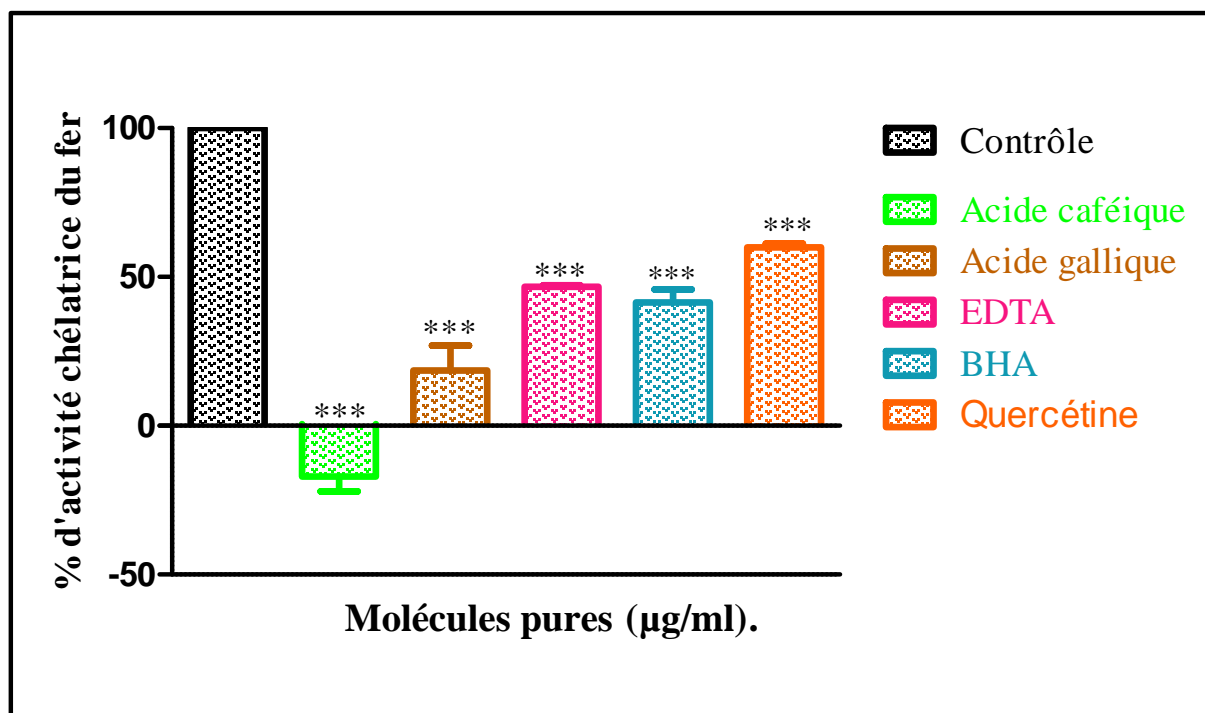


Figure 24 : Activité chélatrice du fer des molécules pures à une concentration de 100 µg/ml. Les données sont représentées en moyenne ± ET, pour n=3 ; * P<0,05 différence significative, ** P<0,001 différence hautement significative, *** P<0,0001 différence très hautement significative par rapport au contrôle.

L'analyse statistique montre que toutes les molécules pures testées présentent une différence hautement significative ($p < 0,001$) par rapport au contrôle. L'acide caféïque et l'acide gallique, présentent des activités chélatrices du fer de $-17,1 \pm 5,01\%$ et de $18,53 \pm 8,31\%$, respectivement.

Alors que toutes les autres molécules, ont enregistré des activités chélatrice du fer proches de 50% (la quercétine $59,96 \pm 1,23\%$, EDTA $46,71 \pm 0,48\%$ et la BHA $41,38 \pm 4,44\%$).

III.4.2. Chélation du fer à différentes concentrations

L'activité chélatrice du fer obtenue par les molécules pures à 100 $\mu\text{g/ml}$ nous a incités à les tester à différentes dilutions dans le but de déterminer leurs IC_{50} mais aussi de voir leurs comportements vis-à-vis de cette activité à différentes concentrations.

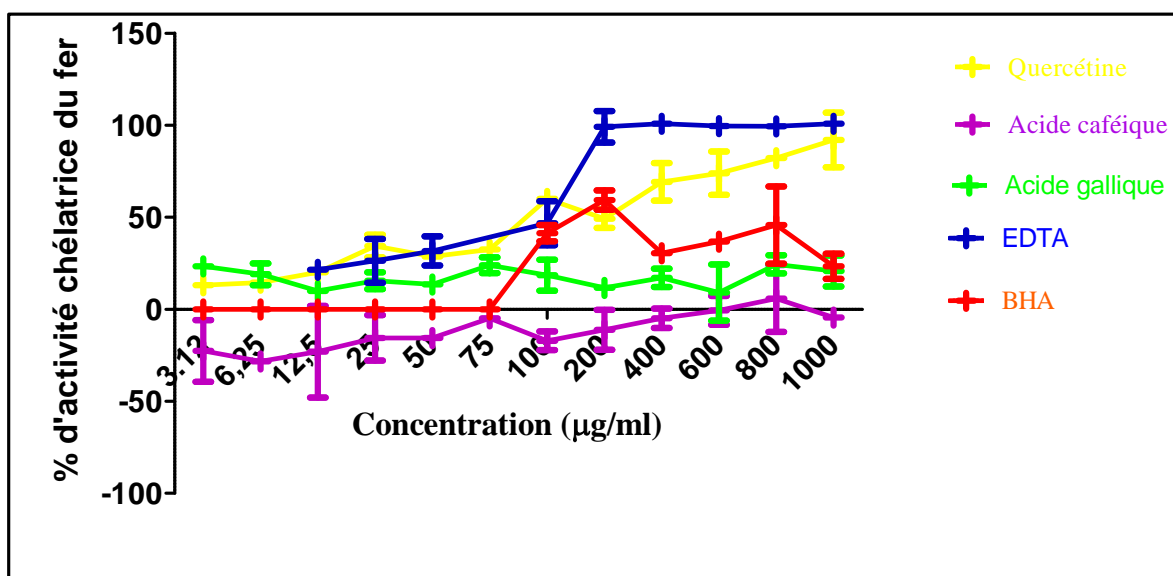


Figure 25 : Activité chélatrice du fer des molécules pures à différentes concentrations.

D'après la figure 25, on remarque que la quercétine et l'EDTA ont le même profil de variation, où l'activité chélatrice du fer est proportionnelle à la concentration. Il est à noter que l'EDTA expose deux phases le long des concentrations appliquées, l'une qui marque une évolution brutale dans l'activité chélatrice de 3,12 $\mu\text{g/ml}$ jusqu'à 200 $\mu\text{g/ml}$ et l'autre par une stabilité de cette dernière de 200 $\mu\text{g/ml}$ à 1000 $\mu\text{g/ml}$. En effet, entre 200 $\mu\text{g/ml}$ et 1000 $\mu\text{g/ml}$, le pourcentage d'inhibition du complexe ferrozine- Fe^{2+} par l'EDTA atteint le maximum avec une valeur $100 \pm 1,44\%$. Ceci est probablement dû à la structure chimique de la molécule qui comporte des électrons non appariés lui permettant de former des complexes stables avec les ions du fer (Hudson, 1990 ; Bazinet et Doyen, 2015).

Toutefois, la quercétine enregistre un effet chélateur dose dépendant (figure 25), avec l'absence d'une phase stationnaire, où l'augmentation de son activité a été notée jusqu'à la dernière concentration testée avec un pourcentage de $91,99 \pm 14,88\%$.

Acker et ses collaborateurs ont effectué une étude détaillée sur la capacité de chélation des flavonoïdes par des ions de fer, d'après où ils ont rapporté que tous les flavonoïdes possédant à la fois des groupements catéchols (cycle B) et 3-hydroxyl, ainsi qu'une double liaison C₂-C₃ ont une très bonne activité chélatrice du fer (Acker *et al.*, 1998).

La BHA avec une activité chélatrice de $59,04 \pm 5,28\%$ présente un taux moindre en le comparant au contrôle un résultat similaire a été rapporté par Geckil et ses collaborateurs (2005).

L'acide gallique exhibe une faible activité chélatrice du fer environ 23% aux différentes concentrations utilisées dans ce test. Il apparait que les groupements gallyols seuls sont peu capables de chélater les métaux et leurs présence réduit la capacité à fixer le métal (Andjelkovic *et al.*, 2006). Une étude faite sur les acide phénolique révèle que tous les composants dépourvus de groupement gallyols ou catéchol n'ont montré aucune activité chélatrice (Andjelkovic *et al.*, 2005).

Tableau IV : Les IC₅₀ de la chélation du fer des différentes molécules pures testées.

Les molécules pures	La valeur d'IC ₅₀ (µg/ml)
Quercétine	193,3
BHA	102,89
EDTA	70,89

D'après les résultats montrés dans le tableau précédent, on remarque que les molécules citées ont exhibé une bonne activité chélatrice du fer manifestant ainsi des valeurs d'IC₅₀, allant de 70,89 µg/ml (EDTA), 102,89 µg/ml (BHA) à 193,3 µg/ml (quercétine).

III.5. Corrélation entre différentes activités antioxydantes

Les corrélations entre les différentes activités antioxydantes ont été établies, ainsi les coefficients de corrélations obtenus entre ces dernières sont présentés comme suit :

a. Corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et l'activité anti-radicalaire de radical cation ABTS^{•+}

Dans cette étude, la détermination des coefficients de corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et l'activité anti-radicalaire cationique ABTS^{•+} a révélé une

relation inversement proportionnelle (annexe II) en exhibant des coefficients de corrélation négatifs, $r = -0,9$ pour la quercétine, l'acide ascorbique et l'acide tannique, et $r = -0,7$ pour la BHA. Cependant des faibles coefficients de corrélation positifs sont établis pour les deux molécules pures à savoir la catéchine et l'acide cinnamique avec un $r = 0,1$ et $r = 0,2$ respectivement.

b. Corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et l'activité anti-radicalaire du radical DPPH·

D'après les figures (annexe II), il est à noter, que de très bons coefficients de corrélation ont été enregistrés entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et l'activité anti-radicalaire du radical DPPH· pour les deux molécules pures, la quercétine et la BHA avec $r = 0,9$ et $r = 0,9$ respectivement. Ceci est peut-être dû au fait que ces molécules exercent le même mécanisme d'action dans les deux tests.

D'autre part, un coefficient de corrélation négatif ($r = -0,9$) est obtenu pour l'acide ascorbique et la catéchine et $r = -0,2$ et $r = -0,6$ pour l'acide tannique et l'acide cinnamique respectivement, ce qui indique une relation inversement proportionnelle pour les deux tests.

c. Corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et l'activité chélatrice du fer

À partir des résultats obtenus, on constate un bon coefficient de corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et l'activité chélatrice du fer marqué pour le BHA avec un $r = 0,8$ et un coefficient de corrélation négatif $r = -0,8$ pour la quercétine.

d. Corrélation entre l'activité anti-radicalaire de radical cation ABTS⁺ et l'activité anti-radicalaire du radical DPPH·

La corrélation entre l'effet anti-ABTS⁺ et anti-DPPH· des molécules pures a révélé de bon coefficients de corrélation linéaire avec $r = 0,9$; $r = 0,8$ et $r = 0,8$ pour les molécules pures : catéchine, acide caféique et BHA respectivement (voir annexe 2). Cela peut être expliqué par le fait que ces molécules exercent leurs effets anti-radicalaires par le même mécanisme, via le transfert d'hydrogène.

Des coefficients de corrélation moyens pour la quercétine, l'acide ascorbique, l'acide tannique et l'acide gallique ont été notés entre les deux activités anti-ABTS^{•+} et anti-DPPH[•]. Ceci explique peut-être le mécanisme mixte exercé par ces molécules citées précédemment contre les deux radicaux synthétiques via un transfert d'hydrogènes et/ou d'électron.

e. Corrélation entre l'activité anti-radicalaire du radical cation ABTS^{•+} et l'activité chélatrice du fer

Les résultats obtenus dans cette étude, dévoile un bon coefficient de corrélation de $r = 0,8$ pour la quercétine entre le test anti ABTS^{•+} et l'activité chélatrice du fer, cela peut expliquer l'activité antioxydant de ce composé par un transfert d'hydrogène.

Des valeurs de coefficients de corrélation positives moyennes pour l'acide caféique et la BHA ($r = 0,5$ et $r = 0,4$ respectivement) ont été notées, ceci est du probablement à un mécanisme antioxydant mixte exercé par ces deux molécules à savoir, le transfert d'électron et /ou d'hydrogène. Cependant, un coefficient de corrélation négatif a été établis pour l'acide gallique avec $r = -0,2$.

f. Corrélation entre l'activité anti-radicalaire du radical DPPH[•] et le chélation du fer

Des coefficients de corrélations positifs moyens ont été obtenus entre l'activité anti-radicalaire DPPH[•] et l'activité chélatrice du fer, avec $r = 0,5$ pour la quercétine et la BHA, $r = 0,2$ pour l'acide caféique, alors qu'un coefficient de $r = -0,1$ est obtenue entre ces deux activités pour l'acide gallique. Ce qui peut être dû au fait que l'acide gallique exerce une activité anti-radicalaire par différents mécanismes.

Conclusion et Perspectives

Les molécules pures antioxydantes possèdent un grand intérêt dans la défense cellulaire contre les différentes attaques causées par le stress oxydant, d'une partie en raison de leurs propriétés anti-radicalaire et leurs capacités à interagir avec les ions métalliques.

Notre étude est basée sur l'évaluation de l'activité antioxydante de quelques molécules pures, par la détermination de leur pouvoir scavenger du radical NO[•] (monoxyde d'azote), ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et leurs capacités à chélater les ions de fer.

Les résultats obtenus indiquent que toutes les molécules pures testées sauf la BHA, exhibent une activité scavenger du monoxyde d'azote avec une différence hautement significative ($p < 0,001$) avec un pourcentage d'inhibition qui dépasse 70%. L'évaluation de l'activité anti-radicalaire contre les radicaux ABTS^{•+} et DPPH[•] a révélé une bonne activité scavenging avec de faibles IC₅₀ < 1 µg/ml à l'exception de l'acide cinnamique.

L'estimation du pouvoir chélateur du fer des molécules pures, a montré la meilleure activité chélatrice du fer notée par l'EDTA avec la plus faible valeur d'IC₅₀: 70,89 µg/ml établies.

Les corrélations établies entre les différentes activités antioxydantes montrent que les molécules pures testées peuvent nous renseigner sur les mécanismes d'actions probables exercés par ces dernières.

L'ensemble des résultats obtenus, au fil de cette étude, n'est qu'une étape préliminaire, alors il est souhaitable de continuer et d'enrichir ce travail par

- L'évaluation de l'activité anti-NO[•] à différentes concentrations ;
- L'étude de d'autres activités anti radicalaires à savoir l'effet scavenger contre l'anion superoxyde (O₂^{•-}), l'effet scavenger contre le radical hydroxyle (•OH) ;
- L'évaluation de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT...etc) et les enzymes génératrices des radicaux libres (XO, MPO....etc) des molécules pures testées ;
- L'application de ces activités *in vivo*.

Références Bibliographiques

A

- **Aberoumand A., Deokule S.S. (2008).** Comparison of phenolic compounds of some edible plants of iran and india. *Pakistan J. of Nutr* 7(4), 582-585.
- **Acker S., Balen G.P., Berg D.J., Bast A., Vijgh W. (1998).** Influence of Iron Chelation on the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 56, 935-943.
- **Adjadj M. (2009).** Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la xanthine oxidase des extraits de la plante médicinale *Ajuga iva L.* Schreber. Th. : Magistère en biologie cellulaire et moléculaire, option : Toxicologie cellulaire et moléculaire. *Université Mentouri Constantine*, 96.
- Afonso, V.; Lomri, A. ; Champy, R.; Mitrovic, D. and Collin, P. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutase : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue de Rhumatisme*, 74: 636-643.
- **Andjelkovic M., Van Camp J., Meulenaer B.D., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M., Verhe R. (2006).** Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry* 98, 23-31.
- **Atmani D., Chaher N., Atmani D., Berboucha M., Debbache N., Boudaoud H. (2009).** Flavonoids in Human Health: From Structure to Biological Activity. *Current Nutrition & Food Science* 5, 225-237.
- **Ayouni K., Berboucha-Rahmani M., Kyong Kim H., Atmani D., Verpoorte R., Hae Choi Y. (2016).** Metabolomic tool to identify antioxidant compounds of *Fraxinus angustifolia* leaf and stem bark extracts. *Industrial Crops and Products* 88, 65-77.

B

- **Barouki R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences* 22, 266-72.
- **Bhavi N., Singh A.S., Mitra M., Santhakumar P.R., Chandrashekhara T.G. (2011).** A Validated Reverse Phase Hplc Method for the Determination of Disodium Edta in Meropenem Drug Substance with UV-Detection using Precolumn Derivatization Technique. *Analytical Chemistry Insights* 6, 7-14.

- **Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. (2003).** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: Review. *Annals of Botany* **91**, 179-194.
- **Bonnefont-Rousselot D., Therond P., Delattre J. (2003).** Radicaux libres et antioxydants. *Ed: Flammarion Médecine-Sciences*, 59-81.

C

- **Cai Y-Z.M., Xing J., Luo Q., Corke H. (2005).** Structure radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 1-17.
- **Carocho M., Ferreira I. (2013).** A review on antioxidants, prooxidant and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology* **51**, 15-25.
- **Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. (2006).** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. *Edt Blackwell Publishing Ltd*.

D

- **Dalle-Donne., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. (2006).** Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* **52**, 601-623.
- **Dangles O. (2012).** Antioxidant activity of plant phenols : chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry* **16**, 692-714.
- **Dangles O., Dufour C. (2008).** Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. In *Recent Advances in Polyphenol Research. Blackwell Publishing: Oxford* **01**, 67-87.
- **De Souza R.F., Sussuchi E.M et al. (2003).** Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry* **33** (7), 1125-1144.

F

- **Favier A. (2003).** Le stress oxydant. *Actualité chimique*, 108-115.

G

- **Gardès Albert.M., Bonnefont Rousselot.D., Abedinzadeh Z., Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, 91-96.

- **Geckil H., Ates B., Durmaz G., Erdogan S., Yilmaz I. (2005).** Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* **1** (1), 27-31.
- **Gilbert D.L., Colton C.A. (1999).** Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach..., editors. *New-York: Kluwer Academic / Plenum Publishers*, 740.
- **Gruber C.W., Cemazar M., Heras B., Martin J. L., Craik D. J. (2006).** Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in biochemical sciences* **31**, 64-455.

H

- **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007).** Le stress oxydant **62** (10), 628-638.
- **Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572-584.
- **Hopkins W. G. (2003).** Physiologie végétale. 2^{ème} édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris, 514.

J

- **Jacob C., Knight I., Winyard P.G. (2006).** Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem* **387**, 97-1385.

K

- **Koechlin-Ramonatxo C. (2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolisme* **20**, 165–177.
- **Kröncke K.D., Suschek C.V., Kolb-Bachofen V. (2000).** Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid Redox Signal* **2**, 585-605.

M

- **Macheix J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P. (2006).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaire. *Edition Technologie et document, Paris* 380-398.
- **Marcocci L., Packer L., Droy-Lefaix M.T., Sekaki A., Gardès-Albert M. (1994).** Antioxydant action of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Methods in Enzymology* **234**, 462-475.
- **Molyneux P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol* **26**(2), 212-219.

O

- **Oliveira S., Souza G.A., Rodrigues Eckert C., Silva T. A., Sobral S., Fávero O.A., Ferreira M. J., Romoff P., W Baader W. J. (2014).** Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quim. Nova* **37**, 497-503.
- **Ozsoy N., Can A., Yannardag R., et Akev N. (2008).** Antioxydant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food chemistry* **110**, 571-583.

P

- **Pietta P. G. (2000).** Flavonoids as Antioxydants. *J. Nat. Prod* **63**, 1035-1042.
- **Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. (1999).** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine *Medisphere*, 1-4.
- **Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Litinas K., Geromichalos G. (2014).** Novel Cinnamic Acid Derivatives as Antioxydant and Anticancer Agents: Design, Synthesis and Modeling Studies. *Molecules* **19**, 9655-9674.
- **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. (2009).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* **4**, 25-39.

R

- **Rahman I., Biswas S. K., et Kode A. (2006).** Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European journal of pharmacology* **533**, 39-222.
- **Rice-evans. (1996).** Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med* **20**, 933-956.

S

- **Sagar B., Kedare., Singh R. P. (2011).** Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* **48**(4), 412–422.
- **Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. (2006).** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* **67**, 2058-2070.
- **Sharma S.K., Singh A.P. (2012).** *In vitro* antioxydant and free radical scavenging activity of *Nardostachys jatamansi* DC. *J Acupunct Meridian Stud* **5**(3), 112-118.
- **Shimizu H. (2004).** Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, *Stroke* **35**(9), 2072-2077.
- **Soo Cheon C., Jai-Heon L., Sang U.P. (2013).** Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities. *Experimental and Clinical Sciences* **12**, 225–230.

T

- **Tsimogiannins D.I., Oreopoulou V. (2006).** The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech* **7**, 140-146.

V

- **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., et Telser J., (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 44-84.

W

- **Wang Q., Wang H., Xie M. (2010).** Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology* **192**, 893–898.
- **Williams R., Spencer J., Rice-Evans. (2004).** Flavonoids: antioxydants or signalling moleculaire? *Free radical Biology & Medicine* **36**(7), 838-849.

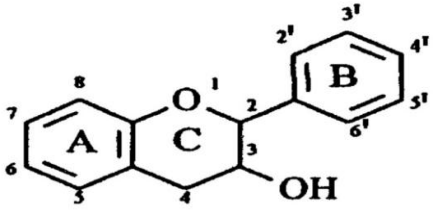
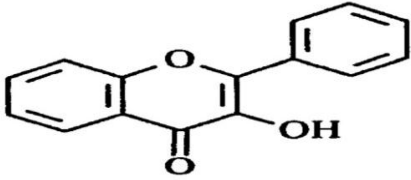
Y

- **Yao L.H., Jiang Y.M., S.H.I J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S. (2004).** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr* **59**, 113-122.
- **Yuanzhen L., Mingquan G. (2015).** Studies on Transition Metal-Quercetin Complexes Using Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Molecules* **20**, 8583-8594.

Z

- **Zepp R.G., Lee Wlff N., Baughman G.L., Hollis R.C. (1977).** Singlet oxygen in natural waters, *Nature* **267**, 421-423.

Annexe I : Caractérisation structurelle de la catéchine et de la quercétine.

Composés	Structure	Position du groupement OH	Double liaison C ₂ =C ₃	Formule chimique
Catéchine		3, 5, 7, 3', 4'	-	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Quercétine		3, 5, 7, 3', 4'	+	C ₁₅ O ₇ H ₁₀

Annexe II : Corrélation entre différentes activités antioxydantes.**Tableau I.**

Quercétine	NO·	ABTS ⁺	DPPH·	Chélation du fer
NO·		-0,9	0,9	-0,8
ABTS ⁺			0,6	0,8
DPPH·				0,5

Tableau II.

Catéchine	NO·	ABTS ⁺	DPPH·	Chélation du fer
NO·		0,1	-0,9	-
ABTS ⁺			0,9	-
DPPH·				-

Tableau III.

BHA	NO·	ABTS ⁺	DPPH·	Chélation du fer
NO·		-0,7	0,9	0,8
ABTS ⁺			0,8	0,4
DPPH·				0,2

Tableau IV.

Acide ascorbique	NO \cdot	ABTS \cdot^+	DPPH \cdot	Chélation du fer
NO \cdot		-0,9	-0,9	-
ABTS \cdot^+			0,5	-
DPPH \cdot				

Tableau V.

Acide tannique	NO \cdot	ABTS \cdot^+	DPPH \cdot	Chélation du fer
NO \cdot		-0,9	-0,2	-
ABTS \cdot^+			0,5	-
DPPH \cdot				

Tableau VI.

Acide cinnamique	NO \cdot	ABTS \cdot^+	DPPH \cdot	Chélation du fer
NO \cdot		0,2	-0,6	-
ABTS \cdot^+			0,003	
DPPH \cdot				

Tableau VII.

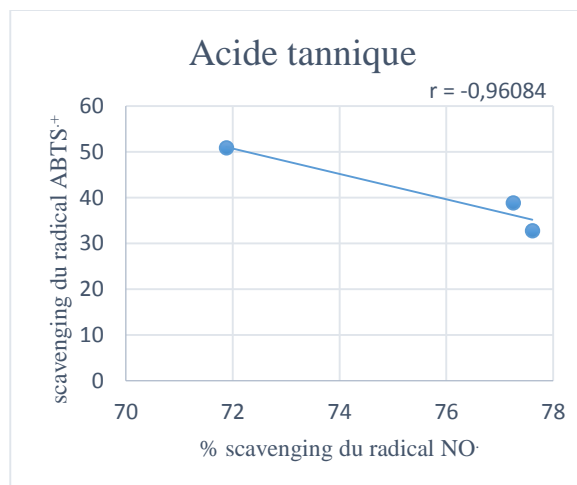
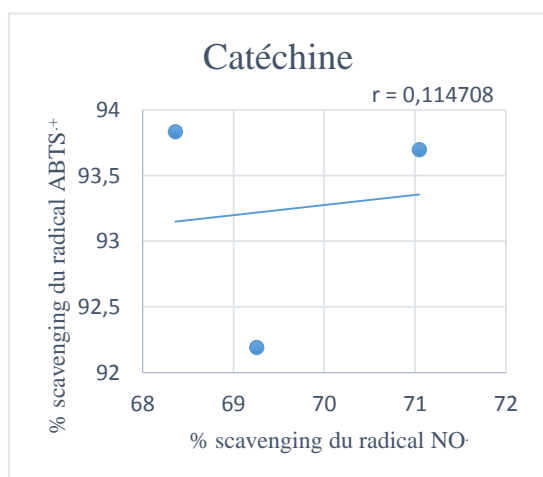
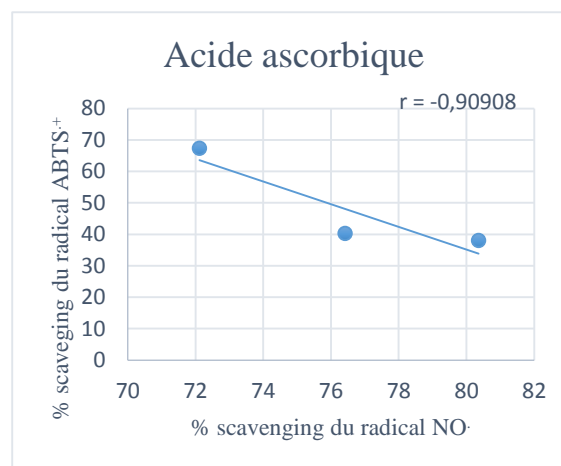
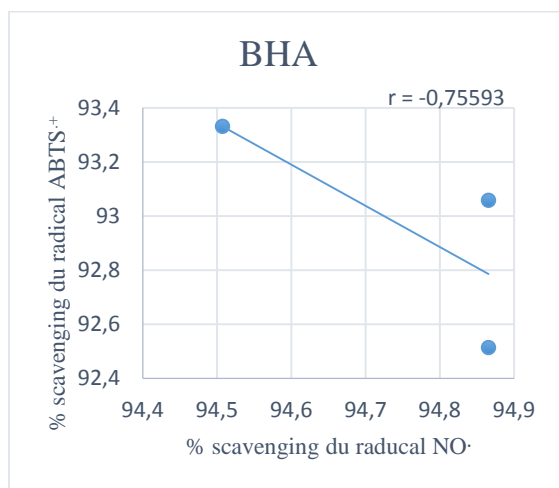
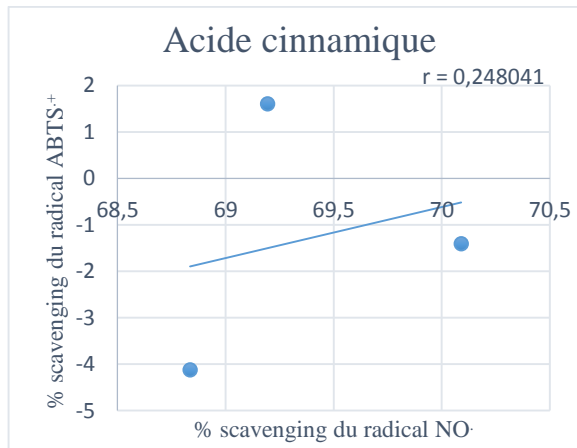
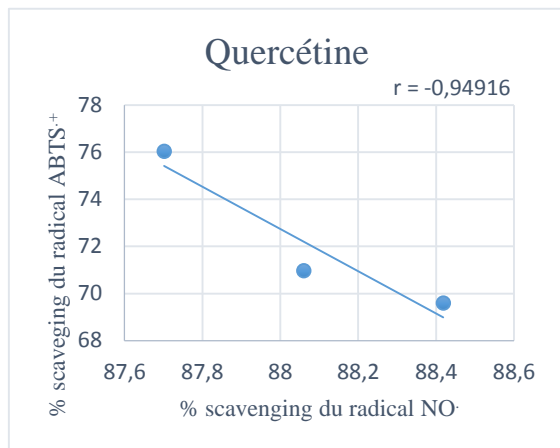
Acide gallique	NO \cdot	ABTS \cdot^+	DPPH \cdot	Chélation du fer
NO \cdot	-	-	-	-
ABTS \cdot^+	-	-	0,6	-0,2
DPPH \cdot				-0,1

Tableau VIII.

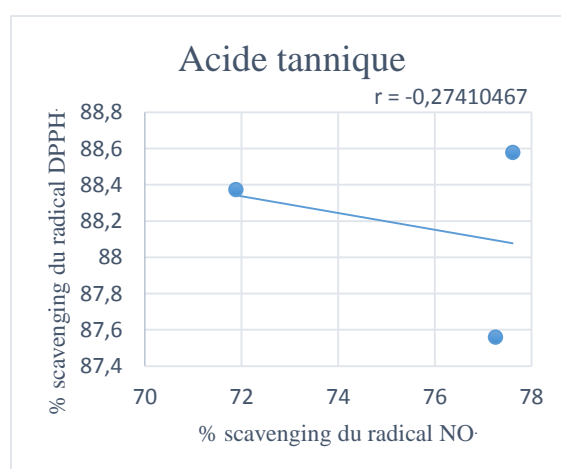
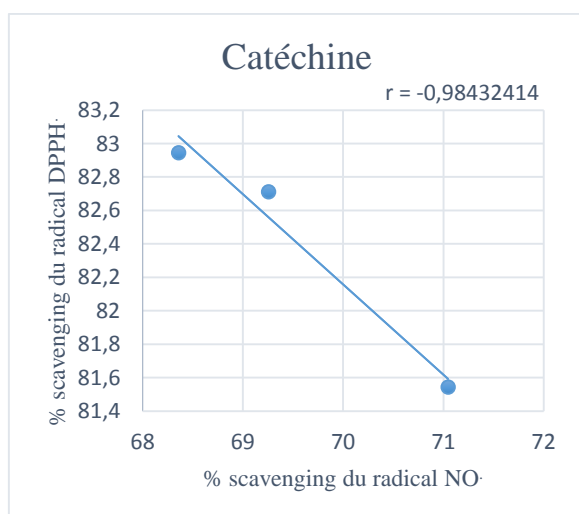
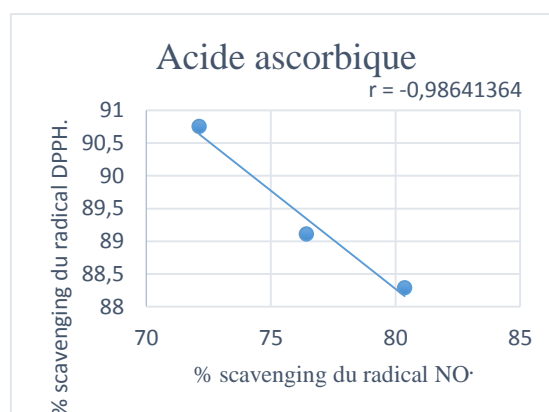
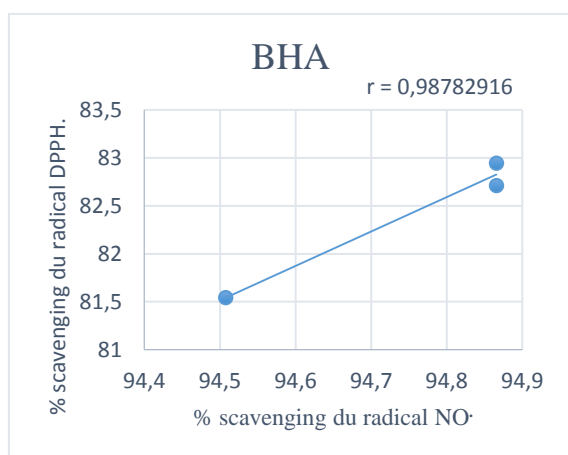
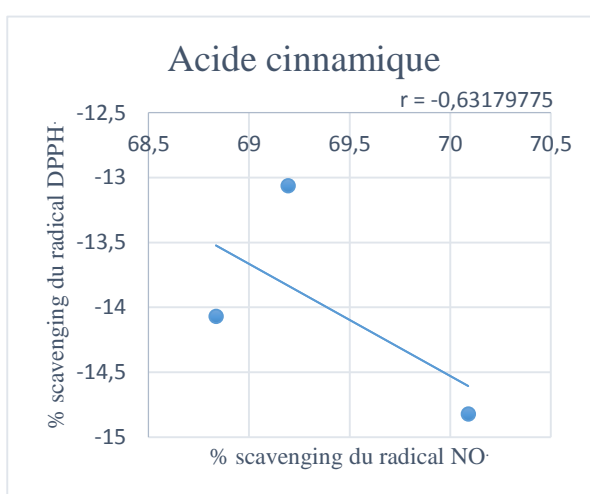
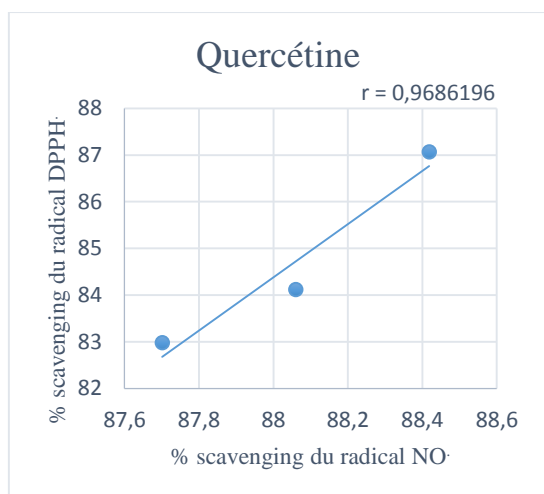
Acide caféique	NO \cdot	ABTS \cdot^+	DPPH \cdot	Chélation du fer
NO \cdot	-		-	-
ABTS \cdot^+	-		0,8	0,5
DPPH \cdot				0,2

- Courbe de corrélation entre différentes activités antioxydantes.

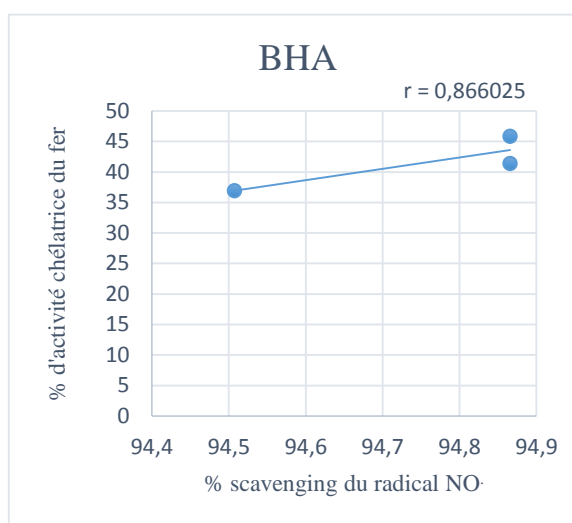
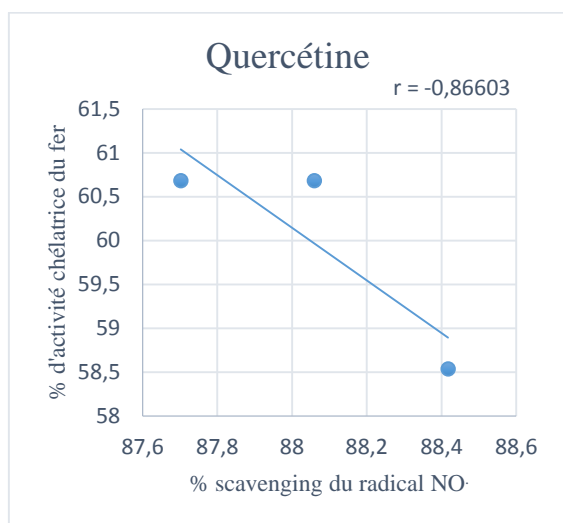
a. Corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et l'activité anti-radicalaire de radical cation ABTS⁺



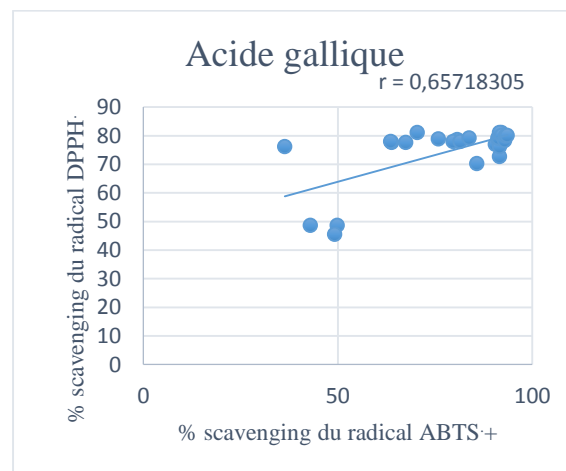
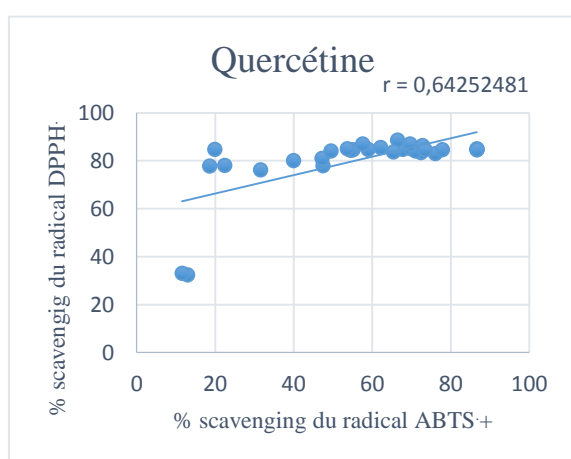
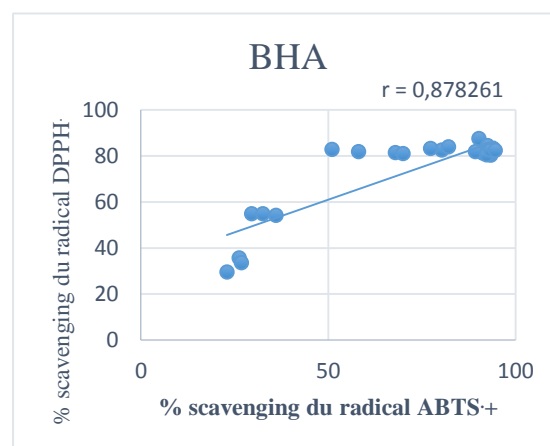
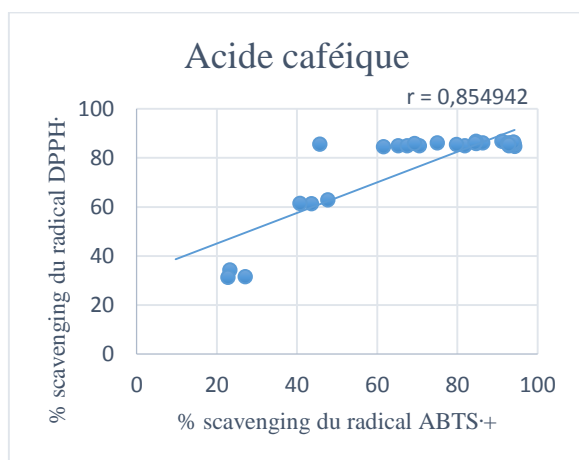
b. Courbes de corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et l'activité anti-radicalaire du radical DPPH

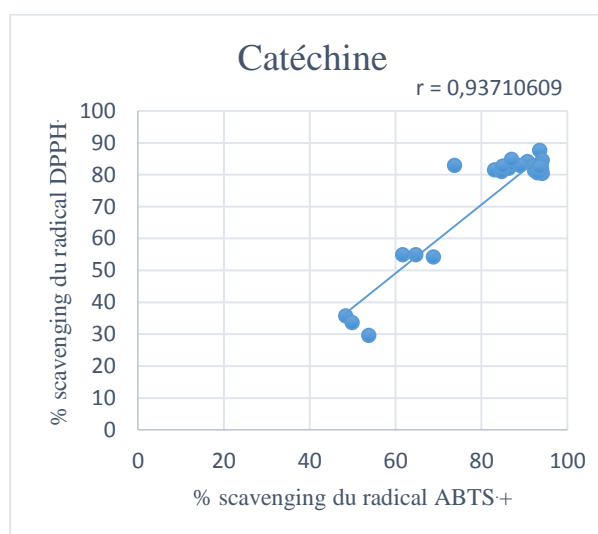
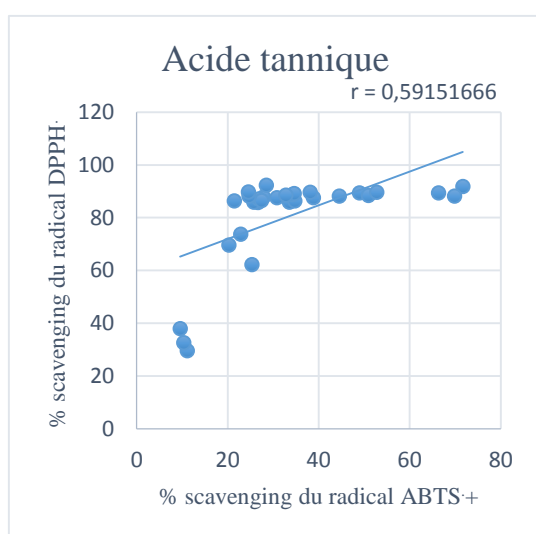
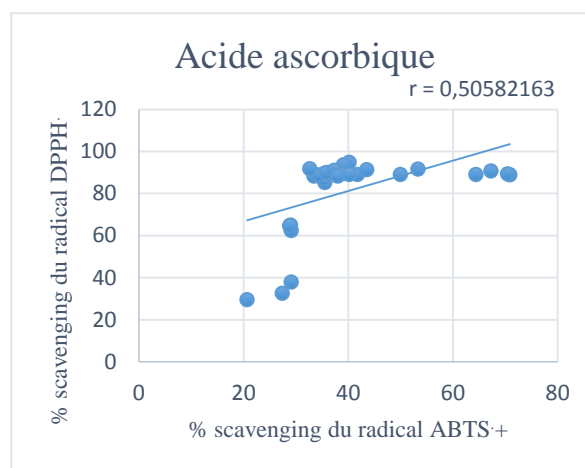
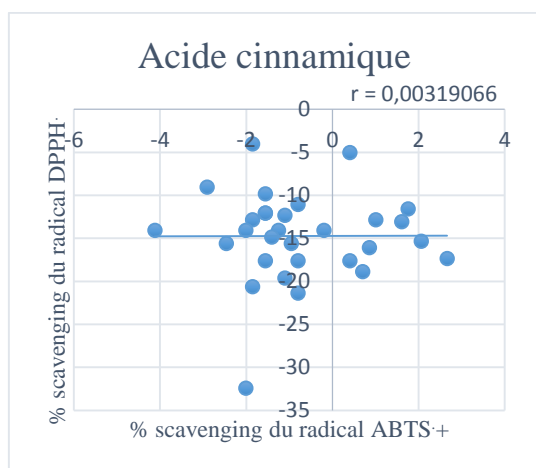


c. Courbes de corrélation entre l'activité scavenging de monoxyde d'azote et l'activité chélatrice du fer.

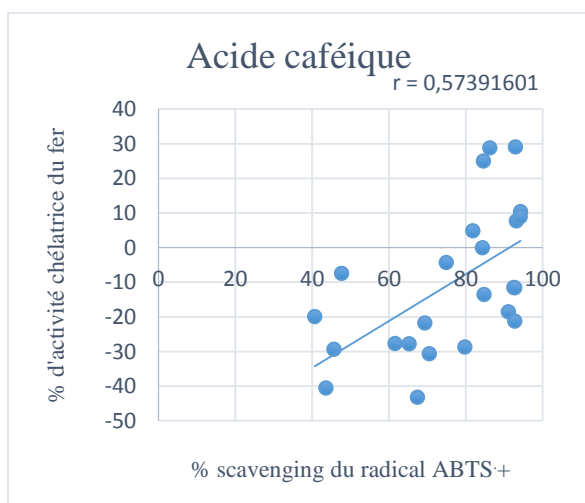
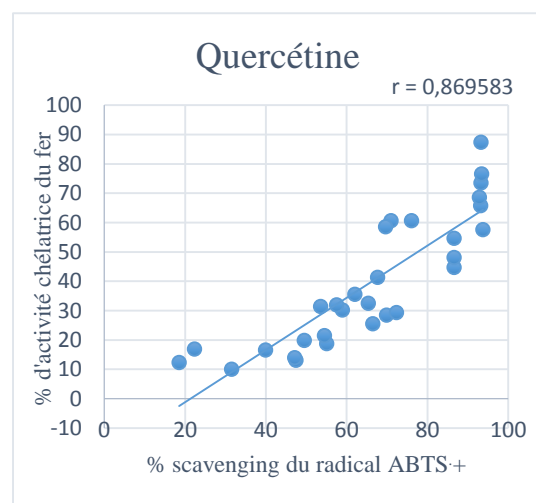


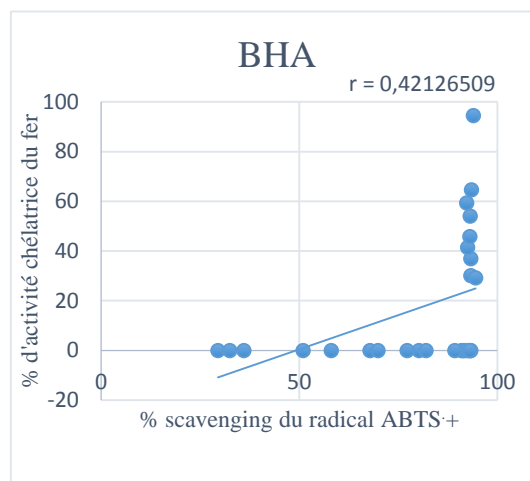
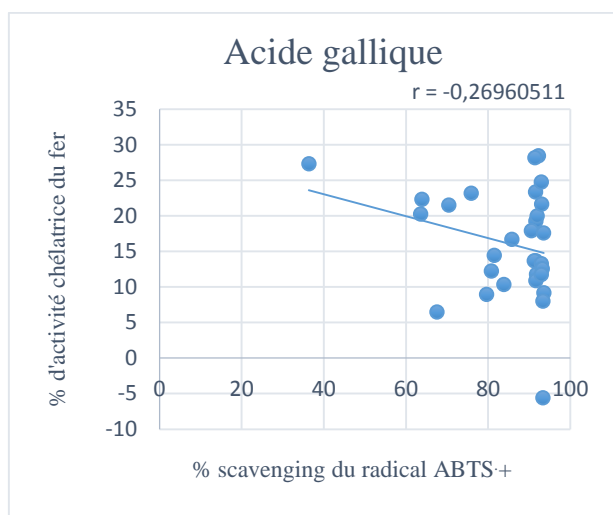
d. Courbes de corrélation entre l'activité anti-radicalaire de radical cation ABTS^{·+} et l'activité anti-radicalaire du radical DPPH·



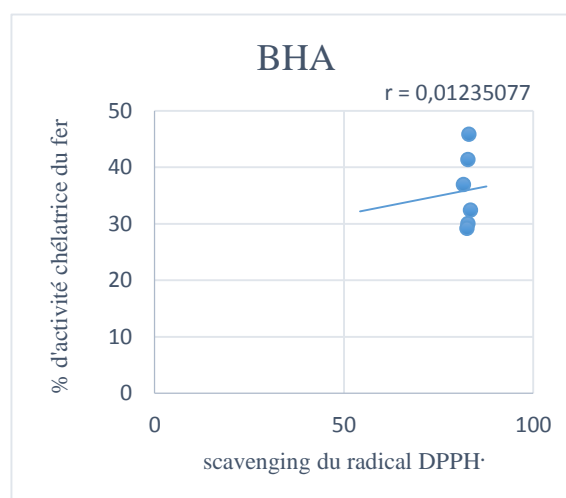
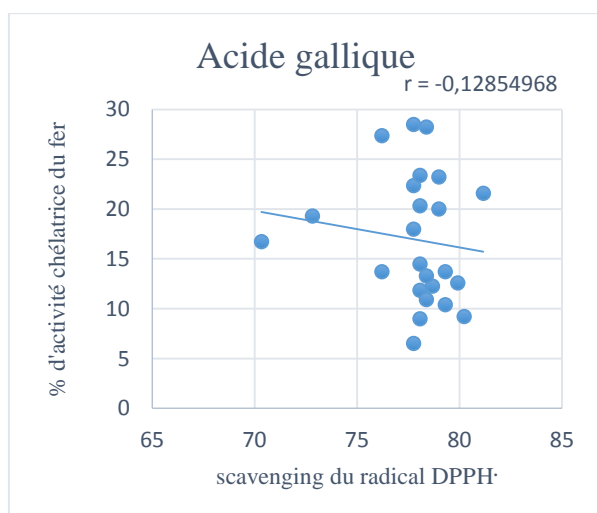
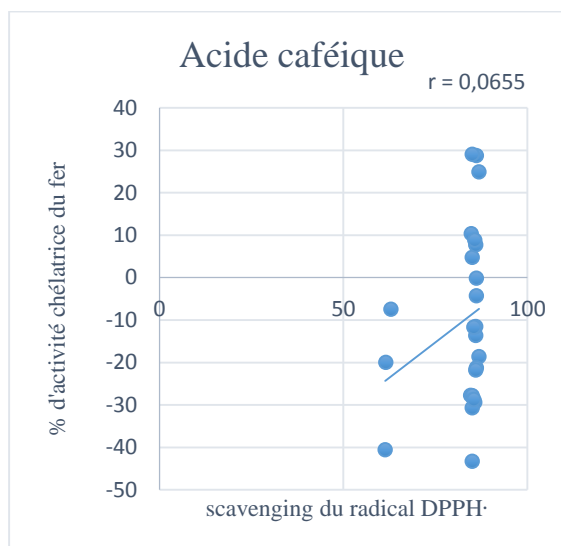
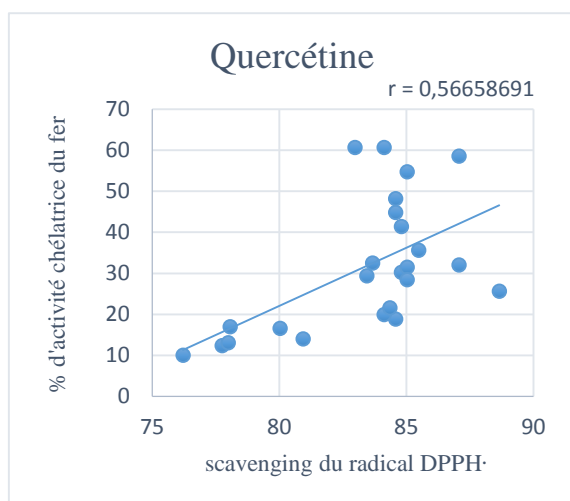


e. Courbes de corrélation entre l'activité anti-radicalaire du radical cation $ABTS^{\cdot+}$ et l'activité chélatrice du fer.





f. courbes de corrélation entre l'activité anti-radicalaire du radical DPPH \cdot et l'activité chélatrice du fer.



Partie expérimentale

Partie bibliographique

Résultats et Discussions

Conclusion et Perspective

*Références
bibliographiques*

Introduction

Annexes

Résumé

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'activité antioxydante des molécules pures *in vitro*, par trois tests anti-radicalaire, NO· (monoxyde d'azote), l'ABTS⁺ (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) et le DPPH· (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) et par une l'activité chélatrice du fer. Les résultats obtenus révèlent que toutes les molécules pures testées présentent un bon effet scavenger contre le radical monoxyde d'azote (NO·) avec un pourcentage d'inhibition supérieur ou égale à 70% à une concentration de 100 µg/ml. Par ailleurs, une bonne activité anti-radicalaire contre les deux radicaux libres synthétiques, le radical cationique ABTS⁺ et le radical DPPH· a été enregistrée avec de faibles valeurs d'IC₅₀ pour toutes les molécules pures sauf l'acide cinnamique. À l'exception de l'acide caféique et l'acide gallique, toutes autres molécules pures testées, ont montré de bonne activité chélatrice du fer avec de faibles valeurs d'IC₅₀.

Mots clés : Molécules pures, chélation du fer, activité anti-radicalaire (NO·, ABTS⁺, DPPH·).

Abstract

The purpose of our work is to evaluate The antioxidant activity of pure molecules *in vitro*, by three anti-free radical tests : NO· (Nitrogen monoxide), l'ABTS⁺ (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) and DPPH· (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) and also by the chelating activity of iron. The results obtained reveal that all the pure molecules tested have a good scavenger effect against the radical NO· (Nitrogen monoxide) with a percentage inhibition greater than or equal to 70% at a concentration of 100 µg / ml. Otherwise, a good anti-free radical activity against the two synthetic free radicals : the Cationic radical ABTS⁺ and the radical DPPH· was recorded with low IC₅₀ values for all pure molecules except cinnamic acid. Except the acetic acid and gallic acid , all other pure molecules tested showed good chelating activity of iron with low IC₅₀ values.

Key words: Pure molecules, iron chelating activity, radical scavenging activity (NO·, ABTS⁺, DPPH·).

ملخص

الهدف من عملنا هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة الجزيئات النقية في المختبر عن طريق ثلاثة فحوصات مكافحة الراديكالية، NO· (أكسيد النيتريك)، ABTS⁺ (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) و DPPH· (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) إزالة معدن الحديد وأظهرت النتائج أن جميع الجزيئات محض الاختبار لها تأثير جيد ضد أكسيد النيتريك راديكالية مع نسبة تثبيط أكبر من أو يساوي 70% عند تركيز 100 ميكروغرام / مل. علاوة على ذلك نشاط مكافحة الراديكالية جيد ضد كل من الجذور الحرة الاصطناعية ABTS⁺ و DPPH· سجلت مع قيم IC₅₀ منخفضة لجميع الجزيئات ما عدا جزيئات حمض السيناميك. باستثناء حمض كافيينك وحمض الغال، أظهرت جميع الجزيئات الأخرى نشاط جيد للحديد مع القيم IC₅₀ منخفضة.

مفتاح الكلمات :

مكافحة الراديكالية و (DPPH·, ABTS⁺, أكسيد النيتريك), الجزيئات النقية, إزالة معدن الحديد.