

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Abderrahmane Mira de Bejaia  
Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-chimique



جامعة بجاية  
Tasdawit n Bgayet  
Université de Béjaïa

## Mémoire de Master

Filière: Sciences Biologiques

Option: Biochimie Appliquée

Thème

# Evaluation de l'activité anti NADH oxydase de la XOR de quelques composés phénoliques

Présenté par : BOURICHE Abdeloualid & RADJ Aissa

Composition du jury

Mme.: Y.BERRI

MAA

Président

Melle: N.CHAHER

MAA

Encadreur

Mr.: S.OUCHEMOUKH

MCA

Examineur

Année universitaire : 2015 / 2016

**REMERCEMENTS**

*Louange a dieu, le miséricordieux, sans lui rien de tout cela n'aurait pu Etre.*

*Au terme de ce travail, il m'est agréable d'adresser mes remerciements à tous ceux qui  
m'ont octroyé main vigoureuse pour sa*

*Réalisation à:*

*M<sup>lle</sup>. N. CHAHER*

*Pour le temps et l'intention qu'elle a bien voulu consacrer au bon déroulement de ce  
travail.*

*Mme Y. BERRJ*

*De nous avoir fait l'honneur de juger le travail et présider le jury.*

*Monsieur S. OUCHEMOUKH*

*Pour avoir accepté de donner de son temps pour évaluer ce travail.*

*Mlle N. Ahmane*

*Pour sa présence et son aide précieuse.*

*A toute l'équipe du laboratoire génétique*

*Nous tenons également à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin  
à la réalisation de ce modeste travail.*

**DEDICACES**

*Je dédie ce travail*

*A mes très chers et précieux parents qui m'ont toujours soutenu, et à l'intérêt*

*Qu'ils m'ont toujours portés pour mes études, je ne les remercierai jamais assez,*

*Pour tout ce qu'ils m'ont fait.*

*Que dieu nous les protèges.*

*A mon frère et sœurs qui n'ont jamais cessés de m'encourager dans la poursuite*

*De mes études en m'apportant soutien moral et financier*

*A tout mes cousins et cousines*

*A toutes personnes qui m'ont soutenu durant mes études et à tous mes amis, en particulier  
Karim, Ali, Aissa, Hamza, Tarik, Adel, Massi, Amar, Norredine, Arezki, Marzouk, Jugurtha,  
Aksil.*

*A tous le Club Sportif Amateur de Targa Ouzemour*

*A tous mes oncles et tentes et à toute ma famille*

*A toute la promotion biochimie appliquée 2016.*

*En fin à toute personne qui m'est chère au cœur et qui m'a aidé de près ou de loin.*

***Bouriche Abdeloualid***

*DEDICACES*

*Je dédie ce travail*

*A mes très chers et précieux parents qui m'ont toujours soutenu, et à l'intérêt  
Qu'ils m'ont toujours portés pour mes études, je ne les remercierai jamais assez,*

*Pour tout ce qu'ils m'ont fait.*

*Que dieu nous les protèges.*

*A mes frères et sœurs qui n'ont jamais cessés de m'encourager dans la poursuite*

*De mes études en m'apportant soutien moral, et financer*

*A ma très chère épouse Fadila*

*A toutes personnes qui m'ont soutenu durant mes études et à tous mes amis en particulier Ali,  
Bouriche, Adel, Karim, Hamza, Amar (Bolos), Norredine (Rmizem), Arezki (Kiki), Tarik,  
Jugurtha, Marzouk, Aksil.*

*A tous le Club Sportif Amateur de Targa Ouzemour*

*A toute ma famille*

*I Imazighen anda ma llan*

*A toute la promotion biochimie appliquée 2016.*

*En fin à toute personne qui m'est chère au cœur et qui m'a aidé de près ou de loin.*

**Liste des abréviations**

- ADN: Acide DésoxyriboNucleique.
- ATP: Adénosine TriPhosphate
- CHLP : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance.
- Cys: Cystéine.
- DMSO: Diméthylsulfoxyde.
- DTT: Dithiothreitol.
- EDTA: Acide éthylène Diamine Tétra acétique.
- ERN: Reactive Nitrogen Species (espèce radicalaire de l'azote).
- ERO: Reactive Oxygen Species (espèce radicalaire de l'oxygène).
- FAD: Flavine Adénine Dinucléotide.
- FADH: Flavine Adénine Dinucléotide (réduit).
- Fe-S: fer-soufre.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxide d'hydrogène.
- HCl: Acide chlorhydrique.
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Di-potassium Hydrogen Phosphate.
- Kb : kilo base.
- KDa: Kilo Dalton.
- Mo: Molybdène.
- Mo-Pt: Molibdo Pterine.
- NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide.
- NADH oxydase: Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydase.
- NADH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide (réduit).
- NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.
- NO' : Monoxyde d'azote.

## *Liste des abréviations*

---

-O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : Superoxyde.

-OH<sup>•</sup> : Radical hydroxyle.

-ONOO<sup>-</sup> : Péroxynitrite.

-RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

-SH : Groupements Sulphydryle.

-XDH: Xanthine Déshydrogénase.

-XO: Xanthine Oxydase.

-XOR: Xanthine Oxydoréductase.

**Liste des Figures**

<b>Figure 1</b> : Structure de l'enzyme xanthine oxydoréductase.....	2
<b>Figure 2</b> : Demi-réaction réductrice.....	4
<b>Figure 3</b> : Demi-réaction oxydative.....	4
<b>Figure 4</b> : Conversion de la xanthine déshydrogénase (XDH) en xanthine oxydase (XO).....	5
<b>Figure 5</b> : L'oxydation des substrats au niveau des deux sites Mo et FAD de la XOR.....	7
<b>Figure 6</b> : Schéma montrant l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique.....	8
<b>Figure 7</b> : Mécanisme de génération des ERO par la XOR dans les tissus lors du Processus d'ischémie/réperfusion.....	8
<b>Figure 8</b> : Structure de base des flavonoïdes.....	10
<b>Figure 9</b> : La structure des monomères des tanins.....	11
<b>Figure 10</b> : La biosynthèse des composés phénoliques par la voie de shikimate.....	13
<b>Figure 11</b> : La biosynthèse des composés phénoliques par la voie de phénylalanine.....	14
<b>Figure 12</b> : la voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	15
<b>Figure 13</b> : Inhibition de l'activité anti-NADH oxydase des molécules pures a 50µg/ml.....	23
<b>Figure 14</b> : L'inhibition en fonction de la concentration de l'activité anti-NADH oxydase...	24
<b>Figure 15</b> : Structures générale des flavonoïdes.....	25
<b>Figure 16</b> : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la Quercetine 3-O-glucoside.....	28

## Liste des figures

- Figure 17** : Représentation de linweaver et burk e l'inhibition de l'activité NADH oxydase par l'Apigénine-O-7-glucoside.....28
- Figure 18** : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la Rutine.....29
- Figure 19** : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par l'acide gallique.....29
- Figure 20** : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la quercitrine.....30
- Figure 21** : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la luteoline-7-glucoside.....31
- Figure 22** : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la Catéchine.....31

**Liste des tableaux**

**Tableau I:** Classification des polyphénols .....12

**Tableau II:** Classification des molécules pures utilisées.....20

**Tableau III:** Valeurs ( $K_m'$  et  $V'$ ) des constantes cinétiques en présence d'inhibiteurs.....26

**Tableau IV:** Les valeurs  $K_m$  et  $V_{max}$  des molécules pures.....27

## Sommaire

Introduction.....1

### CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1- Généralités sur la xanthine oxydoréductase .....2

I.2- Mécanisme réactionnel de la xanthine oxydoréductase.....3

I.3- Distribution de la xanthine oxydoréductase (XOR).....5

I.4- Interconversion xanthine déshydrogénase / oxydase.....5

I.5- Structure de la xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO).....6

I.6- Rôle de la xanthine oxydoréductase.....7

I.7- Les composés phénoliques.....9

1.8- Biosynthèse.....13

1.9- Rôle biologiques des composés phénolique.....15

I.10- Inhibition des enzymes tels que la Xanthine oxydase.....16

### CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1- Matériels et méthodes.....19

II.1.1- Matériels.....19

II.1.2- Réactifs.....19

II.1.3- Composés phénoliques purs utilisés.....19

II.1.2- Méthodes.....21

II.1.2.1- Préparation de la solution tampon.....21

II.1.2.2- Préparation de la solution de substrat (NADH).....21

II.1.2.3- Préparation de la forme déshydrogénase de la xanthine oxydoréductase.....	21
II.1.2.4- Effet des molécules pures sur l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase.....	21
II.1.2.5- Détermination du type d'inhibition.....	22
II.1.2.6- Analyse des résultats en fonction des concentrations.....	22
II.1.2.7- Analyse statistique.....	22

**CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS**

III.1- Résultats et discussion.....	23
III.1.1- Inhibition de l'activité NADH oxydase par les molécules pures.....	23
III.1.2- L'inhibition de NADH oxydase en fonction des concentrations.....	24
III.1.3- Détermination du type d'inhibition.....	26
Conclusion et perspective.....	32
Références bibliographique.....	33



# ***INTRODUCTION***

### **Introduction**

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient leurs effets bénéfiques. Après plusieurs études, on a su qu'elles étaient pour la majorité attribuées aux métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les terpènes et les composés phénoliques. Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et agroalimentaires : ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique, expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments. Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Actuellement, le développement des méthodes d'extraction et des techniques d'analyses physico-chimiques et biologiques a permis une meilleure connaissance de la composition des plantes. La recherche des extraits végétaux riches en molécules à forte activité biologique (antioxydante, anti-inflammatoire...etc) dans différents milieux, reste un domaine de recherche important.

A l'heure actuel, la recherche des molécules pures responsable de l'effet biologique est devenue une étape indispensable dans le développement d'un médicament, pour cela une bonne technique d'extraction constitue une alternative très intéressante qui peut permettre des durées d'extractions courtes tout en maintenant des rendements élevés (Chiang et *al.*, 1994).

C'est dans ce contexte d'étude de l'extraction et de la stabilité des polyphénols que notre travail a pris naissance. Notre étude s'articule autour d'un axe principal :

Tester l'effet inhibiteur des molécules pures purifiées par HPLC préparative et identifiées par résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'extrait aqueux chloroforme de *Galium mollugo* et de deux composés phénoliques synthétiques (catéchine, acide gallique) sur l'activité anti-NADH oxydase.

# *CHAPITRE I*



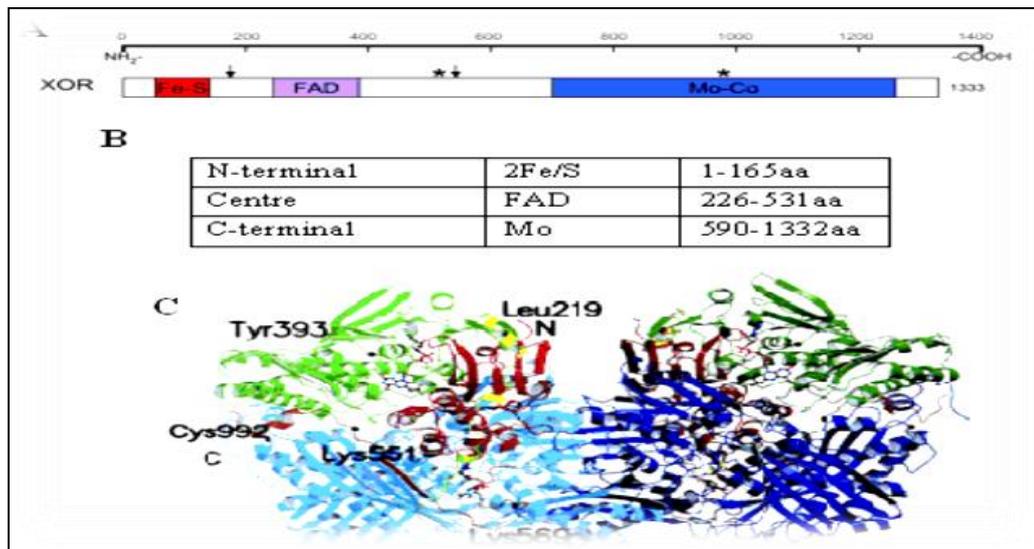
## *SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE*

**I.1- Généralité sur la xanthine oxydoréductase**

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une molybdo-enzyme de 300KDa qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cour du métabolisme des purines (Atmani et al., 2005). Elle existe sous deux formes inter convertibles: la xanthine déshydrogénase (XDH est la forme la plus dominante) et la xanthine oxydase (XO).

Le gène qui code pour la XOR humaine à plus de 60Kb, il est composé de 36 exons et 35 introns. Ce gène est localisé dans la bande p22 du chromosome 2. La séquence de la XOR humaine est de 1333 acides aminés, elle présente un degré d'homologie de 91% avec celle de la XOR de la souris et du rat (Martelin, 2004).

La XOR est composé de deux sous unités identiques chacune est de poids moléculaire d'environ 145 KDa (**Figure 1**). Chaque sous unité est organisée en trois domaines chacun est associé à un cofacteur spécifique: le domaine N-terminale de 20KDa, contient deux centre ( $Fe_2/S_2$ ), le domaine centrale (FAD) de 40KDa et le domaine C-terminale de 85KDa contient un centre molybdoptérine (Mo-pt) (Sato et al., 1995).



**Figure 1:** Structure de l'enzyme xanthine oxydoréductase (Amaya et al., 1990).

L'appellation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc....) et certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>) (Pourrut, 2008).

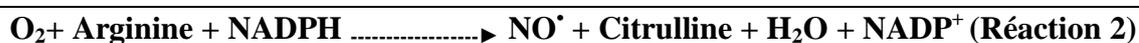
Les ERO se forment dans toutes les réactions biochimiques comportant le transfert d'électrons et un atome d'oxygène.

Divers types cellulaires et tissulaire donnent naissance aux ERO par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normal et parfois en réponse à un stimulus spécifique.

Le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase intervient aussi dans la production de l'anion superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique selon la réaction suivante :



Le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) est produit par l'oxydation de l'un des atomes N-terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par le nitrite oxyde synthase (NOS) selon la réaction suivante :



Le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec l' $\text{O}_2^{\cdot-}$  pour former un puissant oxydant le peroxy-nitrite ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le  $\text{NO}_2$  et le  $\text{OH}^{\cdot}$  (Margaret et *al.*, 2001).

Ces dix dernières années, le rôle physiologique du monoxyde d'azote (NO) a été particulièrement étudié chez les plantes. Il apparaît que le NO joue un rôle essentiel en tant que molécule de signalisation (Pourrut, 2008).

A pH physiologique, le peroxy-nitrite se protone rapidement pour former de l'acide peroxy-nitreux (**Réaction 3**). Ce puissant agent nitrifiant et oxydant peut altérer directement de nombreuses molécules biologiques. Il peut également générer des dommages indirects en subissant une fission homolytique produisant deux puissants agents oxydants, le dioxyde nitrique et le radical hydroxyle (Pourrut, 2008).



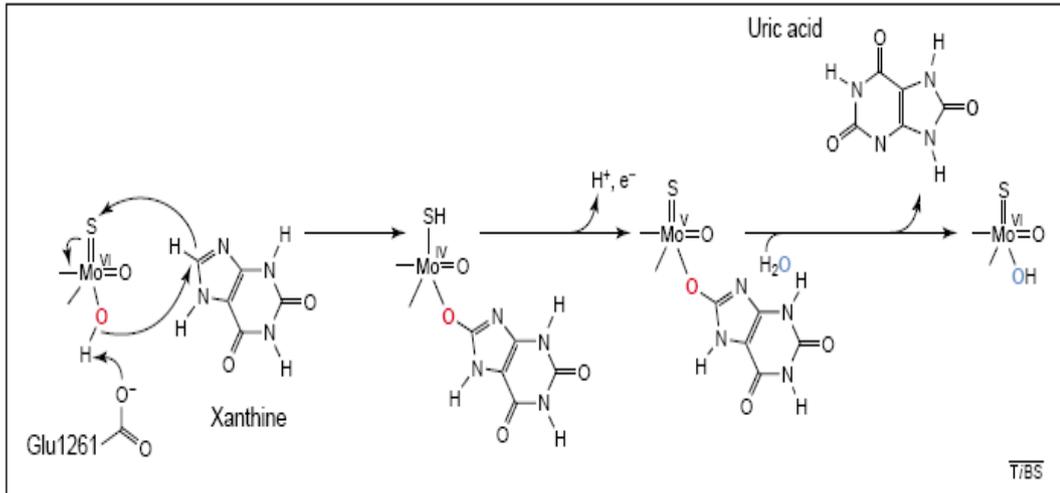
## I.2- Mécanisme réactionnel de la xanthine oxydoréductase

Le mécanisme réactionnel de la XOR est constitué de deux demi-réactions indépendantes, réductive et oxydative.

### I.2.1-La demi-réaction réductive

La réaction a eu lieu au niveau du site Mo où se produit une hydroxylation oxydative du substrat (RH) avec réduction simultanée de l'enzyme qui catalyse successivement

l'oxydation des Carbones 2 et 8 du noyau de la purine (**Figure 2**), transformant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en urate (Kurosaki *et al.*, 1995).

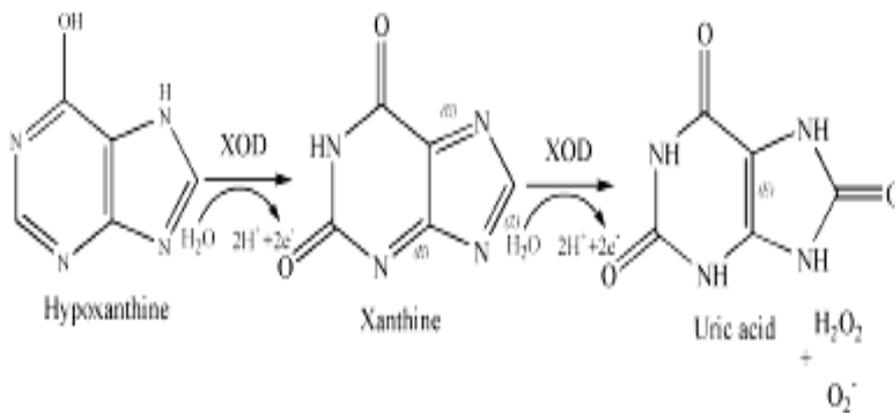


**Figure 2 :** Demi-réaction réductrice (Kalra *et al.*, 2007).

Le NADH est le seul substrat réducteur qui réagit avec le centre flavine adénine dinucléotide (FAD) et non avec le centre Mo. Les inhibiteurs de la XOR sont généralement des analogues des substrats, tels que l'allopurinol, oxypurinol, et certaines purines (adénine, guanine) et pyrimidines (uracile, thymine, cytosine) qui inactivent l'enzyme en agissant sur le site Mo (Kim et Hille, 1992).

**I.2.2- La demi-réaction oxydative**

La réaction prend lieu au site FAD qui transfère des électrons aux accepteurs physiologiques (O<sub>2</sub> et NAD<sup>+</sup>) (**Figure 3**). La réoxydation de l'enzyme réduite permet d'oxyder l'oxygène en anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et en hydrogène peroxyde (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Harris et Massey, 1997).



**Figure 3 :** Demi-réaction oxydative (Hille, 2002).

**I.3- Distribution de la xanthine oxydoréductase (XOR)**

La localisation cellulaire de la XO est principalement cytoplasmique. Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façon très importante dans le foie et les intestins (Linder et *al.*, 1999).

Les études ont montré la présence de la XO avec de faibles concentrations dans le cœur, la peau, le muscle, la rate ainsi que dans le pancréas, la moelle osseuse, la thyroïde et l'utérus (Kooij et *al.*, 1992).

Dans les conditions normales la forme oxydase se produit en quantités substantielles dans les glandes mammaires en lactation, les radiaux oxygénés formés agissent comme des agents bactéricides. La XO présente dans le lait est soit sous sa forme soluble ou liée à la membrane des globules lipidiques (Silanikovea et *al.*, 2005).

**I.4- Interconversion xanthine déshydrogénase / oxydase**

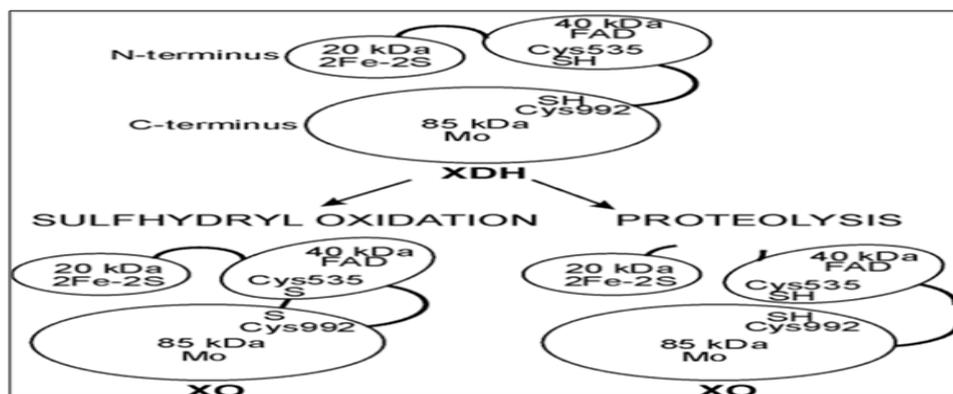
Chez les mammifères, la XOR existe originalement sous la forme déshydrogénase (XDH), mais elle peut être convertie en forme oxydase (XO) durant le processus de l'extraction, elle peut être convertie en une forme oxydase par deux manière.

**- Irréversible**

La conversion procède par protéolyse en utilisant des enzymes protéolytiques comme la trypsine, la chymotrypsine et la pancréatine (Della Corte et *al.*, 1969). La trypsine clive la XDH après la lysine (Lys 551) et la pancréatine clive après Leu 219 et Lys 569. Par contre, la forme déshydrogénase de la poule et la drosophile ne sont pas converties en forme oxydase (XO) (Nishino et *al.*, 1997).

**- Réversible**

La conversion procède par oxydation des résidus sulfhydrile (SH) (**Figure 4**) en utilisant des solvants organiques ou par incubation anaérobique. Cette conversion est accomplie par modification de cystéine : Cys 535 et Cys 992 (Enorth et *al.*, 2000).



**Figure 4:** Conversion de la xanthine déshydrogénase (XDH) en xanthine oxydase (XO) (Martelin, 2004).

La XOR peut réagir avec plusieurs substrats dont les purines, les pyrimidines et les ptérines. La propriété catalytique principale la plus connue est le catabolisme des purines où elle convertit l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique qui est le produit final du catabolisme des purines chez l'Homme (Krenitsky et *al.*, 1974). En outre, cette réaction est accompagnée de la production de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, d'où le rôle attribué à la XOR dans le stress oxydatif (Parks et *al.*, 1986).

La XOR intervient aussi sur un autre aspect en utilisant le NADH comme substrat. En effet, la XOR catalyse la transformation du NADH en NAD<sup>+</sup> tout en produisant des radicaux libres (Atmani et *al.*, 2005). L'avantage de cette deuxième voie est qu'elle peut être mise en place sans conversion de la XDH en XO, puisque la XDH dégrade le NADH aussi bien que la XO.

La XOR existe chez les mammifères sous forme déshydrogénase, mais peut être convertie sous forme oxydase soit d'une manière irréversible ou réversible. Les réactions des deux enzymes impliquent des substrats analogues avec des accepteurs d'électrons différents (Engerson et *al.*, 1987).

La différence est observée au niveau du cofacteur flavine et ses accepteurs d'électrons, la XO accepte l'O<sub>2</sub> comme substrat réducteur tandis que la XDH utilise le NAD<sup>+</sup>. Le site de liaison NAD situé à côté de la flavine est instable chez la XO ; en revanche il est stable chez la XDH (Mc Manaman et *al.*, 1996).

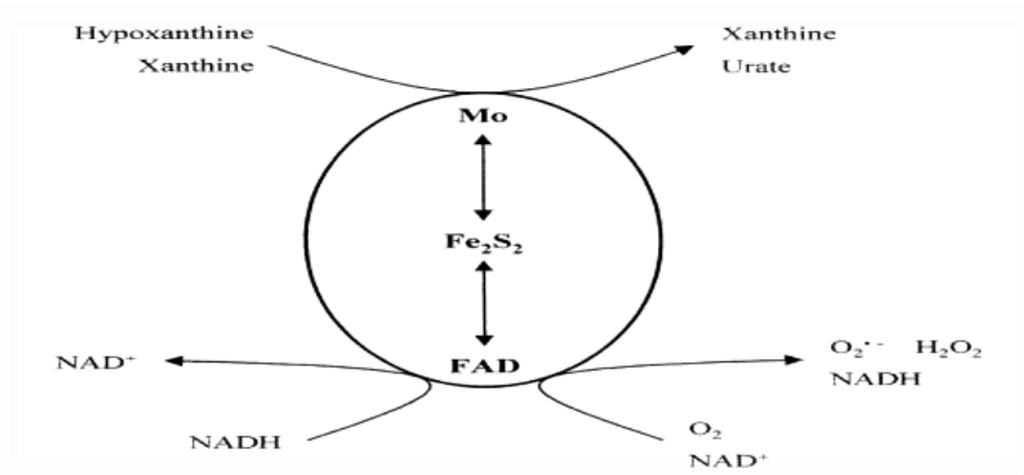
### **I.5- Structure de la xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO)**

La différence des propriétés entre XDH et XO est principalement due aux différences de réactivité du cofacteur flavine avec ses accepteurs d'électron, la XO utilise l'O<sub>2</sub> et la XDH utilise préférentiellement le NAD<sup>+</sup> comme substrat d'oxydation.

Le site de liaison NAD est localisé à coté de la flavine, ce dernier étant stable dans la déshydrogénase et instable dans l'oxydase (Mc Manaman et *al.*, 1996) (**Figure 5**).

L'enzyme ou la flavine à l'état FADH réagit avec l'O<sub>2</sub> et génère l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, par contre si l'enzyme contient essentiellement du FADH<sub>2</sub>, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est produit. La réaction lente de la flavine avec l'O<sub>2</sub> et la formation du superoxyde par cette XDH est inhibée par le NAD (Massey et *al.*, 1988).

*In vivo*, la forme réduite prédomine dans le foie et la forme oxydée dans les vaisseaux (Mc Manaman et *al.*, 1996).



**Figure 5:** L'oxydation des substrats au niveau des deux sites Mo et FAD de la XOR (Harrison, 2002).

### I.6- Rôle de la xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase assure la protection de l'organisme en produisant des ERO, mais un excès de ces dernières causes de diverses pathologies.

#### I.6.1- Rôle physiologique

La xanthine oxydoréductase est une enzyme qui a une propriété catalytique très importante dans le catabolisme des purines en urate.

La XOR a des propriétés antimicrobiennes par sa capacité d'inhiber la croissance bactérienne.

Une activité anti-oxydante est attribuée à l'enzyme par le biais de la production de l'urate. La XOR est suggérée d'avoir un rôle dans d'autres processus physiologiques tel que les mécanismes de transduction du signal (Meneshian et Bulkley, 2002).

La XOR est également une source importante des ERO tels que l' $O_2^{\bullet-}$  et le  $H_2O_2$  (**Figure 6**). Ces deux espèces oxygénées peuvent être par la suite des précurseurs des autres espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERN) qui sont impliquées dans beaucoup de dommages cellulaires et tissulaires. Ces espèces réactives peuvent induire un changement structural des molécules biologiques; les lipides, les protéines et l'ADN. La XOR joue un rôle important dans différentes formes de pathologies humaines telles que les maladies inflammatoires, les lésions post-ischémiques, les dommages tissulaires vasculaires et les maladies cardiaques chroniques (Pacher et *al.*, 2006).

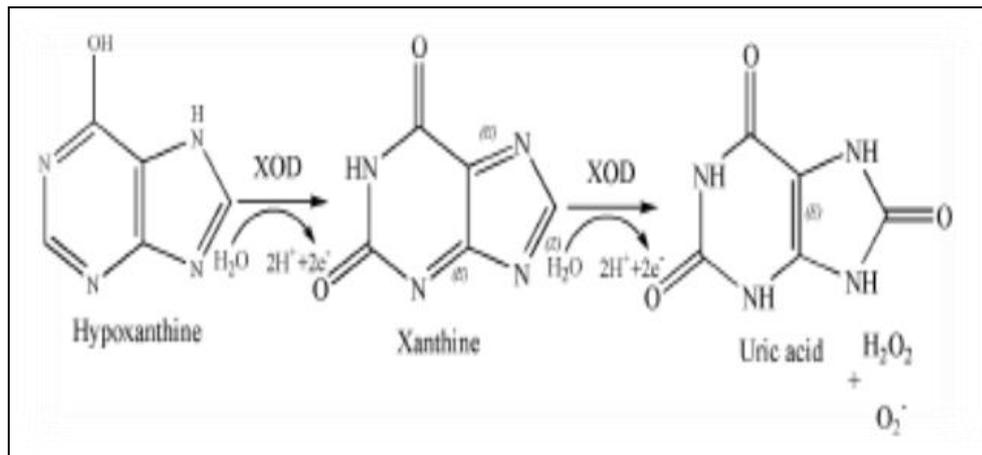


Figure 6 : Schéma montrant l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique (Kalra et al., 2007).

I.6.2- Rôle pathologique

Le système enzymatique xanthine / xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique. La production d'espèces réactives de l'oxygène par la xanthine oxydase est faible en condition basale, mais joue un rôle important lors de l'ischémie-réperfusion (Ling, 2001) (Figure 7).

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande en ATP et déficit en oxygène, notamment lors d'ischémie-réperfusion ou d'hypoxie. Pendant cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Garait, 2006).

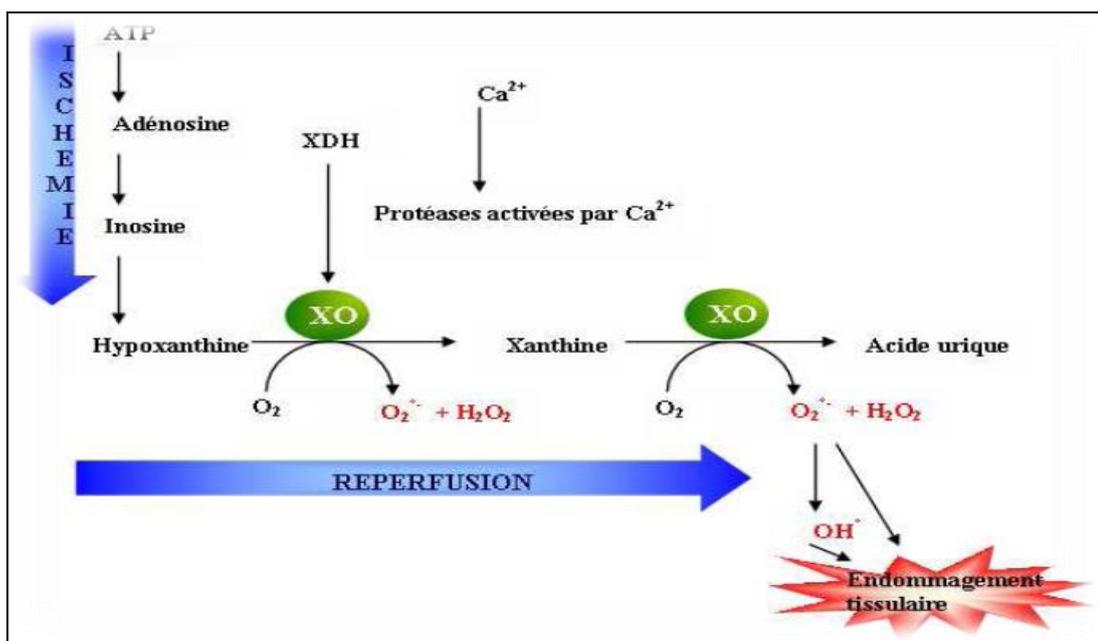


Figure 7 : Mécanisme de génération des ERO par la XOR dans les tissus lors du processus d'ischémie/réperfusion (Harrison, 2002).

**I.7- Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux qui ne sont pas essentiels à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal. Cependant, ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (Desjardin, 2008). Les polyphénols sont subdivisée en plusieurs catégories qui sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins (issus de la polymérisation des flavonoïdes) et les lignanes (Martin et *al.*, 2002).

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarettes, polluants, infections,...) qui favorisent le vieillissement cellulaire. Ingérés avec nos aliments, ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (lipides et autres macromolécules) contre le stress oxydant et préviendraient ainsi les diverses maladies chroniques associées, telle que le cancer, les maladies cardio-vasculaires ou l'ostéoporose. Ils peuvent aussi interagir de manière spécifique avec des récepteurs cellulaires tels que les récepteurs des œstrogènes et induire ainsi des effets plus spécifiques sur l'organisme (Scalbert et *al.*, 2004).

**I.7.1- Classification**

On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base.

**I.7.1.1- Les phénols simples**

Ce sont les formes phénoliques les plus simples qui présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C6 aux acides hydroxycinnamiques (C6-C3) et à des molécules proches (Macheix et *al.*, 2005).

Les dérivés hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérive de l'acide cinnamique, l'ensemble de ce groupe est souvent rapporté sous la dénomination commune de phénylpropanoïde.

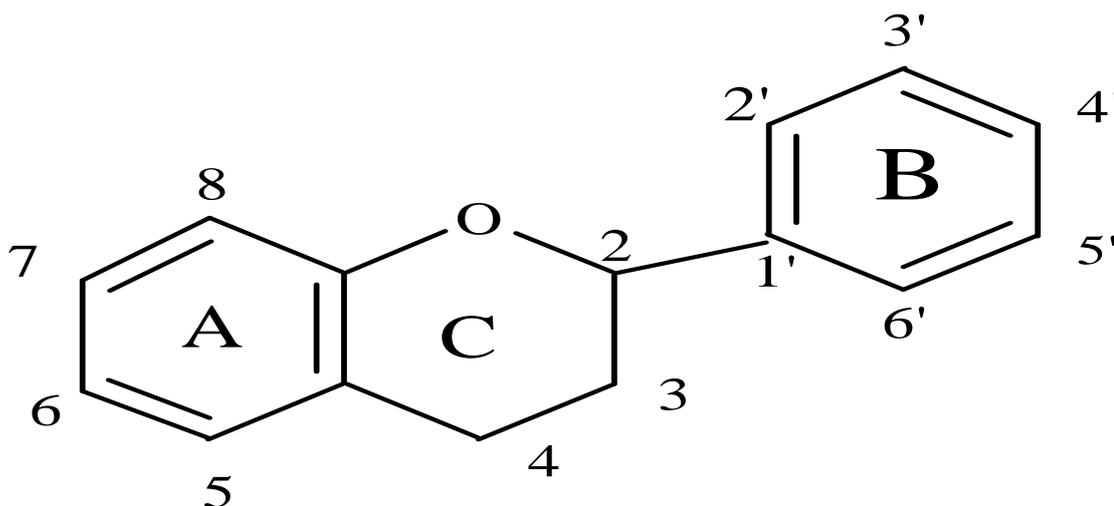
Ils sont les plus abondants des composés phénoliques simple, et leur présence dans le règne végétal est généralement à l'état d'ester avec d'autres molécules organiques tels que les glucides (Macheix et *al.*, 2005).

Les coumarines sont des composés qui dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de leur chaîne latérale. Ils sont les moins réponsus des deux premiers et leur répartition dans la nature est assez limitée. Le composé le plus fréquent est l'ombelliférone (Bruneton, 1999).

### I.7.1.2- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 8 000 composés naturels, qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent les pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005).

Ils sont formés à partir de la phénylalanine et de la tyrosine. La structure de base du flavonoïde est le noyau flavan, qui est composé de 15 atomes de carbone arrangés dans trois noyaux (C6-C3-C6) (**Figure 8**), qui se présente par A, B, et C (Pietta, 2000) (**Tableau I**).



**Figure 8:** Structure de base des flavonoïdes (Pietta, 2000).

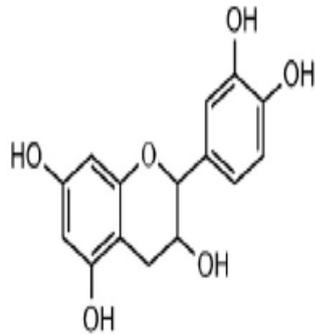
A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions sont alors glycosylés (Havsteen, 2002).

La structure de l'hétérocycle central <<C >> et son degré d'oxydation, ainsi que les positions des groupements hydroxyles sur les noyaux <<A>> et <<B>>, permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes (Pietta, 2000 ; Macheix et *al.*, 2005). On distingue : Flavonols, flavones, flavan-3-ols, isoflavines, flavanones, chalcones et les auronnes.

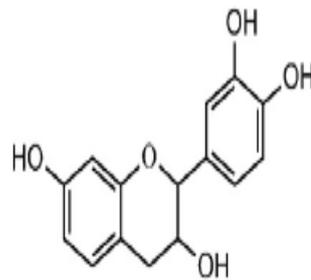
### I.7.1.3- Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 KDa. Classiquement on distingue deux groupes de tanins : les tanins hydrosolubles comme l'acide gallique et les tanins condensés comme la catéchine, qui diffèrent par leur structure et leur origine biogénétique (**Figure 9**). Ils sont d'une extrême diversité dont les propriétés tannantes sont basées sur le fait qu'ils précipitent de leurs solutions aqueuses certaines protéines de la peau, en particulier la gélatine (Cuirs et peaux, 1947).

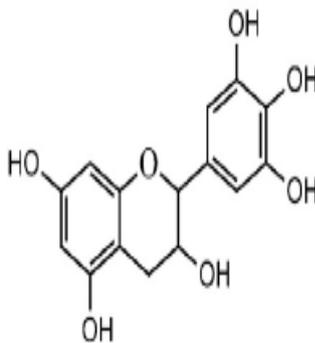
La durabilité tient avant tout à la présence dans le bois de matières antiseptiques, soit naturelles telles que les tanins (châtaignier, chêne), les résines (pin maritime, cèdre), les oléorésines (essences coloniales); soit artificielles telles que les sels antiseptiques (Salunkhe et *al.*, 1990).



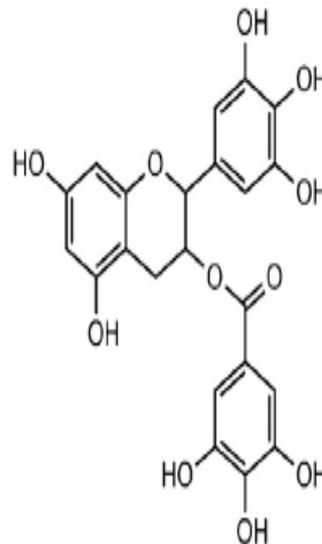
A.) Catechin,  $[M+Na]^+ = 313.25$  Da



B.) Fisetinidin,  $[M+Na]^+ = 297.25$  Da



C.) Gallocatechin,  $[M+Na]^+ = 329.25$  Da

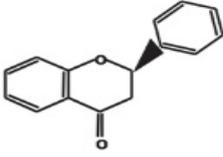
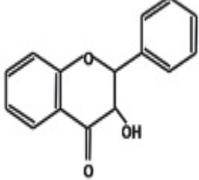
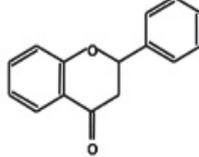
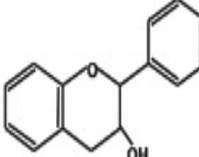
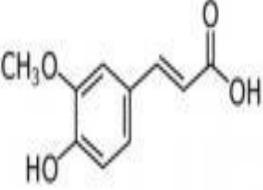
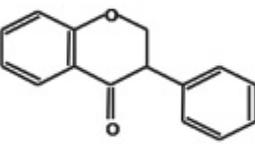


D.) Gallocatechin-3-O-gallate,  $[M+Na]^+ = 481.35$  Da

**Figure 9:** La structure des monomères des tanins (Low et *al.*, 2015).

La classification ci-après est basée sur le nombre de carbones dans le squelette de la molécule (Pravo, 1998) (**Tableau I**).

**Tableau I:** Classification des polyphénols (Hooper et al., 2008).

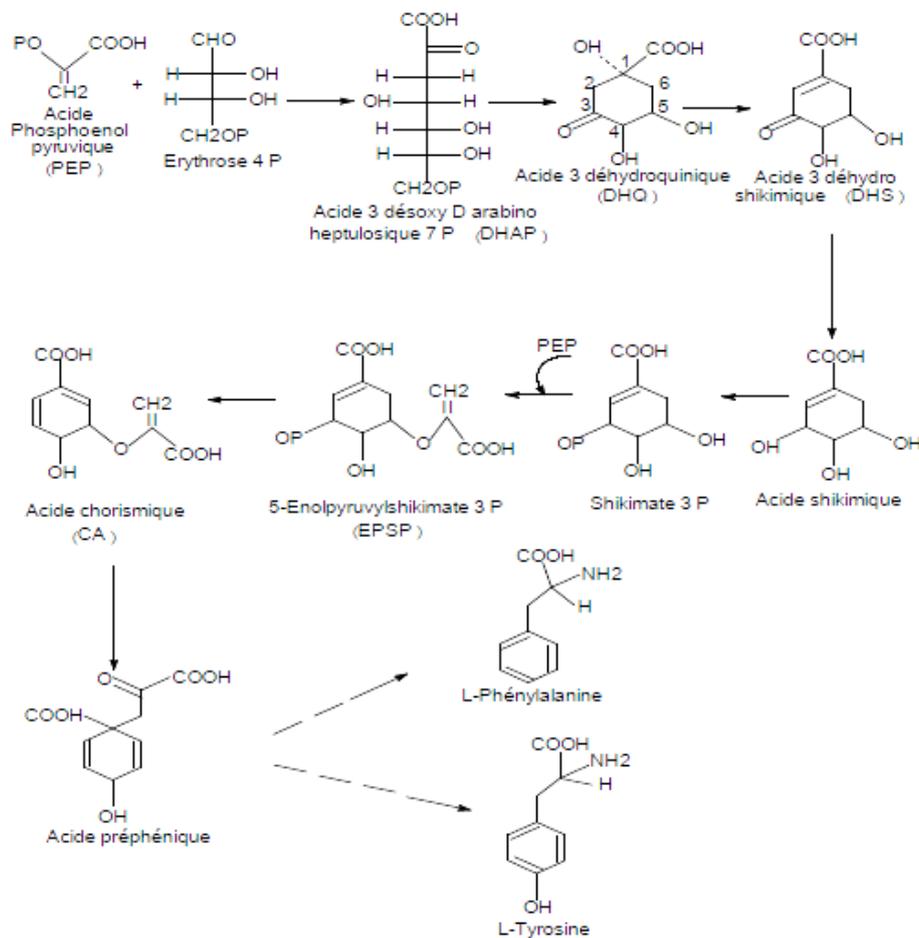
Les classes principales des flavonoïdes	Structures	Membres de la famille	Les sources alimentaires
Flavanones		Naringénine, hesperétine, Eriodictyole	agrumes, tomates
Flavonols		Quercétine, myricétine, isorhamnétine, kaempférol, pachypodole, rhamnazine	Oignons, pommes, brocoli, canneberges, baies, raisins, le persil, épinards
Flavones		Apigénine, nobilétine, tangerétine, lutéoline	Céleri, la laitue, le persil, agrumes, betteraves, cloche poivrons, les épinards, Choux de Bruxelles, le thym
Flavan-3-ols		Catéchine, épigallocatechine gallate, épicatechine, épicatechine gallate	Thé, le vin rouge, le cacao, raisins, prunes, fruits, légumineuses
Acide phénolique		Acide gallique, acide caféique, Acide ferulique	Romarin, Basilic Méliot, Myrtille Sarriette, Reine des prés, Aronia
Isoflavones (iso flavonoïdes)		Daidzéine, genistéine, glycitéine	Les produits de soja, trèfle rouge

**I.8- Biosynthèse**

La biosynthèse des polyphénols s’effectue à travers plusieurs voies, qui sont classées comme suit :

**I.8.1- Voie des shikimates**

C’est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques (la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane) (**Figure 10**). Les acides aminés aromatiques sont, quant à eux, synthétisés à partir du phosphoenol pyruvate et de l’érythrose-4-phosphate au cours d’une succession de réactions appelées voie de l’acide shikimique (Hopkins, 2003).



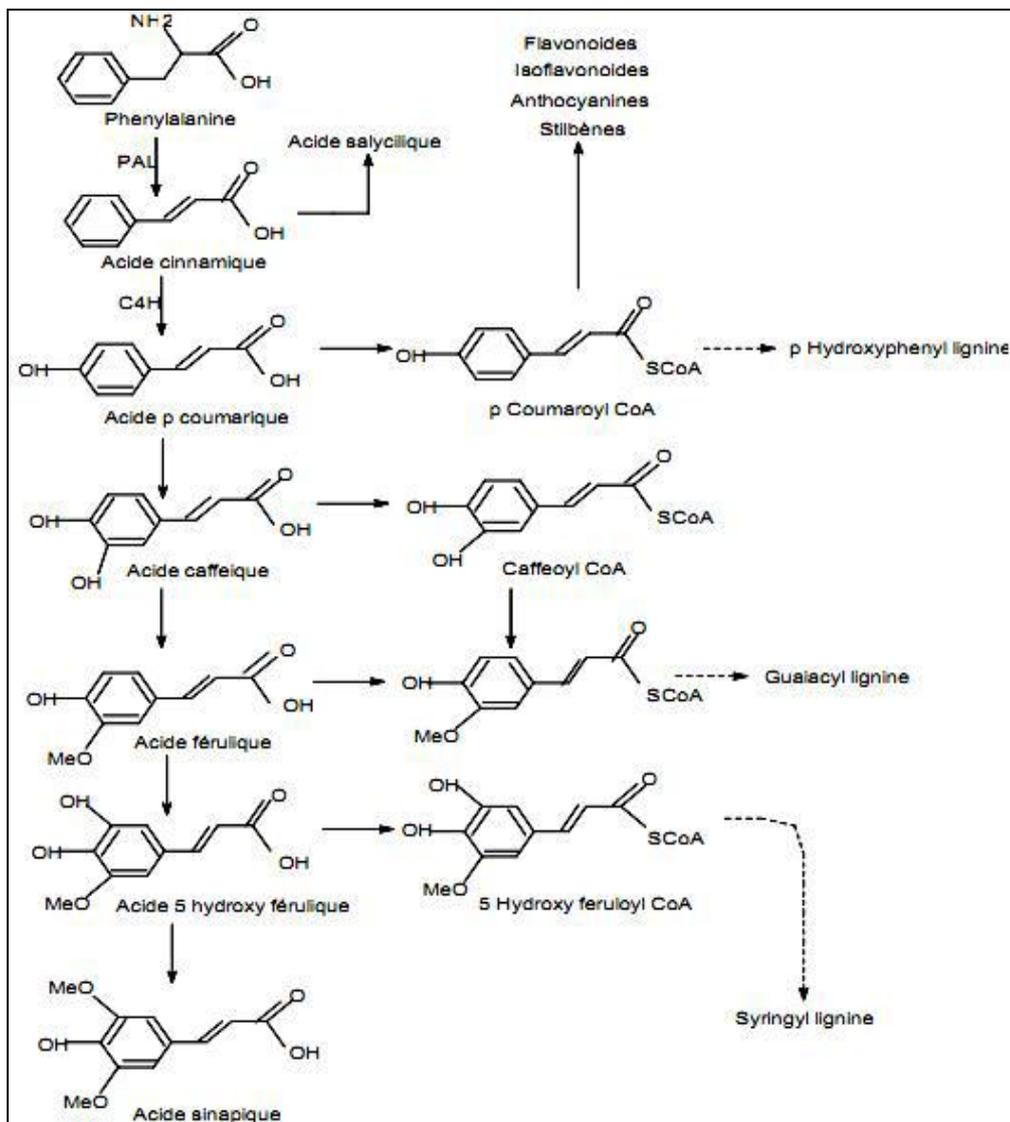
**Figure 10** : La biosynthèse des composés phénoliques par la voie de shikimate (Floss, 1997).

**I.8.2- La voie de polyacétate**

C’est la deuxième voie de biosynthèse, la plus fréquente chez les bactéries, champignons et plantes inférieures. Elle consiste à réaliser non plus un seul noyau benzénique, mais un ensemble de noyaux aromatiques par cyclisation d’une chaîne polycétonique, elle-même obtenue par condensation de groupement acétate (Buchanan et al., 2000).

**I.8.3- La voie de phénylpropanoïde**

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose (Portes, 2008) (**Figure 11**).



**Figure 11** : La biosynthèse des composés phénoliques par la voie de phénylalanine (Mouffok, 2011).

**I.8.4- La voie de biosynthèse des flavonoïdes**

Les flavonoïdes se trouvent d'une manière systématique dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (**Figure 12**). Ils possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune (Maamri, 2008).

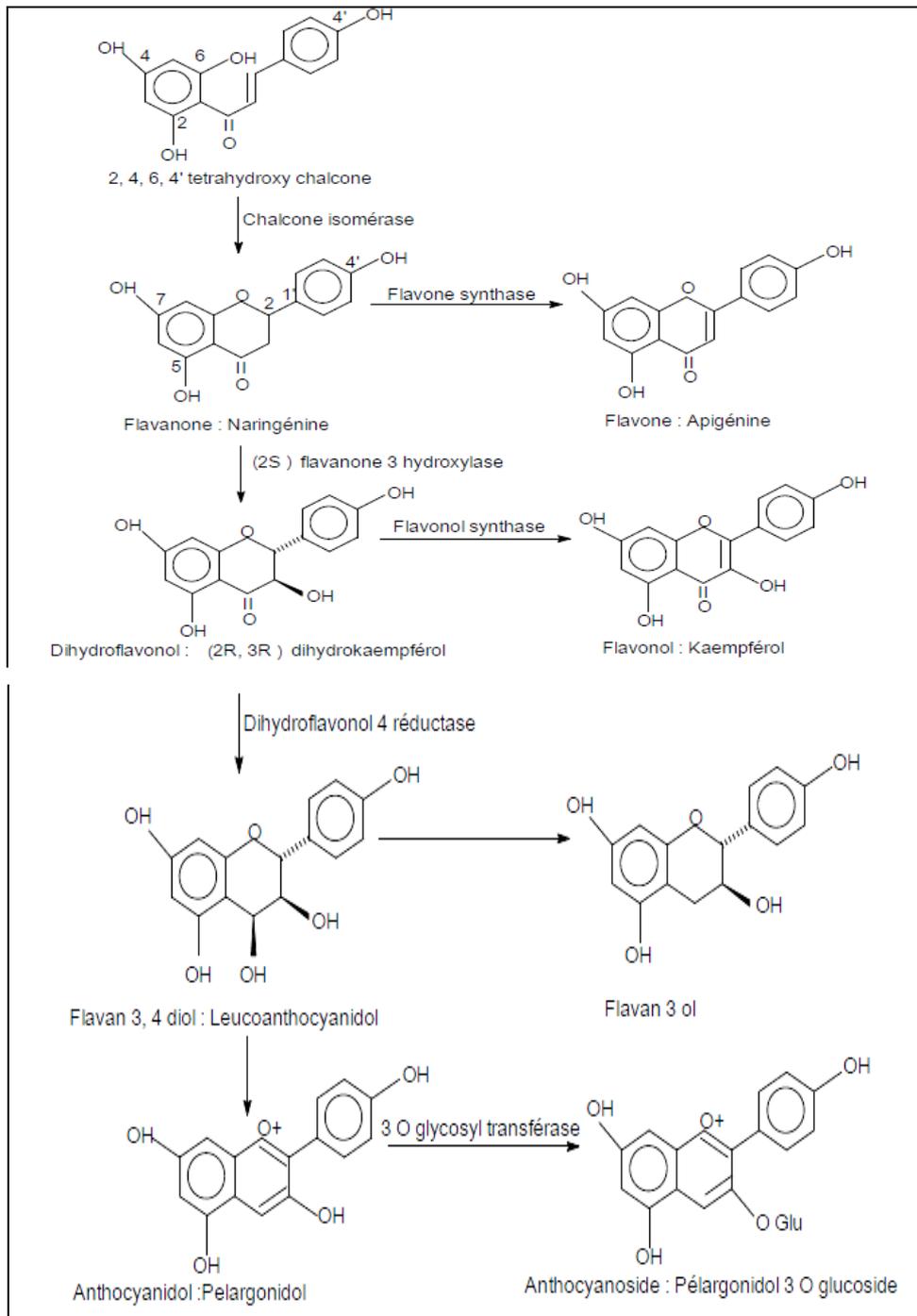


Figure 12 : la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Subsamanian et al., 2007).

### I.9- Rôle biologiques des composés phénoliques

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait, sont des éléments faisant partie de l'alimentation. A titre d'exemple, l'Homme consomme jusqu'à 10g de ces composés par jour. Ces substances sont largement utilisées en thérapeutique comme anti-inflammatoires, antiallergiques, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, antiulcéreux, anti-tumoraux, antimicrobiens et anti-radicalaires (Bahorun, 1997).

**I.10- Inhibition des enzymes tels que la Xanthine oxydase**

Les inhibiteurs de la XO furent utilisés pour le traitement des différentes pathologies liées à la xanthine oxydase, dont beaucoup de recherches ont été entreprises pour identifier des inhibiteurs qui sont obtenus soit par synthèse chimique ou par simple extraction à partir des sources naturelles (Macheix, 2005).

**I.10.1- Les composés phénoliques****I.10.1.1- Les flavonoïdes**

Les recherches dirigées vers les inhibiteurs de la XOR d'origine naturelle ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte et l'hyper uricémie en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et des ERO dérivées de la XO (Karmella et *al.*, 2011).

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant, par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer et le cuivre (empêchant ainsi la réaction de Fenton) ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ERO comme la xanthine oxydase (Karmella et *al.*, 2011).

Les résultats de relation structure des flavonoïdes/activité inhibitrice de la XO ont émis les conclusions suivantes :

- Seuls les flavonols et les flavones ont la capacité d'inactiver la XO. Cette inhibition est due à la présence de la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>. Les flavanones, les dihydroflavonols, les flavan-3-ols et les flavan-3-4-diols n'ont aucun effet sur l'activité de la XO (Middleton et *al.*, 2000).
- En comparant les activités des flavones et de leurs analogues flavonols, il a été observé que l'absence du groupe hydroxyle en C<sub>3</sub> augmente légèrement l'activité, qui peut être expliqué par la déstabilisation au niveau de la polarité du groupement OH dans la région hydrophobe du site actif qui engendre la diminution de l'affinité de liaison (Lin et *al.*, 2002).
- Les chercheurs ont pu mettre en évidence l'importance des groupements hydroxyles en C<sub>7</sub> et C<sub>5</sub> ainsi que les groupements carbonyles en C<sub>4</sub> qui participent principalement aux liaisons hydrogènes et aux interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et le site actif de la XO. (Chun et *al.*, 2002 ; da Silva et *al.*, 2004).
- Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés. Une substitution glycosyl en position C<sub>6</sub> dans le noyau benzopyranone (cas de l'isovitexine) empêche son interaction avec le site actif de la XO en raison de la taille volumineuse du groupement glycosyl (Lin et *al.*, 2002).

- La flavone, la 4'-hydroxyflavone et la naringénine sont incapables d'inhiber la production de l'acide urique. Il est donc possible qu'une structure plane soit importante pour l'inhibition de la XO.
- Toutes les flavones ont montré des activités presque similaires quelque soit les substituant du cycle B, indiquant que le cycle B n'a que peu d'influence sur l'inhibition de l'enzyme par les flavones (Cos, 1998).

### **I.10.1.2- Les coumarines**

La présence de groupement 7 hydroxyle ainsi que la double liaison dans la structure des coumarines jouent un rôle prépondérant dans l'activité inhibitrice de ces composés sur la XO, alors que le groupement 6-hydroxyle amplifie cet effet, et toute substitution en position C<sub>6</sub> ou C<sub>7</sub> réduit cette activité inhibitrice, cette réduction dépend de la nature des substitutions (méthyle ou glycosyle) (Chang et *al.*, 1995).

Le groupement OH présente un rôle important dans l'inhibition de la XO. L'esculetine, l'umbelliférone (7-hydroxycoumarine) et le 7-hydro-4-methylcoumarine présentent l'activité inhibitrice la plus élevée en comparaison à d'autres composés coumariques.

La présence du groupement OH sur le C<sub>6</sub> du 7-hydroxycoumarine donne naissance à l'esculetine (6,7-dihydroxycoumarine) qui montre une inhibition plus forte vis-à-vis de la XO, tandis que la méthylation du groupement OH en C<sub>6</sub> qui donne la scopoletine, réduit l'action inhibitrice. L'inhibition de la XO est influencée par le type de substitution à la position C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>3</sub>, du 7-hydroxycoumarine qui réduit cette activité inhibitrice (Lin et *al.*, 2008).

L'esculetine est un inhibiteur compétitif ; sa fixation au niveau du centre Mo lui confère la forte action inhibitrice sur la XO. L'acide caféique, agit comme un inhibiteur non compétitif de la XO en se fixant sur le centre Fe /S (Chan et *al.*, 1995).

### **I.10.1.3- Les tannins**

Les tannins possèdent une activité inhibitrice de la XOR, qui varie selon le type du tannin ; les tannins hydrolysables monomériques inhibent fortement l'activité de la XO et cette inhibition augmente proportionnellement avec l'augmentation de leur poids moléculaire qui est accompagnée d'une augmentation dans le nombre des groupements hydroxyles portés par le noyau phénolique (Macheix, 2005), cependant les tannins hydrolysables dimériques ne montrent pas une activité inhibitrice élevée. Cette réduction dans l'activité inhibitrice des tannins est étroitement liée à l'augmentation de la rigidité de la molécule en raison des substitutions (Hatano, 1990).

**I.10.2- L'acide urique**

L'acide urique est un inhibiteur compétitif de la XOR car c'est un analogue structural du substrat. L'acide urique favorise la réoxydation de la XOR, la fixation de l'acide urique à la forme Mo (réduite) provoque une augmentation dans le potentiel redox du site Mo. La formation du complexe inhibiteur abortif (EH<sub>2</sub>P) induit un changement dans le gradient redox, qui va provoquer une diminution du flux d'électrons à partir du site Mo au FAD et par conséquent, l'O<sub>2</sub> va être réduit en O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Radi et *al.*, 1992).

# ***CHAPITRE II***

## ***MATERIELS ET METHODES***

**II.1- Matériel et méthodes****II.1.1- Matériels**

- ✓ Micropipete, Bain marie.
- ✓ Vortex, Plaque agitatrice.
- ✓ Balance électronique de marque RADWAG.
- ✓ Colonne Séphadex G<sub>25</sub>.
- ✓ Spectrophotomètre, pH mètre, Cuve en quartz.
- ✓ Baron magnétique, Béchers.

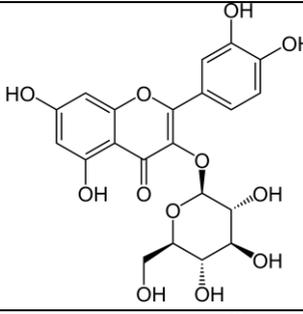
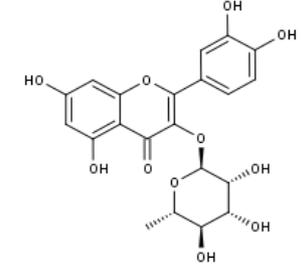
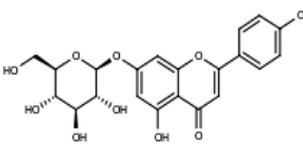
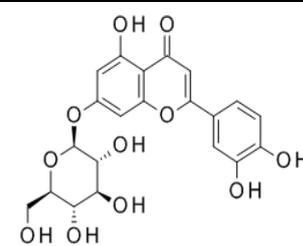
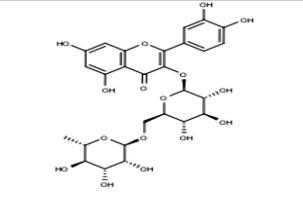
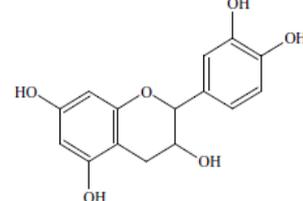
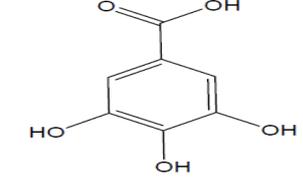
**II.1.2- Réactifs**

- ✓ NADH
- ✓ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ✓ DTT
- ✓ DMSO
- ✓ Polyéthylène glycol
- ✓ HCl
- ✓ EDTA
- ✓ Eau distillés
- ✓ XDH
- ✓ Ethanol

**II.1.3- Composés phénoliques purs utilisés**

Sept molécules pures ont fait l'objet de notre étude, cinq d'entre elles ont été purifiées par HPLC préparative et identifiées par résonance magnétique nucléaire (RMN) à partir de l'extrait aqueux chloroforme de *Galium mollugo*, leurs structures et leurs rôles sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau II:** Classification des molécules pures utilisées.

Les molécules pures utilisées	Les classes	Les structures	Les rôles	Les références
<b>Quercetine 3-O-glucoside</b>	Flavonols		-Activité anticancéreuse -Activité antivirale -Inhibition de la xanthine oxydase	(Cowan, 1999 ; Middleton et <i>al.</i> , 2000 ; Wach et <i>al.</i> , 2007).
<b>Quercetine 3-O-rhamnoside (Quercitrine)</b>	Flavonols		-Activité antioxydante, Agent antileishmanien, et joue un rôle de métabolite.	Dai X, Ding Y, Zhang Z, Cai X and Li Y (2013).
<b>Apigénine-O-7-glucoside</b>	Flavones		-a des propriétés anti-inflammatoires -est un potentiel inhibiteur du Cytochrome P450.	(Si Dayong et <i>al.</i> , 2009)
<b>Luteoline-7-glucoside</b>	Flavones		Activité antioxydante, anti-inflammatoire, anti-cancéreuse et régulatrice du système immunitaire.	( <u>Saebyeol Jang</u> et <i>al.</i> , 2008).
<b>Quercetine 3-O-rutinoside (Rutine)</b>	Flavonol glycosylé		Utilisé dans le trouble de champ visuel d'origine vasculaire.	(Bruneton, 1999 ; Nijveldt et <i>al.</i> , 2001).
<b>Catéchine</b>	Flavan-3-ols		-Activité antimicrobienne et anti virale ; -Inactive les toxines de choléra dans vibrio	(Cowan, 1999 ; Manach et <i>al.</i> , 2004).
<b>Acide gallique</b>	Acides hydroxy-benzoïques		Activité antibactérienne, antiseptique.	(Manach et <i>al.</i> , 2004 ; Abdelwahed et <i>al.</i> , 2007).

**II.1.2- Méthodes****II.1.2.1- Préparation de la solution tampon**

Tampon phosphate (20 mM, pH : 7).

**II.1.2.2- Préparation de la solution de substrat (NADH)**

NADH a été dissous dans un volume de la solution tampon phosphate.

**II.1.2.3-Préparation de la forme déshydrogénase de la xanthine oxydoréductase**

La forme déshydrogénase peut être obtenue par la réduction réversible des groupes sulfhydryles oxydés de la xanthine oxydase (XO).

La XOR purifiée a été incubée avec dithiothreitol (10 mM), pendant 1 h à 37°C avant chaque expérience, puis passée à travers une colonne de Séphadex G-25, préalablement lavée avec un tampon phosphate (20 mM, pH 7) pour enlever le DTT.

**II.1.2.4- Effet des molécules pures sur l'activité NADH oxydase de la xanthine oxydoréductase**

L'effet des molécules purifiées à partir de l'extrait aqueux de *Galium mollugo* sur l'activité NADH oxydase de la XOR a été étudié spectrophotométriquement à 340 nm sous des conditions aérobiques. Le mélange réactionnel consiste de 1760 µl de tampon phosphate (20 mM, pH 7), 200 µl de solution NADH (1 mM) et 20 µl de solution de l'extrait dissout dans le DMSO. La réaction est initiée par l'addition de 20 µl d'enzyme (8,3 mg/ml) et la disparition de NADH a été mesurée à 340 nm chaque 3 secondes pendant 3 minutes contre un blanc qui ne contient pas de molécule.

Le test d'activité est préparé comme précédemment mais contenant la solution DMSO sans l'extrait. Les tests ont été répétés trois fois. L'activité inhibitrice de la XDH exprimée en pourcentage, calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = (1 - (\Delta A / \text{min}_{\text{test}} / \Delta A / \text{min}_{\text{blanc}})) 100$$

$\Delta A_{\text{blanc}}$  : le changement de l'absorbance par minute du blanc sans l'extrait ou l'inhibiteur ( $\Delta \text{abs. avec enzyme} - \Delta \text{abs. sans enzyme}$ ).

$\Delta A_{\text{test}}$  : le changement de l'absorbance par minute du test avec l'extrait ou l'inhibiteur ( $\Delta \text{abs. avec enzyme} - \Delta \text{abs. sans enzyme}$ ).

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ont été calculées à partir de la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.

**II.1.2.5- Détermination du type d'inhibition**

Le mode d'inhibition de l'extrait testé ayant exhibé une activité inhibitrice élevée sur la XDH a été déterminé par le graphe de Lineweaver-Burk utilisant différentes concentrations (écart type ,n=3) de NADH et de Blanc (125, 100, 75, 50, 25 µM).

**II.1.2.6- Analyse des résultats en fonction des concentrations**

Les résultats sont exprimés comme la moyenne des trois mesures parallèles ±SD. Pour la détermination des IC<sub>50</sub>, différentes concentrations 100, 75, 50, 25 µg/ml ont été testées pour les extraits ayant donné une bonne activité à 100µg/ml, et une seule concentration de substrat. L' IC<sub>50</sub> a été calculée en utilisant le logiciel OriginPro7.5.

**II.1.2.7- Analyse statistique**

Tous les résultats expérimentaux ont été exprimés comme moyenne ± écart type. Les différences entre les groupes ont été déterminées en utilisant le logiciel Graph Pad en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test Student Newman-Keuls pour une analyse post hoc. Les différences sont significative à p<0,05.

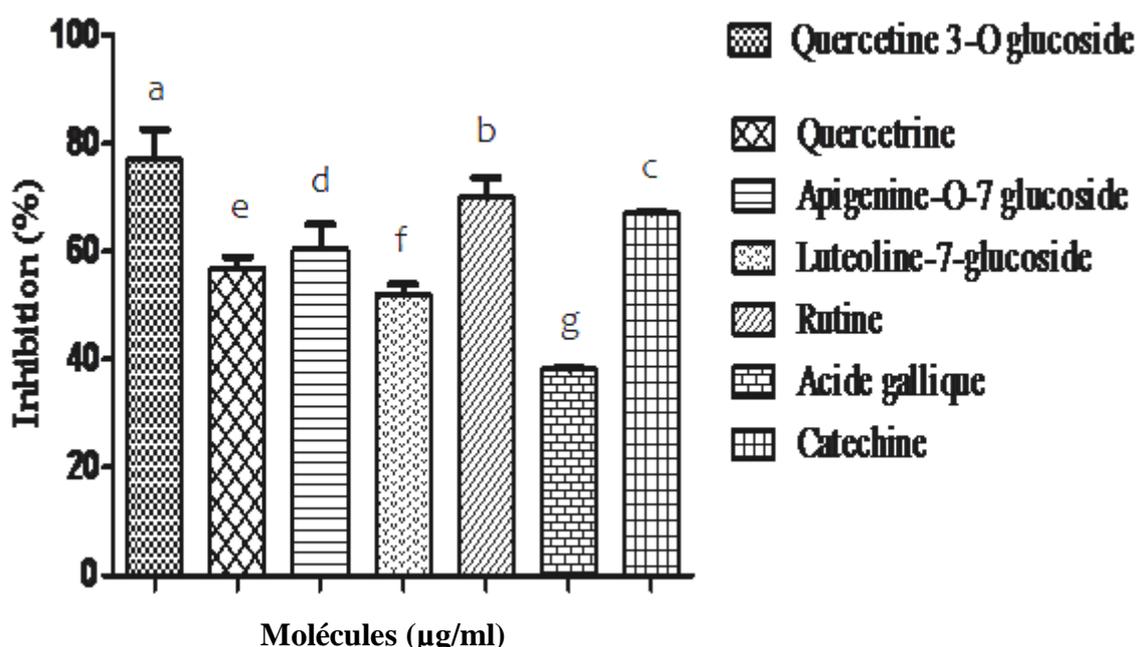
# ***CHAPITRE III***

## ***RESULTATS ET DISCUSSIONS***

### III.1- Résultats et discussions

#### III.1.1- Inhibition de l'activité NADH oxydase par les molécules pures

Une étude réalisée sur l'effet de l'activité anti-NADH oxydase des extraits aqueux de *Galium mollugo*, indique que l'extrait aqueux de chloroforme a exhibé le meilleur pouvoir inhibiteur ( $88,72\pm 0,8\%$ ) par rapport aux autres extraits testés. Pour cela un fractionnement par HPLC-préparative a été réalisé sur cet extrait poursuivi d'une identification par RMN. Les résultats d'inhibition des composés majoritaire et deux autres molécules synthétiques sur l'activité NADH oxydase sont illustres dans la figure 13.



**Figure 13 :** Inhibition de l'activité anti-NADH oxydase des molécules pures a 50µg/ml.

Selon la (Figure 13) la majorité des molécules exhibent un bon pouvoir inhibiteur dépassant 50% à 50 µg/ml. La meilleure activité est exhibée par la quercétine 3-O-glucoside ( $77,07\pm 5,43\%$ ) qui est supérieur à celle enregistré par la rutine, acide gallique et catéchine ( $70\pm 3,62$ ,  $38,28\pm 0,37$  et  $66,94\pm 0,44\%$ , respectivement), suivie par l'apigenine-O-7-glucoside ( $60,48\pm 4,58\%$ ), la quercitrine ( $56,84\pm 2,12\%$ ) et la luteoline- 7- glucoside ( $51,99\pm 1,94\%$ ). Ces activités sont significativement ( $p<0,05$ ).

L'inhibition de l'activité NADH oxydase peut être due à une interaction entre les composés phénoliques testés et les sites actifs de l'enzyme (Mo, Fe-S et FAD, de l'enzyme).

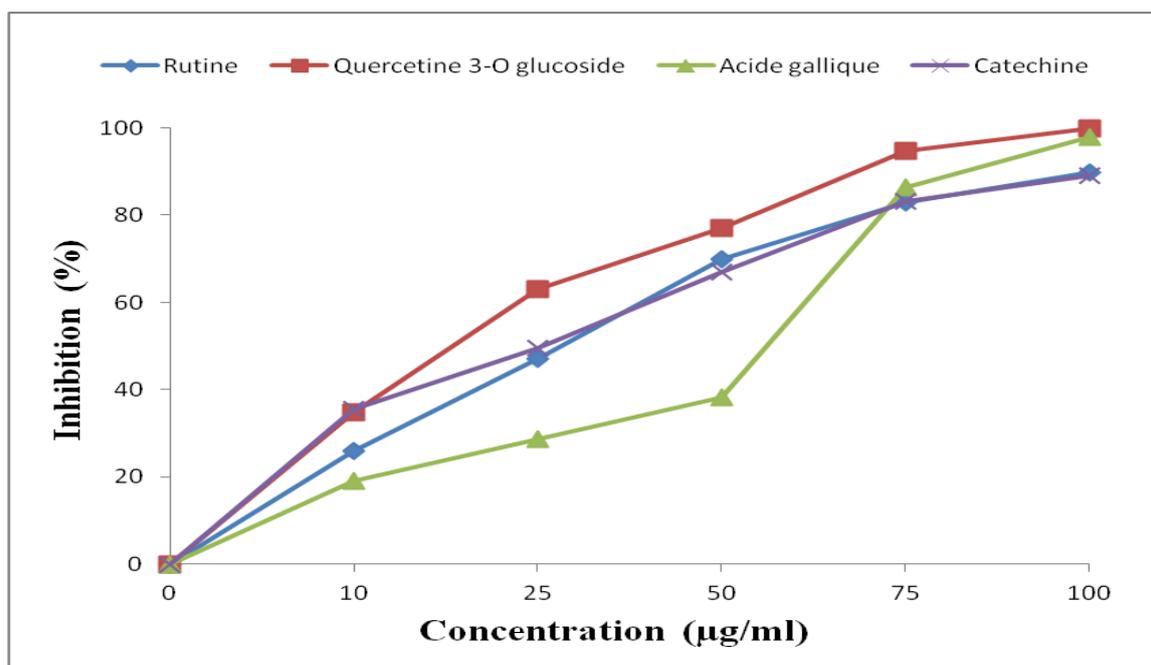
Nos résultats sont en accord par une étude menée par Hatano *et al.* (1990) qui a montré que la quercitrine est un inhibiteur potentiel de l'activité NADH oxydase suivie de l'acide gallique.

Tandis que d'autres études réalisées par Masuoka et Kubo, (2004) et Masuoka *et al.* (2006) sur l'activité inhibitrice de la XOR par les dérivés de l'acide gallique ont montrés que la présence des sites de fixation au niveau de molybdène et au niveau du site FAD et leurs chaines alkyls renforcent l'inhibition par une fixation hydrophobique à l'enzyme.

### III.1.2- L'inhibition de NADH oxydase en fonction des concentrations

Les molécules ayant données le meilleur pouvoir inhibiteur ont été testées en fonction de la concentration afin de savoir la cause de cet effet inhibiteur. On remarque bien que l'activité est dépendante de la concentration des molécules.

La Quercétine 3-O glucoside (**Figure 14**) possède un bon pouvoir inhibiteur même à une concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$  ( $63,02 \pm 4,63\%$ ) en comparaison avec la rutine, la catéchine et l'acide gallique ( $47,17 \pm 0,67$  ;  $35,66 \pm 0,21$  et  $28,62 \pm 0,06\%$ , respectivement). Les  $\text{IC}_{50}$  des molécules testées sont 28,3 ; 26,7 ; 17,14  $\mu\text{g/ml}$  pour la rutine, catéchine et quercétine, respectivement.



**Figure 14 :** L'inhibition en fonction de la concentration de l'activité anti-NADH oxydase.

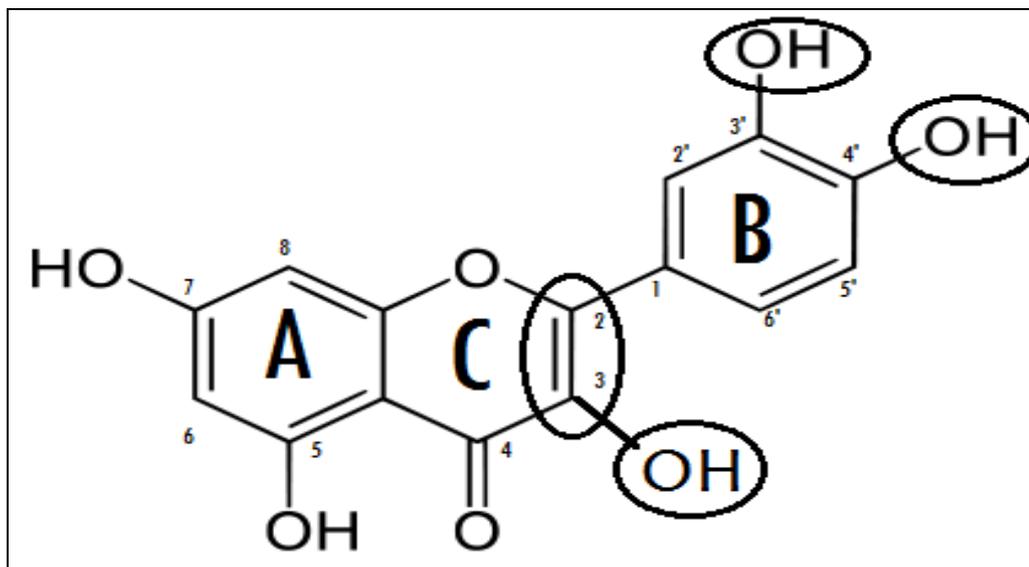
Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante et donc une bonne stabilisation de leurs formes radicalaires. C'est pourquoi les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont très souvent exprimées en termes de potentiel antiradicalaire. Ils sont des piègeurs efficaces des radicaux libres, particulièrement impliqués dans la NADH Oxydase. L'activité anti NADH oxydase est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante, ce mécanisme est lié à leurs structures et de l'arrangement des groupements hydroxyles et carbonyles (Marfak, 2003).

Des études faites sur la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres ont montré que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La présence du groupe 3OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.

A titre d'exemple, la quercétine-3-O-glucoside satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Marfak, 2003)

(Figure15).



**Figure 15** : Structures générale des flavonoïdes.

La rutine (quercétine-3-O-rutinoside) composée d'un diglycoside entre le glucose et le rhamnose, résultant ainsi une faible hydrosolubilité qui peut être la cause que la molécule est moins active que la quercétine. Et la quercitrine (quercétine-3-O-rhamnoside) composée d'un glucide qui est un rhamnose induisant ainsi une activité inhibitrice moins importante que celle enregistrée par les deux autres flavonols.

Suivie par les flavanols (catéchine) qui ont une bonne activité inhibitrice mais moins que celle de la rutine et la quercétine 3-O-glucoside, cela peut être est du au manque de double liaison au niveau C2-C3 et l'absence de la fonction carbonyle C=O en C4.

Puis les flavones (apigenine-O-7-glucoside, luteoline-7-glucoside) avec un pouvoir inhibiteur moyen par rapport a celui des flavanols et flavonols, cela peut être a cause de l'absence du groupement hydroxyle OH en C3.

Et enfin, l'acide gallique qui est un acide hydroxy-benzoïque, qui a une structure différente de la structure générale des flavonoïdes, résultant ainsi une activité inhibitrice inferieure a 50%.

On peut prévoir alors, que généralement les flavonols sont les plus actifs que les autres classes des flavonoïdes.

**III.1.3- Détermination de type d'inhibition :**

La détermination du mode d'inhibition a été réalisée par la représentation linéaire de lineweaver-burk représenté en figures 16-22. Les vitesses de réaction de chaque essai sont calculées par la moyenne des trois pentes des courbes de disparition de NADH en fonction de temps en testant l'extrait en présence de différentes concentrations de substrat (25, 50, 75, 100, 125 µM).

La représentation graphique en coordonnées inverses effectuée pour les molécules nous donne des droites qui se coupent en des points différents, ce qui montre des inhibitions différentes. Les paramètres cinétiques de l'inhibition (Km et Vmax) sont représentés dans le tableau IV et calculés selon les équations du tableau III.

**Tableau III :** Valeurs (Km' et V') des constantes cinétiques en présence d'inhibiteurs.  
(I)=Concentration d'inhibiteurs ; Ki= constante d'inhibition.

Type d'inhibition	Km'	V'
Compétitive	$Km (1 + \frac{(I)}{Ki})$	V
Non Compétitive	Km	$\frac{V}{1 + \frac{(I)}{Ki}}$
Incompétitive	$\frac{Km}{1 + \frac{(I)}{Ki}}$	$\frac{V}{1 + \frac{(I)}{Ki}}$

Tableau IV : Les valeurs Km et Vmax des molécules pures.

	Vmax	Vmax'	Km	Km'
<b>Quercétine 3-O-glucoside</b>	2,56Δ abs/S	1,28Δ abs/S	13,33 μM	66,65 μM
<b>Quercitrine</b>	3,84Δ abs/S	3,84Δ abs/S	30,30 μM	60,60 μM
<b>Apigénine- O-7-glucoside</b>	1,96Δ abs/S	0,66Δ abs/S	9,09 μM	26,90 μM
<b>Lutéoline- 7-glucoside</b>	3,33Δ abs/S	1,33Δ abs/S	24,39 μM	60,97 μM
<b>Rutine</b>	4,00Δ abs/S	3,84Δ abs/S	8,33 μM	50,00 μM
<b>Acide Gallique</b>	2,38Δ abs/S	0,70Δ abs/S	12,5 μM	42,26 μM
<b>Catéchine</b>	3,57Δ abs/S	3,06Δ abs/S	20,83 μM	20,83 μM

Nos résultats sur la quercétine 3-O-glucoside, l'apigénine-O-7-glucoside, la rutine et l'acide gallique montre une inhibition de type Incompétitive avec des Km =13,33μM, 9,09 μM, 8,33 μM et 12,5 μM respectivement et des valeurs de Vmax=2,56Δabs/S, 1.96Δabs/S, 4,00Δabs/S et 2,38Δabs/S, respectivement. Dans ce cas l'inhibiteur se fixe uniquement sur le complexe enzyme-substrat qu'il inactive, mais jamais à l'enzyme libre. L'inhibiteur (I) est fixé avec le substrat (S) dans le site actif résultant à la fois diminution de l'affinité et de la vitesse.  $K_m$  et  $V_{max}$  varient.

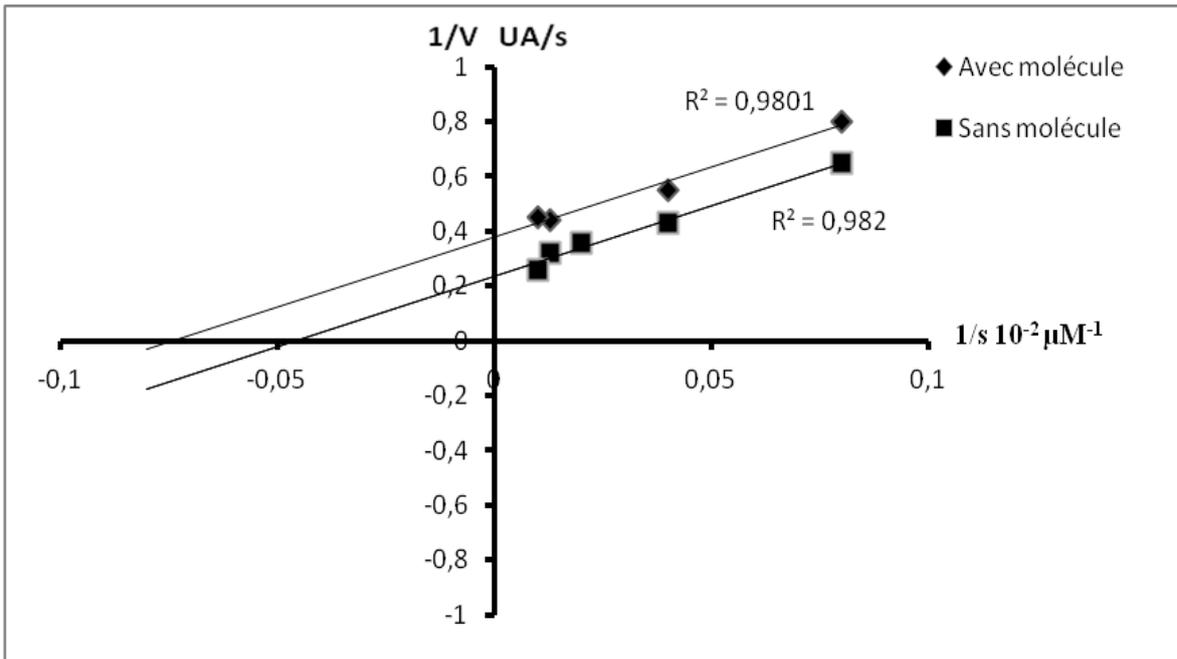


Figure 16 : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la quercetine 3-O-glucoside.

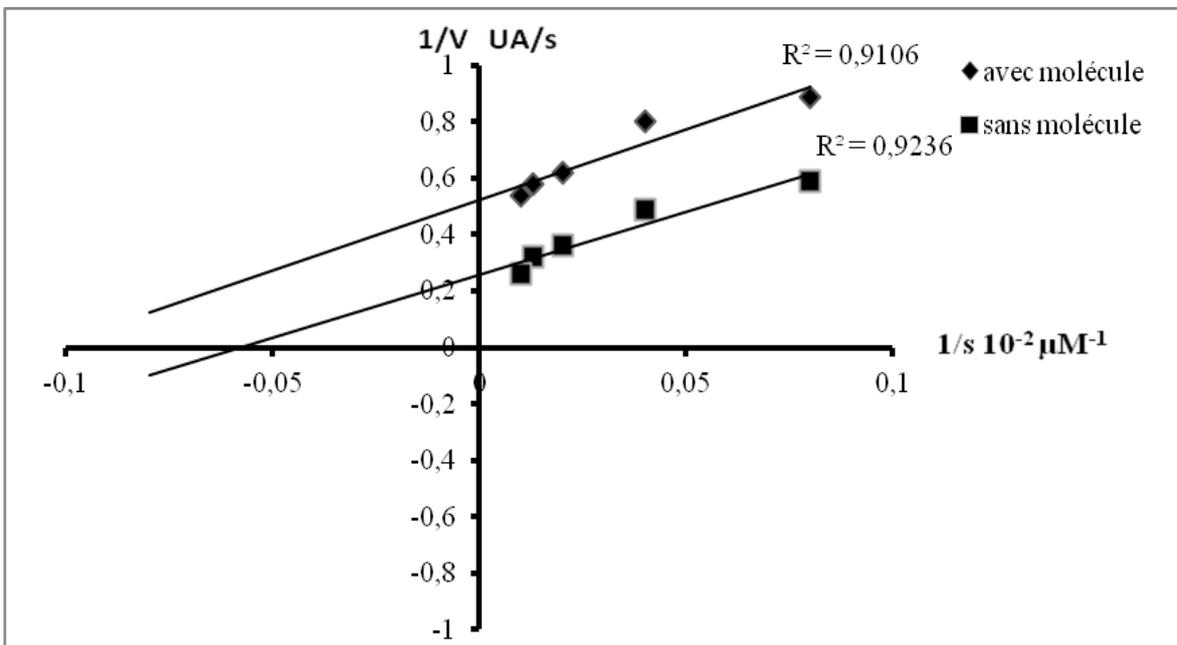


Figure 17 : Représentation de linweaver et burk e l'inhibition de l'activité NADH oxydase par l'apigenine-O-7-glucoside.

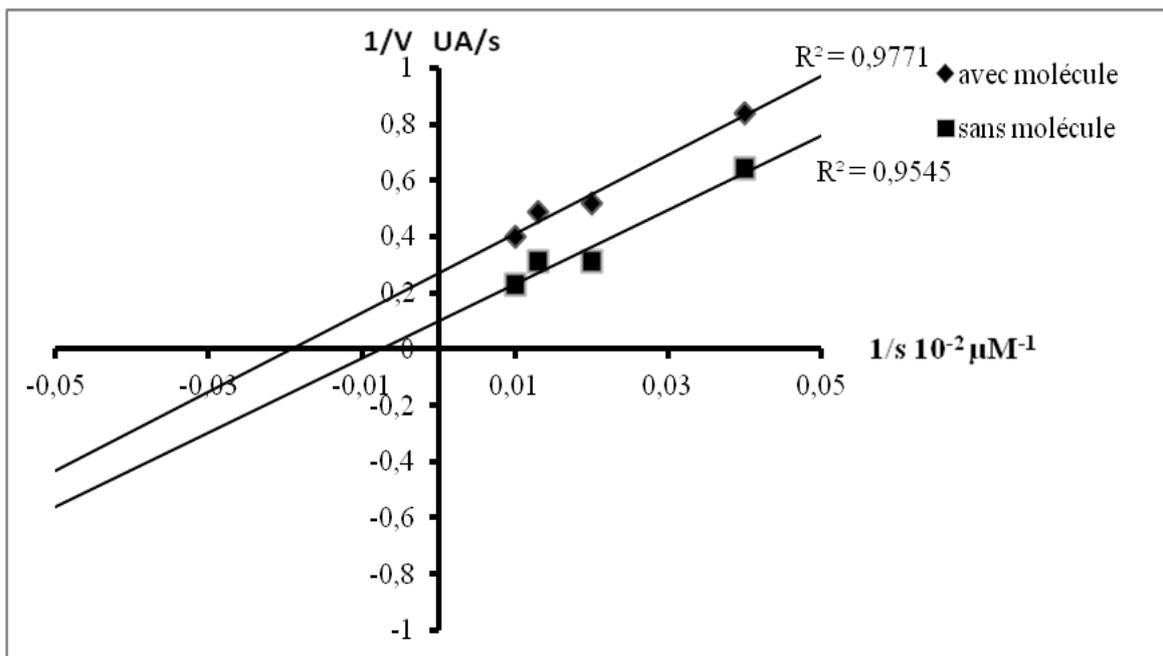


Figure 18 : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la rutine.

Ces résultats sont différents par rapport aux résultats obtenus par lin et *al.* (2002), qui ont montrés que les flavonoïdes exhibent des modes d'inhibitions de type compétitif.

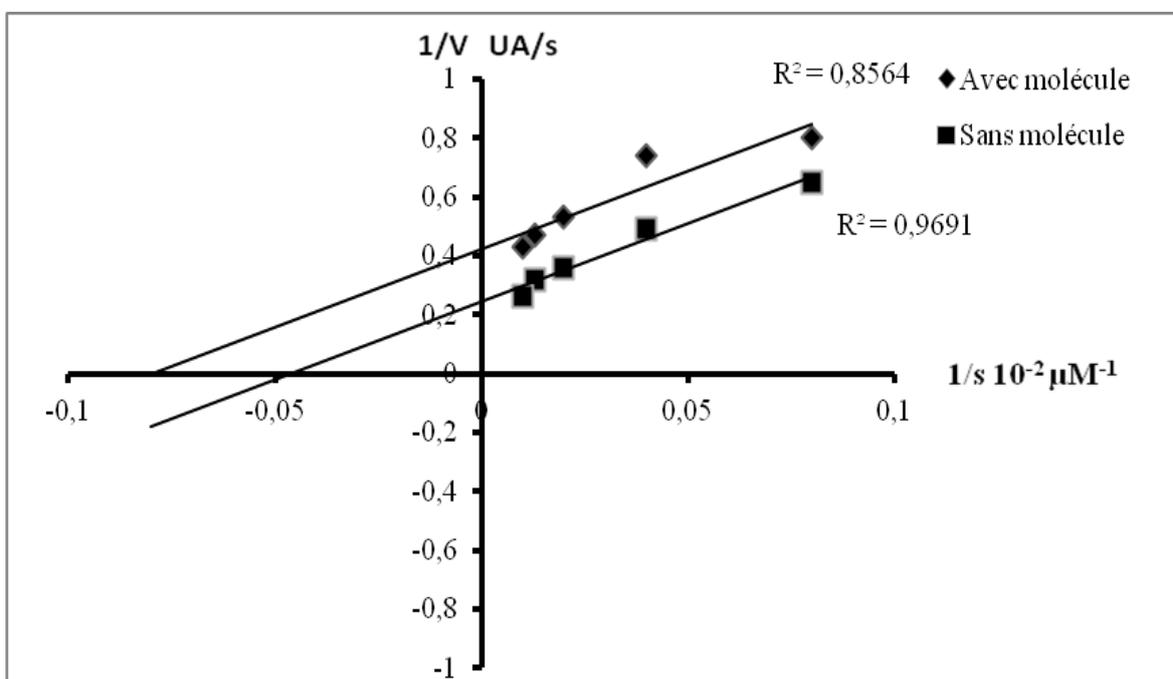
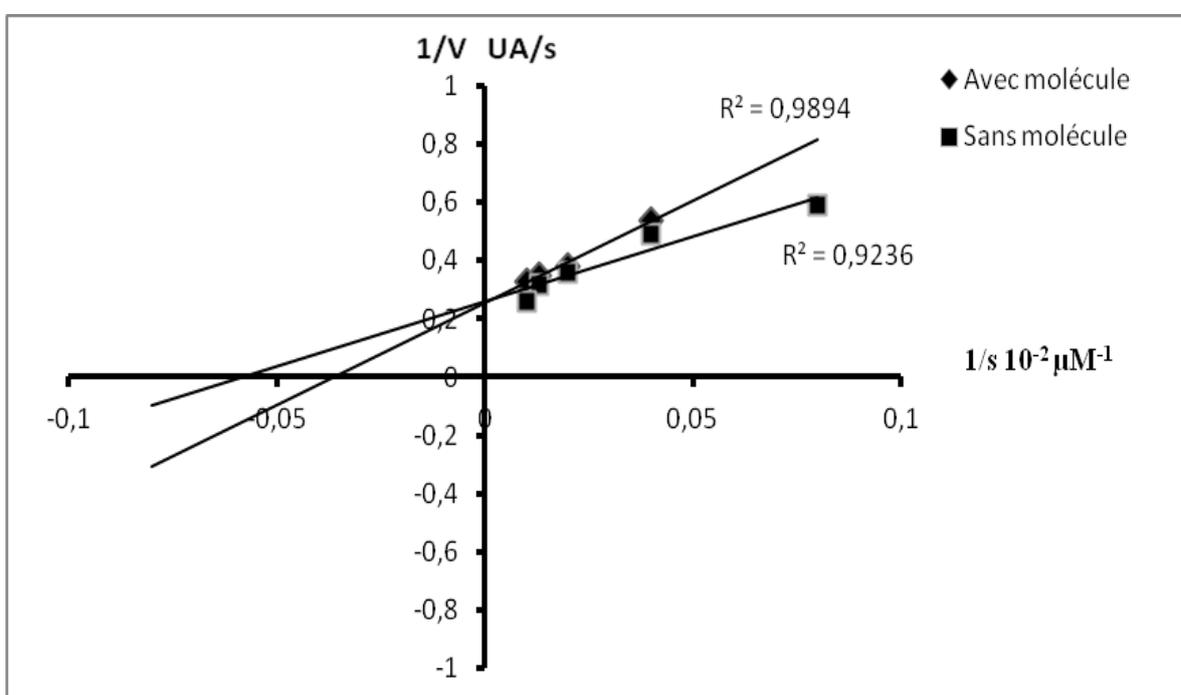


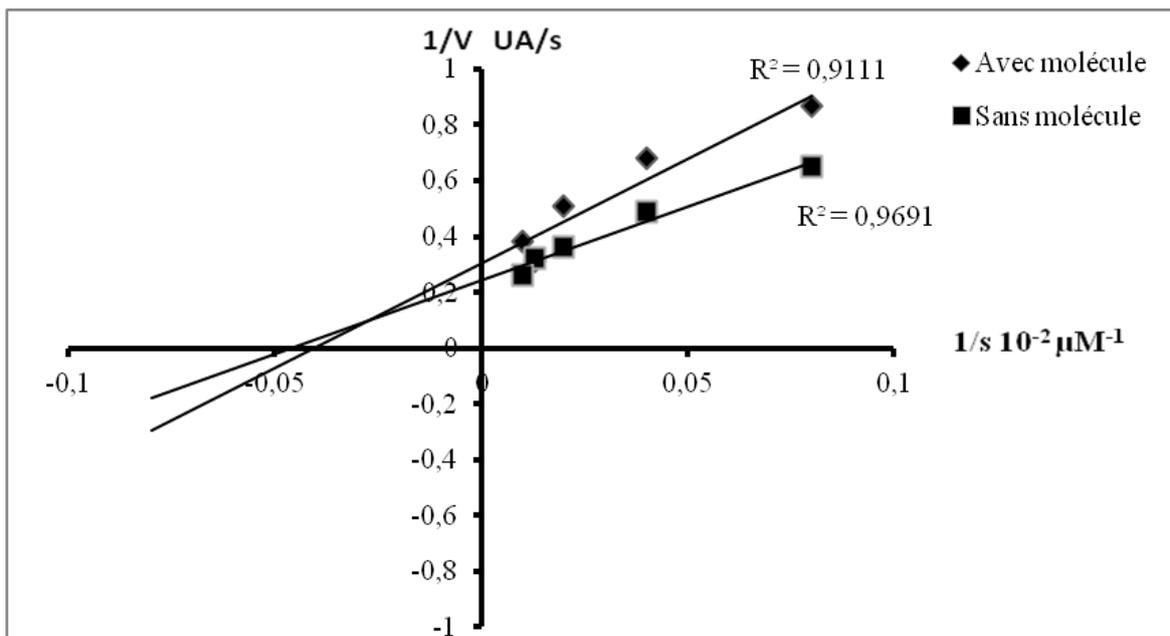
Figure 19 : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par l'acide gallique.

D'autre part la quercitrine inhibe l'enzyme d'une manière compétitive avec un  $K_m = 30,30 \mu\text{M}$  et  $V_{\text{max}} = 3,84 \Delta \text{ abs/S}$ . dans ce type d'inhibition, l'inhibiteur entre en compétition avec le substrat pour se lier à l'enzyme, il vient donc occuper la place du substrat sur l'enzyme, il existe une analogie structurale entre l'inhibiteur et le substrat. L'inhibiteur peut avoir une plus grande affinité pour l'enzyme que pour celle du substrat, cela empêchera la formation du complexe enzyme-substrat. Le pourcentage d'inhibition dépend des concentrations respectives en substrat et en inhibiteur, on peut élever l'inhibition en augmentant la concentration de Substrat. Ce type d'inhibition concerne l'affinité de l'enzyme pour le substrat donc  $K_m$  est modifié mais pas  $V_{\text{max}}$ .



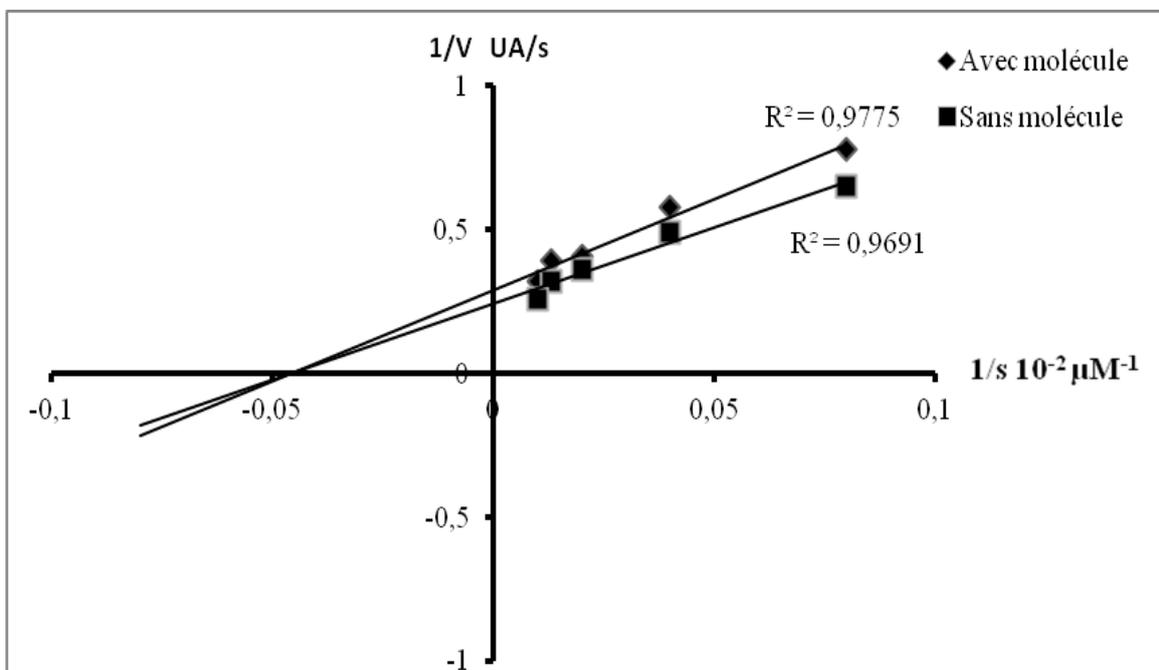
**Figure 20** : Représentation de linweaver et burk de l'inhibition de l'activité NADH oxydase par la quercitrine.

La luteoline -7-glucoside interagit avec la XDH avec une inhibition de type mixte, à la fois compétitive et Incompétitive. Montrant qu'il agit par des fixations soit avec l'enzyme libre soit au complexe enzyme-substrat. Les valeurs  $K_m$  et  $V_{\text{max}} = 24,39 \mu\text{M}$  et  $3,33 \Delta \text{ abs/S}$  respectivement. D'après Nagao et *al.* (1999), la quercétine exerce une inhibition de même type mixte sur l'activité xanthine oxydase avec un  $K_m = 0,2 \mu\text{M}$ . A partir de là, on peut suggérer que le site de fixation de la quercétine sur les deux forme d'enzyme peut être située entre les deux sites catalytiques de la XOR affectant ainsi les deux activités, peut être que le site de fixation de la luteoline est situé au même emplacement.

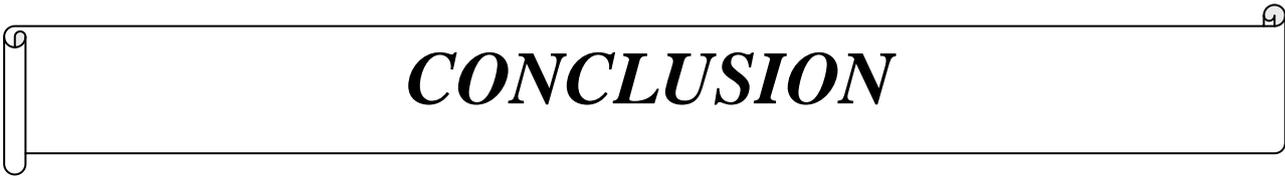


**Figure 21 :** Représentation de linweaver et burk de l’inhibition de l’activité NADH oxydase par la luteoline-7-glucoside.

Tandis que la catéchine exerce une inhibition non compétitive sur la NADH oxydase avec  $K_m$  et  $V_{max} = 20,83 \mu M$  et  $3,57 \Delta \text{ abs/S}$  respectivement. Dans ce type d’inhibition, l’inhibiteur se fixe sur un site autre que le site actif, on aura donc l’affinité de l’enzyme pour le substrat n’est pas diminuée donc  $K_m$  reste constant alors que  $V_{max}$  diminue.



**Figure 22 :** Représentation de linweaver et burk de l’inhibition de l’activité NADH oxydase par la catéchine.



***CONCLUSION***

### Conclusion

Les composés phénoliques de synthèse sont des molécules bioactives et participent au système de défense le plus énergique contre les différentes attaques. Ces composés, soulèvent actuellement l'intérêt de diverses investigations, à cause des bénéfices sur la santé humaine.

Dans ce but des essais ont été réalisées ultérieurement sur l'activité anti-NADH oxydase des extraits de *Galium mollugo*. La présente étude est une suite de ce dernier mais en testant les molécules pures récoltées par HPLC et identifiées par RMN.

Les résultats obtenus montrent que les molécules pures tels que la rutine, catéchine, quercétine ont montré un  $IC_{50}$  de l'ordre de 28,3 ; 26,7 ; 17,14  $\mu\text{g/ml}$ , respectivement. Celles-ci exhibent un pouvoir inhibiteur intéressant et dépendant de leurs concentrations ; dont la quercétine 3-O-glucoside, s'avère intéressante à 25 $\mu\text{g/ml}$  qui est de 63,02 $\pm$ 4,63%.

La quercétine 3-O-glucoside, quercitrine, apigénine-O-7-glucoside et luteoline-7-glucoside ont enregistré des inhibitions de 77,07 $\pm$ 5,43, 56,84 $\pm$ 2,12, 60,48 $\pm$ 4,58 et 51,99 $\pm$ 1,94%, respectivement à 50 $\mu\text{g/ml}$ .

Le tracé de Lineweaver et burk a montré de différents types d'inhibition suggérant la variabilité de la liaison des molécules aux sites actifs de l'enzyme. En effet, La quercétine 3-O-glucoside et apigénine-O-7 glucoside montrent une inhibition de type incompétitive avec des  $k_m=13,33\mu\text{M}$  et 9,09 $\mu\text{M}$ , et des  $V_{max}=2,56\Delta\text{abs/S}$  et 1,96 $\Delta\text{abs/S}$ , respectivement. Tandis que la quercitrine inhibe l'enzyme d'une manière compétitive avec un  $KM= 30,30\mu\text{M}$  et un  $V_{max}= 3,84\Delta\text{abs/S}$ . la luteoline-7-glucoside interagit avec la XDH avec une inhibition de type mixte avec  $K_m= 24,39\mu\text{M}$  et  $V_{max}= 3,33\Delta\text{abs/S}$ .

Des études complémentaires pourront être réalisées dans le but de :

- Etudier la toxicité et la pharmacologie de ces molécules pures et la possibilité de les utiliser comme médicament pour traiter les maladies qui nécessitent l'inhibition de la XOR.
- Etudier la relation structure-activité de La quercétine 3-O-glucoside, quercitrine, apigénine-O-7-glucoside et luteoline-7-glucoside et la XOR.

## *References Bibliographique*

### A

- Amaya, Y., Yamazaki, K., Sato, M., Nishino, T. (1990). Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type of the O<sub>2</sub>-dependent type. Amino acid sequences of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage site of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, **265**: 14170-14175.
- Atmani, D., Baghiani, A., Harrison, R. and Benboubetra, M. (2005). NADH oxidation and superoxide production by milk xanthine oxidoreductase. *International Dairy Journal*, **15**: 1113-1121.

### B

- Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. *Food and Agricultural research council, réduit, mauritius*. 83-94.
- Brunneton, J. (1999). *Flavonoïdes : Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition, technique et documentation* (Paris). 310-353.
- Buchanan W.B ; Grissem, R ; Jones, Eds ; Croteau, R ; Toni, M., Kutchan and N.G. Lewis. (2000). Natural products (Secondary metabolites) Biochemistry and molecular biology of plants, *American Society of plant physiologists*. Chapitre 24, 1250-1318.

### C

- Chang, W., Lee, Y. J, Lu, F.J, and Chang, H.C. (1994). Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research*, **14**: 501-506.
- Chiang H.C., Lo Y.J. and Lu F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitions from leaves of *Alsephila spinulosa* (Hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition*, **8**: pp 61-71.
- Cos, P., Calomme, M., Yang, L., Van Poel, B., Pieters, L., Beryghe, D.K. (1998). Structure activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products*, **61**: 71-76.
- Cowan..M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12** (4): 564-582.

### **D**

- Dai X, Ding Y, Zhang Z, Cai X, Li Y (2013). Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F  $\beta$ -cells via the mitochondrial pathway and NF- $\kappa$ B signaling. *International journal of molecular medicine*, **31**: 265-271.
- Da Silva, S.L; Honorio, K.M; Marangoni, S; and Toyama, M.H. (2004). The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **684**: 1-7.
- Della Corte E, Stirpe F. (1972).The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochemical Journal*, **126**: 739-745.
- Derbel,S., Ghedira,K.(2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et nutrition*, **1** :28-34.
- Desjardins, Y. (2008). Physiological and ecological functions and biosynthesis of health-promoting compounds in fruit and vegetables. *Improving the Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products. CRC Press-Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA*, 201-247.

### **E**

- Engerson,T.D., Mckelvey, T.G., Rhyne, D.B., Snyder, S.J.? Boggie, E.B., and Jones, H.P. (1987). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic Rat Tissues. *The Journal of Clinical Investigation*, **79**: 1564-1570.
- Enroth,C., Eger, B. T., Okamoto, K., Nishino, T.(2000). Crystal structure of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *Proceedings of National Academy of Sciences U S A*, **97** (20): 10723-10728.

### **F**

- Floss H. G. 1997. Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports*, **14**: 433-434.

### **G**

- Garait, B. (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régime alimentaire) ou par voie gazeuse (hypoxie) et effet de la glisodin. *Laboratoire Bioénergétique Fondamental et Appliqué*, **192**: 8-10.
- Ghedira K. Derbel S., (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, **1**: 28-34.

### **H**

- Harris, C.M; and Massey, V. (1997). The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**(13): 8370-8379.
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase where are we now? *Free radical biology and medicine*, **33** (6): 774-797.
- Hatano, T., Yasuhara, T., Yoshihara, R., Agata, I., Noro, T. and Okuda, T. (1990). Effects of interaction of tannins with Co-existing substances. VII. inhibitory effects of tannins and related polyphenols on xanthine oxidase. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **38** (5): 1224-1229.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, **96**: 97-202.
- Hille, R., Choi, E.Y, Stockert, A.L, Leimkuhler, S, (2004). Studies on the mechanism of action of xanthine oxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **98**: 841-848.
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A., ... & Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **88** (1), 38-50.
- Hopkins, W.G ; (2003). Molécules et métabolisme : physiologie végétale. *De Boeck Supérieur*, 532.

### **K**

- Kalra, N., Shukla, Y., Einarson, A., Karaskov, T. (2007). Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer letters*, **247**(2) : 167-181.
- Karmella, L.A., and Christine, L.H. (2010). Xanthine oxidase inhibition of selected Philippine medicinal plants, **5**: 289-292.

## *References Bibliographiques*

- Kim, J.H., and Hille, R. (1993). Reductive half reaction of xanthine oxidase with xanthine. *The Journal of Biological Chemistry*, **268** (1) : 44-51.
- Kooij, A., Bosch, K.S., Frederiks, W.M. (1992). High levels of xanthine oxidoreductase in rat endothelial epithelial and connective tissue cells. *Virchows Archivs B Cell Pathology*, **62**: 143-150.
- Krenitsky, T.A., Tuttle, J. V., Cattau, E.L., Wang, P. (1974). A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthineoxidase and aldehyde oxidase. *journal of comparative Physiology and biochemistry*, **49**: 687–703.
- Kurosaki, M., Calzi, M.L., Scanziani, E. (1995). Tissue and cell specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene *in vivo*: regulation by bacterial lipopolysaccharide. *Biochemistry Journal*, **306** (5626): 225-235.

### L

- Lin, C; Chen, C.S; Chen, C.T; Liang, Y.C; and Lin, J .K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **294**: 167-172.
- Linder, N., Rapola, J., & Raivio, K. O. (1999). Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **79** (8): 967-974.
- Ling, L. (2001). Xanthine oxidase. *B180 Medical Laboratories Free Radical and Radiation Biology Program The University of Iowa Iowa City, IA* 52242-1181.
- Low, J. H., Rahman, W. A. W. A., & Jamaluddin, J. (2015). Structural elucidation of tannins of spent coffee grounds by CP-MAS 13 C NMR and MALDI-TOF MS. *Industrial Crops and Products*, **69**: 456-461.

### M

- Maamri, S. (2008). Etude de pistacia atlantica de deux régions de sud algérien: dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Mémoire de Magister Université de BOUMERDES. P 10-57.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR Presses polytechniques.192 p.

- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphénols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical and Nutrition*, **79**: 727-747.
- Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur reactivite avec les radicaux issus des alcools: *Formation de depsides* (Doctoral dissertation, CEA Saclay).
- Martelin, E. (2004). Regulation of the human xanthine oxidoreductase gene. Halinski University Biomedical Dissertation, Finland, **42**.
- Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002, December). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, **51** (6): 304-315
- Massey, V., Schopfer, L.M. (1989). Differences in protein structure of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase revealed by reconstitution with Flavin active site probs. *The Journal of Biological Chemistry*, **264** (18): 10567-10573.
- Masuoka, N. and Kubo, I. (2004). Characterisation of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1688**: 245-249.
- Masuoka, N., Nihei, K.I. and Kubo, I. (2006). Xanthine oxidase inhibitory activity of alkyl gallates. *Molecular Nutrition and Food Research*, **50**: 725-731.
- Mc Manaman, J.L., Shellman, V. (1996). Purification of rat livers xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by affinity chromatography on benzamidine-sepharose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **332** (1): 135-141.
- Meneshian, A., Bulkley, G.B. (2002). The physiology of endothelial xanthineoxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirc*, **9**: 161-175.
- Middleton, E.J., Kandaswam, C., Theoharidies, T.C. (2000). The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological review*, **52** (1): 673-751.
- Mouffok (2011). Etude des métabolites secondaires de *Centaurea pubescens* ssp. *Omphalotricha* (Asteraceae) Mémoire de Magister Université de Batna. p 125-134.

### **N**

- Nagao, A., Seki, M. and Kobayashi, H. (1999). Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **63** (10): 1787-1790.
- Nijveldt R.J.; Van Nood E. and Van Hoorn D.E.C. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Journal of Clinical and Nutrition*, **74** (4): 418-25.
- Nishino, T., Nakanishi, S., Okamoto, K., Mizushima, J., Hori, H., Iwashii, T., Ishimori, K., Nakazawa, H. (1997). Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochemical Society Transactions*, **25**: 783-786.

### **P**

- Pacher, P., Nivorozhkin, A., Szabó, C. (2006). Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews*, **58**: 87-114.
- Parks, D.A., Granger, D.N. (1986). Xanthineoxidase: biochemistry, distribution, and physiology. *Acta Physiologica*, **548**: 87-99.
- Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: 1035-1042.
- Portes, E. (2008). Synthèse et Etudes de Tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés Photochimiques et Antioxydantes, Applications à la Préservation de Matériaux d'Origine Naturelle. Thèse de doctorat Université Bordeaux I. p 44-46.
- Pourrut, B. (2008). Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de doctorat de Toulouse, 279p.
- Pravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry; dietary sources, metabolism, and nutritional significances. *Nutrition Reviews*, **56** (11): 317-333.

### **R**

- Radi, R., Tan, S., Prodanov, E., Evan, R.A., and Parks, D.A. (1992). Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochemical and Biophysical Acta*, **1122** : 178-182.
- Remsey, C., Manach, C., Demingne, C., Regeat, F. (1996). Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Medecine et nutrition*, **1** : 17-26.

- Rohfritsch, O. (1967). Analyse morphogénétique de la formation d'une galle (*Perrisia galii* sur *Galium mollugo*) par la méthode des ablations échelonnées du cécidozoaire. *Bulletin de la Société Botanique de France*, **114** (1): 20-25.

### S

- Saebyeol Jang, Keith W. Kelley and Rodney W. Johnson (2008). Luteolin reduces IL-6 production in microglia by inhibiting JNK phosphorylation and activation of AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** (21): 7534-7539.
- Said, O., Khalil, K., Fluder, S., Azaizeh, H., (2002). Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology*, **83**: 251-265.
- Sato, A., Nishino, T., Noda, K., Amaya, Y., and Nishino, T. (1995). The structure of chicken liver xanthine dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, **270** (6): 2818-2826.
- Scalbert, A. (2004). Fruits et légumes, polyphénols et santé. Laboratoire des maladies métaboliques et micronutriments, INRA, centre de recherche de Clermont-ferrand/Theix, relu par Edith florentin.
- Si Dayong, Wang Y, Zhou Y-H, Guo Y, Wang J, Zhou H, Li Z-S, Fawcett JP, (2009). Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metabolism and Disposition*, **37**: 629-634.
- Silanikove, N., Shapiro, F., Shamay, A., Leitner, G. (2005). Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolysate. *Free Radical Biology and Medicine*, **38**: 1139-1151.
- Subsamanian S., Stacey G et Yu O. (2007). Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science*, **12** (7): 282-283.

### RESUME

Sept molécules pures ont été testées suivant plusieurs concentrations, afin de poursuivre les tests d'activité anti-NADH oxydase des molécules pures identifiées par RMN. Les molécules pures exhibent un pouvoir inhibiteur important à 50 µg/ml. Dont La meilleure activité est exhibée par la quercétine 3-O-glucoside avec (77,07±5,43%) qui est supérieure à celle enregistrée par la rutine, acide gallique et catéchine (70±3,62, 38,28±0,37 et 66,94±0,44%, respectivement) suivie par l'apigénine-O-7-glucoside (60,48±4,58%), la quercitrine (56,84±2,12%) et la luteoline-7-glucoside (51,99±1,94%). Ces derniers montrent des inhibitions inférieures à la rutine et la catéchine, mais plus importantes que celle de l'acide gallique. Les composés phénoliques exhibent une inhibition dépendante de la concentration sur l'enzyme. Des inhibitions du type mixte, compétitif et non compétitif ont été enregistrées par la luteoline, quercitrine et la catéchine, respectivement. Tandis que la quercétine, l'apigénine, acide gallique et la rutine montrent une inhibition de type Incompétitive.

**Mots clés :** NADH oxydase, xanthine oxydoréductase, composés phénoliques.

### ABSTRACT

Seven pure molecules were tested using several concentrations, to continue the anti-NADH oxidase activity tests of pure molecules identified by NMR. The pure molecules exhibit a significant inhibitory power at 50µg/ml. The best activity of which is exhibited by quercetin 3-O-glucoside with (77.07 ± 5.43%) which is greater than that recorded by rutin, gallic acid and catechin (70 ± 3.62, 38.28 ± 0.37 and 66.94 ± 0.44%, respectively) followed by apigenin-7-O-glucoside (60.48 ± 4.58%), quercitrin (56.84 ± 2.12%) and luteolin-7-glucoside (51.99 ± 1.94%). These show lower inhibitions rutin and catechin, but more important than that of gallic acid. Phenolic compounds exhibit a concentration dependent inhibition of the enzyme. Inhibitions mixed, competitive and non-competitive types were recorded by luteolin, quercitrin and catechin, respectively. While quercetin, apigenin, gallic acid and rutin show uncompetitive type of inhibition.

**Keywords:** NADH oxidase, xanthine oxidoreductase, phenolic compounds.

### ملخص

تم اختبار سبع جزيئات نقية باستخدام عدة تراكيز لمواصلة اختبارات نشاط ضد NADH أوكسيداز للجزيئات النقية التي حددها الرنين المغناطيسي النووي. الجزيئات النقية تعرض قوة مثبطة كبيرة بـ 50 ميكروغرام / مل. و أفضل نشاط عرض من قبل كيرسيتين-3-O-جلوكوسيدي مع (77.07 ± 5.43%) وهي نسبة أكبر من تلك التي سجلت من طرف روتين، كاتشين وحمض الغال مع (70 ± 3.62، 38.28 ± 0.37 و 66.94 ± 0.44%) على التوالي، تليها الأبيغينين-7-O-جلوكوسيدي مع (60.48 ± 4.58)، كيرسيتين (56.84 ± 2.12%) ولوتيولين-7-جلوكوسيدي (51.99 ± 1.94%). هذه النتائج الأخيرة تظهر تثبيطات بصفة أقل من الروتين والكاتشين، ولكن بصفة أهم من حمض الغال. المركبات الفينولية تبدي تثبيط يعتمد على تركيز الانزيم. تثبيطات من نوع مختلطة، تنافسية وغير تنافسية سجلت من طرف اللوتيولين، كيرسيتين والكاتشين على التوالي، في حين الكيرسيتين، الأبيغينين، حمض الغال و الروتين تظهر تثبيط غير قادرة على المنافسة.

**كلمات المفتاح:** NADH أوكسيداز، الكزانئين مؤكسدة مختزلة، المركبات الفينولية.