

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Béjaia
Faculté des Sciences de la Nature et de Vie
Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

En Biologie
Option : Biologie moléculaire

Thème

**Caractérisation des activités anti-xanthine oxydase
et anti-radicalaire des extraits des écorces de
Ulmus campestris et de *Fraxinus angustifolia***

Par :

M^{lle} ABDELFETTAH Farida

Devant le jury :

| | |
|--|------------------------------|
| Présidente : M ^{me} BENABDESSELAM F. | (M.C., Université de Bejaia) |
| Promoteur : M ^r ATMANI D. | (M.C., Université de Bejaia) |
| Co-promotrice: M ^{me} BOUDAUD H. | (M.A., Université de Bejaia) |
| Examineurs : M ^r IGUEROUADA M. | (M.C., Université de Bejaia) |
| M ^{me} BEDJOU F. | (M.C., Université de Bejaia) |

Année : 2008 – 2009

Remerciements

Je voudrais témoigner ma reconnaissance au Mr. Atmani D. pour avoir encadré ce mémoire de magister. Je le remercie particulièrement pour son souci de formation, sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ces encouragements.

Je remercie ma co-promotrice M^{me} Boudaoud pour son co-encadrement, ces conseils et suggestions et tout ça dans la bonne humeur

J'exprime ensuite mon estime et mes remerciements à :

M^{me} Benabdesselam F. pour avoir accepté de présider le juré de ce mémoire, Mr. Iguerouada M. et M^{me} Bedjou F. qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail et de me faire ainsi bénéficier de leurs compétences et de leurs connaissances.

Je remercie aussi Mr. Benboubetra M. pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire de l'université de Sétif où s'est faite la purification de la xanthine oxydase.

Je remercie tout le personnel du laboratoire de génétique tout particulièrement M^{me} Atmani, M^{me} Debache, M^{lle} Ayouni, M^{lle} Brboucha, M^{lle} Lounis, M^{lle} chaïher, M^{lle} Adrar, M^{lle} Tahiri et Mr Boukerouis qui m'ont soutenu et aidé tout le long de ce travail.

Mes remerciements vont également à tous les étudiants en post-graduation biologie moléculaire pour leur encouragement et leur amitié, et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

Au plus brave des pères

A la plus tendre des mères

A mes très chères sœurs

A mes très chères frères

A mes chères neveux : Yanis et Sami

A toute ma famille

A tous ceux que j'aime.

Sommaire

Pages

Liste des figures

Liste des figures

Liste des abréviations

| | |
|-------------------|----|
| Introduction..... | 01 |
|-------------------|----|

Chapitre I : Synthèse bibliographique

| | | |
|------------|---|----|
| I. 1 | Les radicaux libres..... | 03 |
| I. 1. 1 | Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène | 03 |
| I. 1. 1. 1 | Les mitochondries..... | 03 |
| I. 1. 1. 2 | Les cellules phagocytaires..... | 04 |
| I. 1. 1. 3 | La xanthine oxydase..... | 04 |
| I. 1. 1. 4 | Les ions métalliques | 04 |
| I. 1. 1. 5 | Nitrique oxyde synthétase | 05 |
| I. 1. 1. 6 | Le réticulum endoplasmique..... | 05 |
| I. 1. 2 | Rôle physiologique des radicaux libres | 06 |
| I. 1. 3 | Rôle pathologique des radicaux libres..... | 07 |
| I. 1. 3. 1 | Effets sur les lipides | 07 |
| I. 1. 3. 2 | Effets sur les protéines | 08 |
| I. 1. 3. 3 | Effets sur les acides nucléiques | 09 |
| I. 1. 3. 4 | Stress oxydant et pathologies..... | 09 |
| I. 2 | Xanthine oxydase | 10 |
| I. 2. 1 | Structure de la xanthine oxydoréductase | 10 |
| I. 2. 2 | La conversion de la forme XDH en forme XO | 11 |
| I. 2. 2. 1 | Conversion par clivage protéolytique lors de l'ischémie–reperfusion | 11 |
| I. 2. 2. 2 | Conversion par oxydation | 11 |
| I. 2. 3 | Rôle physiologique de la XOR..... | 12 |
| I. 2. 3. 1 | Rôle dans le catabolisme des purines | 12 |
| I. 2. 3. 2 | Rôle dans la réduction des nitrites en oxyde nitrique..... | 13 |
| I. 2. 4 | Rôle pathologique de la XOR | 14 |
| I. 2. 4. 1 | La goutte | 14 |
| I. 2. 4. 2 | L'ischémie-reperfusion | 14 |
| I. 3 | Activité antioxydants | 15 |

| | | |
|------------------|---|----|
| I. 3. 1 | Les antioxydants enzymatiques | 15 |
| I. 3. 1. 1 | Superoxyde dismutase | 15 |
| I. 3. 1. 2 | Catalase | 15 |
| I. 3. 1. 3 | Glutathion peroxydase et réductase | 16 |
| I. 3. 2 | Les antioxydants non-enzymatiques..... | 16 |
| I. 3. 2. 1 | Les molécules à activité anti-radicalaire | 17 |
| I. 3. 2. 1. 2 | Le glutathion | 17 |
| I. 3. 2. 1. 3 | La vitamine E | 17 |
| I. 3. 2. 1. 3 | La vitamine C | 18 |
| I. 3. 2. 1. 4 | Les caroténoïdes | 18 |
| I. 3. 2. 1. 5 | Les polyphénols..... | 19 |
| I. 3. 2. 1. 5. 1 | Les phénols simples et les acides- phénoliques..... | 21 |
| I. 3. 2. 1. 5. 2 | Les flavonoïdes..... | 22 |
| I. 3. 2. 1. 5. 3 | les tannins..... | 25 |
| I. 3. 2. 2 | Inhibiteurs de la xanthine oxydase..... | 28 |
| I. 3. 2. 2. 1 | Inhibiteurs synthétiques | 28 |
| I. 3. 2. 2. 2 | Les inhibiteurs d'origine végétale..... | 29 |
| I. 3. 2. 2. 2.1 | les acides phénoliques | 29 |
| I. 3. 2. 2. 2. 2 | Les flavonoïdes..... | 31 |
| I. 3. 2. 2. 2. 3 | Les tannins | 33 |

Chapitre II : Matériels et méthodes

| | | |
|-------------|-------------------------------------|----|
| II. 1 | Matériels | 35 |
| II. 1. 1 | <i>Ulmus campestris</i> | 35 |
| II. 1. 1. 1 | Nom vernaculaire..... | 35 |
| II. 1. 1. 2 | Usages traditionnels | 35 |
| II. 1. 1. 3 | Place dans la systématique | 36 |
| II. 1. 1. 4 | Principes actifs de la plante | 36 |
| II. 1. 2 | <i>Fraxinus angustifolia</i> | 36 |
| II. 1. 2. 1 | Nom vernaculaire..... | 36 |
| II. 1. 2. 2 | Usages traditionnels | 36 |
| II. 1. 2. 3 | Place dans la systématique | 37 |
| II. 1. 2. 4 | Principes actifs de la plante | 37 |
| II. 2 | Méthodes..... | 37 |
| II. 2. 1 | Séchage | 37 |

| | | |
|--------------|---|----|
| II. 2. 2 | Broyage et tamisage | 37 |
| II. 2. 3 | Extraction des polyphénols..... | 38 |
| II. 2. 4 | Les dosages | 39 |
| II. 2. 4. 1 | Dosage des phénols totaux | 39 |
| II. 2. 4. 2 | Dosage des flavonoïdes | 40 |
| II. 2. 4. 3 | Dosage des tannins..... | 40 |
| II. 2. 5 | Mesure du pouvoir réducteur | 41 |
| II. 2. 6 | Activité scavenger du radical hydroxyle..... | 41 |
| II. 2. 7 | Inhibition de la peroxydation lipidique..... | 42 |
| II. 2. 8 | Purification de la XOR | 43 |
| II. 2. 9 | Activité anti- xanthine oxydase des extraits de <i>Ulmus campestris</i> | 44 |
| II. 2. 10 | Détermination des IC ₅₀ | 45 |
| II. 2. 11 | Etude chromatographique | 45 |
| II. 2. 11. 1 | Chromatographie sur couche mince..... | 45 |
| II. 2. 11. 2 | Chromatographie sur colonne de gel de silice..... | 46 |
| II. 2. 12 | Etude spectrale..... | 46 |
| II. 2. 13 | Etude statistique | 46 |

Chapitre III : Résultats et discussions

| | | |
|-----------|---|----|
| III. 1 | Extraction | 47 |
| III. 2 | Dosages | 48 |
| III. 2. 1 | Les phénols totaux..... | 48 |
| III. 2. 2 | Les flavonoïdes | 49 |
| III. 2. 3 | Les tannins | 50 |
| III. 3 | Mesure du pouvoir réducteur..... | 52 |
| III. 4 | Activité scavenger du radical hydroxyle | 53 |
| III. 4. 1 | Activité scavenger du radical hydroxyle des différents extraits à 100 µg/ml ... | 53 |
| III. 4. 2 | Détermination des concentrations inhibitrices 50 % | 54 |
| III. 5 | Inhibition de la peroxydation lipidique..... | 55 |
| III. 5. 1 | Inhibition de la peroxydation lipidique par les différents extraits à 100µg/ml ... | 55 |
| III. 5. 2 | Détermination des IC ₅₀ de la BHA et de l'extrait d'hexane de <i>U. campestris</i> ... | 56 |
| III. 6 | Activité anti-xanthine oxydase | 58 |
| III. 6. 1 | Activité anti-xanthine oxydase des différents extraits à 100 µg/ml..... | 58 |
| III. 6. 2 | Détermination des IC ₅₀ de l'allopurinol et de l'extrait éthanolique | 59 |

| | | |
|-----------|--|----|
| III. 7 | Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les activités biologiques testées..... | 60 |
| III. 7. 1 | Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité scavenger du radical hydroxyle | 60 |
| III. 7. 2 | Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique..... | 62 |
| III. 7. 3 | Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-xanthine oxydase..... | 63 |
| III. 8 | Résultats de fractionnement par chromatographie sur couche mince | 66 |
| III. 8. 1 | Les chromatogrammes de <i>Ulmus campestris</i> | 67 |
| III. 8. 2 | Les chromatogrammes de <i>Fraxinus angustifolia</i> | 69 |
| III. 9 | Résultats de la chromatographie sur colonne et des activités des fractions obtenues..... | 71 |
| | Conclusion | 74 |
| | Références bibliographiques | 76 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure N° 01 : Principales sources de radicaux libres..... | 03 |
| Figure N° 02 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire..... | 08 |
| Figure N° 03 : Structure du dimère de xanthine déshydrogénase | 10 |
| Figure N° 04 : Les trois domaines du monomère de la XDH et les résidus impliqués dans la conversion de la XDH en XO | 11 |
| Figure N° 05 : L'environnement électrostatique du site FAD de la XDH et de la XO ... | 12 |
| Figure N°06 : les réactions d'oxydation des purines catalysés par la XDH et la XO | 12 |
| Figure N° 07 : La voie du transfert des électrons lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ou de la xanthine en acide urique par la XOR..... | 13 |
| Figure N° 08 : Schéma d'un diagramme montrant la réduction des nitrites et des nitrates par la XOR | 13 |
| Figure N° 09 : l'hypothèse expliquant les lésions induites au cours de l'ischémie-reperfusion..... | 14 |
| Figure N° 10 : Elimination du peroxyde d'hydrogène et de l'hydroperoxyde par la GSH-Px et la GSH-R | 16 |
| Figure N° 11 : Squelette de base des phénols simples, des dérivés des acides benzoïque et cinnamique..... | 21 |
| Figure N° 12 : Squelette de base des flavonoïdes | 22 |
| Figure N° 13 : Piégeage des ROS (R·) par les flavonoïdes | 24 |
| Figure N° 14 : Les sites proposés pour la chélation des ions métalliques | 25 |
| Figure N° 15 : Structure des tannins hydrolysables et condensés..... | 26 |
| Figure N° 16 : Structure de l'allopurinol et de l'oxoallopurinol..... | 28 |
| Figure N° 17 : Structure de Febuxostat | 29 |
| Figure N° 18 : Structure chimique des acides caféique, ferulique et gallique | 30 |
| Figure N° 19 : Modèle moléculaire de la liaison des phenylpropénoïdes au site actif de la XO | 30 |
| Figure N° 21 : Modèle moléculaire de la liaison des flavonoïdes au site actif de la XO | 32 |
| Figure N° 22 : Photographies de l'écorce de <i>U. campestris</i> | 48 |

| | |
|---|----|
| Figure N° 23: Photographie de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> | 49 |
| Figure N° 24 : schéma de protocole d'extraction | 39 |
| Figure N° 25 : L'hydroxylation de l'acide salicylique par oxidation radicalaire | 41 |
| Figure N° 26 : schéma du développement chromatographique d'une plaque..... | 45 |
| Figure N° 25 : Représentation graphique des taux en phénols totaux des extraits des écorces de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 48 |
| Figure N° 26 : Représentation graphique des taux en flavonoides des extraits des écorces de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 49 |
| Figure N° 27 : Représentation graphique des taux en tannins des extraits des écorces de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 50 |
| Figure N ° 28 : Représentation graphique du pouvoir réducteur des extraits des écorces de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> et de standard utilisé à 100µg / ml. ... | 52 |
| Figure N° 29 : Représentation graphique du pourcentage d'activité scavenger du radical hydroxyle par les extraits des écorces de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> et de standard utilisé à 100µg / ml..... | 53 |
| Figure N° 30 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de la formation du radical hydroxyle en fonction de la concentration en catéchine, en extraits éthanolique et aqueux de chloroforme de l'écorce de <i>U. campestris</i> | 54 |
| Figure N° 31 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits des écorces de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> et du standard utilisé à 100µg / ml..... | 55 |
| Figure N° 32 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique en fonction de la concentration de l'extrait d'hexane de l'écorce de <i>U. campestris</i> et de la BHA. | 57 |
| Figure N° 33 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la XOR par l'allopurinol et les extraits de l'écorce de <i>U. campestris</i> à 100µg / ml..... | 58 |
| Figure N° 34 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de la XOR en fonction de la concentration en allopurinol | 59 |
| Figure N° 35 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de la XOR en fonction de la concentration en extrait éthanolique de <i>Ulmus campestris</i> | 60 |
| Figure N° 36 : Corrélation linéaire entre le taux en phénols totaux et le pourcentage de l'activité scavenger du radical hydroxyle des extraits de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 61 |
| Figure N° 37 : Corrélation linéaire entre le taux en flavonoides et le pourcentage de l'activité scavenger du radical hydroxyle des extraits de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 61 |

| | |
|--|----|
| Figure N° 38 : Corrélation linéaire entre le taux en tannins et le pourcentage de l'activité scavenger du radical hydroxyle des extraits de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 61 |
| Figure N° 39 : Corrélation linéaire entre le taux en phénols totaux et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 62 |
| Figure N° 40 : Corrélation linéaire entre le taux en flavonoides et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 62 |
| Figure N° 41 : Corrélation linéaire entre le taux en tannins et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 63 |
| Figure N° 42 : Corrélation linéaire entre le taux en phénols totaux, en flavonoides et en tannins et le pourcentage d'inhibition de la XOR par les extraits de <i>U. campestris</i> | 63 |
| Figure N° 43 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de <i>U. campestris</i> | 67 |
| Figure N° 44 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de <i>U. campestris</i> | 67 |
| Figure N° 45 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de <i>U. campestris</i> | 68 |
| Figure N° 46 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> | 69 |
| Figure N° 47 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> | 69 |
| Figure N° 48 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de <i>F. angustifolia</i> | 70 |
| Figure N° 49 : Représentation graphique de l'activité scavenger du radical hydroxyle par les fractions de l'extrait éthanolique de <i>ulmus campestris</i> à 100µg / ml..... | 71 |
| Figure N° 50 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique par les fractions de l'extrait éthanolique de <i>ulmus campestris</i> à 100µg / ml.... | 72 |
| Figure N° 51 : Représentation graphique de l'activité anti-xanthine oxydase des fractions de l'extrait éthanolique de <i>ulmus campestris</i> à 100µg / ml..... | 73 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : les valeurs des IC ₅₀ (µg/ml) des activités antioxydantes de la vitamine | 18 |
| Tableau II : activité antioxydants de quelques caroténoïdes | 19 |
| Tableau III : les différentes classes de polyphénols | 20 |
| Tableau IV : les différents groupes des flavonoïdes | 23 |
| Tableau V : Les valeurs d'IC ₅₀ des activités antioxydantes de quelques extraits de plantes et polyphénols | 27 |
| Tableau VI : La valeur de Ki et le type d'inhibition de quelques flavonoïdes..... | 32 |
| Tableau VII : les valeurs des IC ₅₀ de l'activité anti-xanthine oxydase de quelques composés phénoliques et extraits de plantes | 34 |
| Tableau VIII : Taux d'extractions obtenus à partir des écorces de <i>Ulmus campestris</i> et de <i>Fraxinus angustifolia</i> | 47 |
| Tableau IX : Taux de phénols totaux, de flavonoïdes et de tannins dans les extraits de l'écorce de <i>Fraxinus angustifolia</i> récolté en 2005..... | 51 |
| Tableau X : Les rapports frontaux des différentes fractions visualisées sur les chromatogrammes des extraits des écorces de <i>U. campestris</i> et de <i>F. angustifolia</i> | 66 |

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
BHA : butylated hydroxyanisole
BHT : butylated hydroxytoluene
BSA : Bovine serum albumine
CCM : Chromatographie sur couche mince
DPPH : diphenylpicrylhydrazyl
ER : Espèces réactives
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
ERN : Espèces réactives de l'Azote
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FL-O· : Radical flavonoxy
FI-OH : Flavonoïdes
GSH-Px : Glutathion peroxydase
GSH-R : Glutathion réductase
NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH,H⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NO : Monoxyde d'azote
O₂^{·-} : Radical superoxyde (anion superoxyde)
¹O₂ : Oxygène singulet
ONOOH : Nitroperoxyde
[·]OH : Radical hydroxyle
RO[·] : Radical alkoxyle
RO₂^{·-} : Radical peroxyde
SOD : Superoxyde dismutase
SOD Cyto : Superoxyde dismutase cytosolique
SOD EC : Superoxyde dismutase extracellulaire
SOD Mn : Superoxyde dismutase à manganèse
XDH : Xanthine desédrogénase
XO : Xanthine Oxydase
XOR : Xanthine Oxydoréductase



INTRODUCTION

Introduction

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine de nos grands parents. Cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les populations ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante une tradition thérapeutique connue depuis des millénaires.

L'usage de plantes médicinales locales en réponse à des problèmes de santé peut être perçu comme une alternative aux médicaments, en particulier dans les pays en voie de développement où ces médicaments sont souvent chers, peu accessibles et quelque fois contrefaits.

Actuellement, l'industrie pharmaceutique a pris conscience des limites et du coût de la chimie de synthèse. Beaucoup de molécules synthétiques ainsi obtenues ont un faible taux d'efficacité et présentent de plus en plus d'effets secondaires. C'est pour cela qu'elle se tourne vers la nature et a entrepris une vaste étude sur le terrain pour répertorier les plantes les plus prometteuses.

En Algérie, les plantes occupent une place importante dans la médecine traditionnelle, qui elle même est largement employée pour le traitement de diverses pathologies. Les remèdes utilisant les plantes ont tendance à être plus employés dans les maladies chroniques tels que l'asthme, les rhumatismes, les cancers, le diabète...etc. *Ulmus campestris* et *Fraxinus angustifolia* sont deux exemples parmi les innombrables plantes utilisées en médecine traditionnelle algérienne. Les extraits de ces deux plantes possèdent des propriétés calmantes dans les cas d'irritations et d'inflammations, solutionnent les problèmes de goutte et soulagent les rhumatismes...etc. (Calis et *al.*, 1993 ; Lepoittevin, 2004).

Il est vrai que l'usage de plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé; mais avant de pouvoir recommander l'usage de telle ou telle espèce pour une maladie, il est nécessaire de valider l'usage

traditionnel qui en est fait. En d'autres termes, il convient d'évaluer scientifiquement l'activité pharmacologique de la plante médicinale retenue, et apprécier si celle-ci confirme sa réputation. Pour cela nous essayerons dans ce travail d'évaluer l'activité anti-radicalaire des extraits de *Ulmus campestris* et de *Fraxinus angustifolia* et ceci en agissant à deux niveaux différents mais complémentaires. Dans un premier temps nous nous intéresserons aux agents de l'attaque radicalaire en mesurant la capacité des extraits à piéger le radical hydroxyle, l'un des radicaux libres les plus réactifs. Ensuite, nous tenterons d'évaluer leur effet protecteur d'une cible cellulaire très sensible aux attaques radicalaires à travers la mesure de la capacité des extraits à inhiber la peroxydation des lipides, notamment de la lécithine contenue dans le jaune d'œuf.

Nous allons aussi évaluer la capacité des extraits à inhiber la xanthine oxydase, l'enzyme responsable de la formation des radicaux libres mais surtout de l'acide urique qui impliqué dans la pathologie de la goutte.

Finalement nous essayerons d'identifier et de caractériser les polyphénols présents dans les extraits des deux plantes par chromatographie sur couche mince (CCM) et chromatographie sur colonne et de déterminer les concentrations inhibitrices 50 % (IC_{50}) des extraits ayant des activités biologiques intéressantes.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe. Ils peuvent être dérivés de l'oxygène (ERO : espèces réactives de l'oxygène) ou d'autres atomes comme l'azote (ERN : espèces réactives de l'azote) ou le chlore (Goudable et Favier, 1997 ; Vamecq *et al.*, 2004). La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité et une demi-vie courte (Valko *et al.*, 2006).

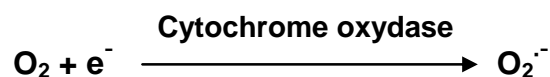
L'appellation ERO n'est pas restrictive ; elle inclut des dérivés radicalaire de l'oxygène tels l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$) mais également d'autres dérivés oxygénés réactifs non radicalaires, dont la toxicité est importante et qui peuvent être des précurseurs de radicaux libres comme l'oxygène singulet 1O_2 , ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Pasquier, 1995 ; Gardès-Albert, 2003).

I. 1. 1 Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène

Les ERO sont la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme. Leur production est permanente, physiologique et se fait à un niveau réduit et contrôlé (Seifried *et al.*, 2007), mais peut être augmentée dans des situations pathologiques comme l'inflammation aiguë ou dans les situations d'hypoxie et d'ischémie suivie de reperfusion (Deby-Dupont *et al.*, 2002). Les origines cellulaires des ERO sont essentiellement enzymatiques et découlent de plusieurs sources. Six sources majeures sont principalement concernées (Margaill *et al.*, 2005).

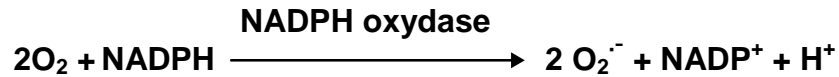
I. 1. 1. 1 Les mitochondries

L'une des sources physiologiques majeures de radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) est la chaîne respiratoire mitochondriale (Poston et Raijmakers, 2004). En effet, 95% de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau et environ 2 à 5% de cet oxygène subit une réduction monoélectronique conduisant à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Leiris, 2003). Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial (Buonocore et Groenendaal, 2007) :



I. 1. 1. 2 Les cellules phagocytaires

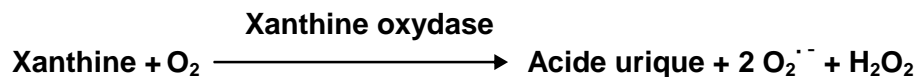
Les polynucléaires et les macrophages possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est également responsable de la formation de radical superoxyde (O_2^-).



Cette production de superoxyde est à l'origine de la production de molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite (ClO^-) indispensables à la destruction du matériel phagocyté. Cette voie de production de dérivés réactifs de l'oxygène est particulièrement stimulée au cours des processus infectieux (Fontaine, 2002).

I. 1. 1. 3 La xanthine oxydase

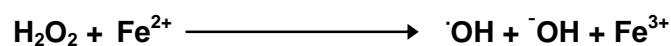
La xanthine oxydase est également considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde (Nedeljkovic et *al.*, 2003). En effet, en présence d'oxygène la xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine en acide urique. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi le radical superoxyde (Schuldt et *al.*, 2004) :



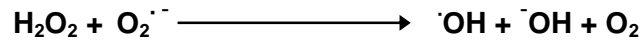
Le radical superoxyde est peu réactif, mais représente un précurseur d'espèces plus agressives (figure N° 01) (Deby-Dupont et *al.*, 2002).

I. 1. 1. 4 Les ions métalliques

Les ions métalliques comme le fer et le cuivre sont de remarquables promoteurs de processus radicalaires ; ils sont à l'origine de la formation du radical hydroxyle par la dégradation du peroxyde d'hydrogène en présence de métaux de transition sous leur forme réduite. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton :



Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir avec le radical superoxyde aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle, suivant la réaction d'Haber-Weiss (Fontaine, 2002 ; Leonard et *al.*, 2004) :



Cette réaction très lente est catalysée par la présence de métaux comme le fer (II) et (III), le chrome (III), (IV), (V), et (VI), le nickel (II) et le cobalt (I) (Halliwell et Gutteridge, 1984 ; Leonard et *al.*, 2004). Ces deux réactions, avec les radiations ionisantes et le rayonnement ultraviolet, constituent les principales sources du radical le plus toxique, le radical hydroxyle. Celui-ci est particulièrement réactif et ne peut être mis en évidence dans les milieux biologiques que par ses produits d'oxydation, car son temps de demi-vie est extrêmement court, de l'ordre de la nanoseconde (Pasquier, 1995 ; Baudin, 2006).

I. 1. 1. 5 Nitrique oxyde synthétase (NO synthétase)

Beaucoup de cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote (NO·) à partir de L- arginine par les NO synthétase en présence de cofacteurs tels que le NADPH, le FAD...etc. IL existe trois types de NO synthétases bien identifiés, la NO (NOS I) synthétase neuronale (NOS II), la NO synthétase mitochondriale et la NO synthétase endothéliale (NOS III) (Vergely et Rochette, 2002).

La NOS I est inductible par des cytokines et des endotoxines et produit de grandes quantités de NO·. À forte concentration, le NO· devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec un radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$) pour former un puissant oxydant : le peroxynitrite (ONOO^-). En outre, le peroxynitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants ($\text{NO}^{\cdot 2}$, $\cdot\text{OH}$, etc.) (Fontaine, 2002).

I. 1. 1. 6 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient un système de transport d'électrons similaire à celui de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce système comprend entre autre, des cytochromes P_{450} et P_5 qui serviraient à l'inactivation et l'élimination des molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques tels que les xénobiotiques, produisant ainsi des ERO (Bahorun ; 2006).

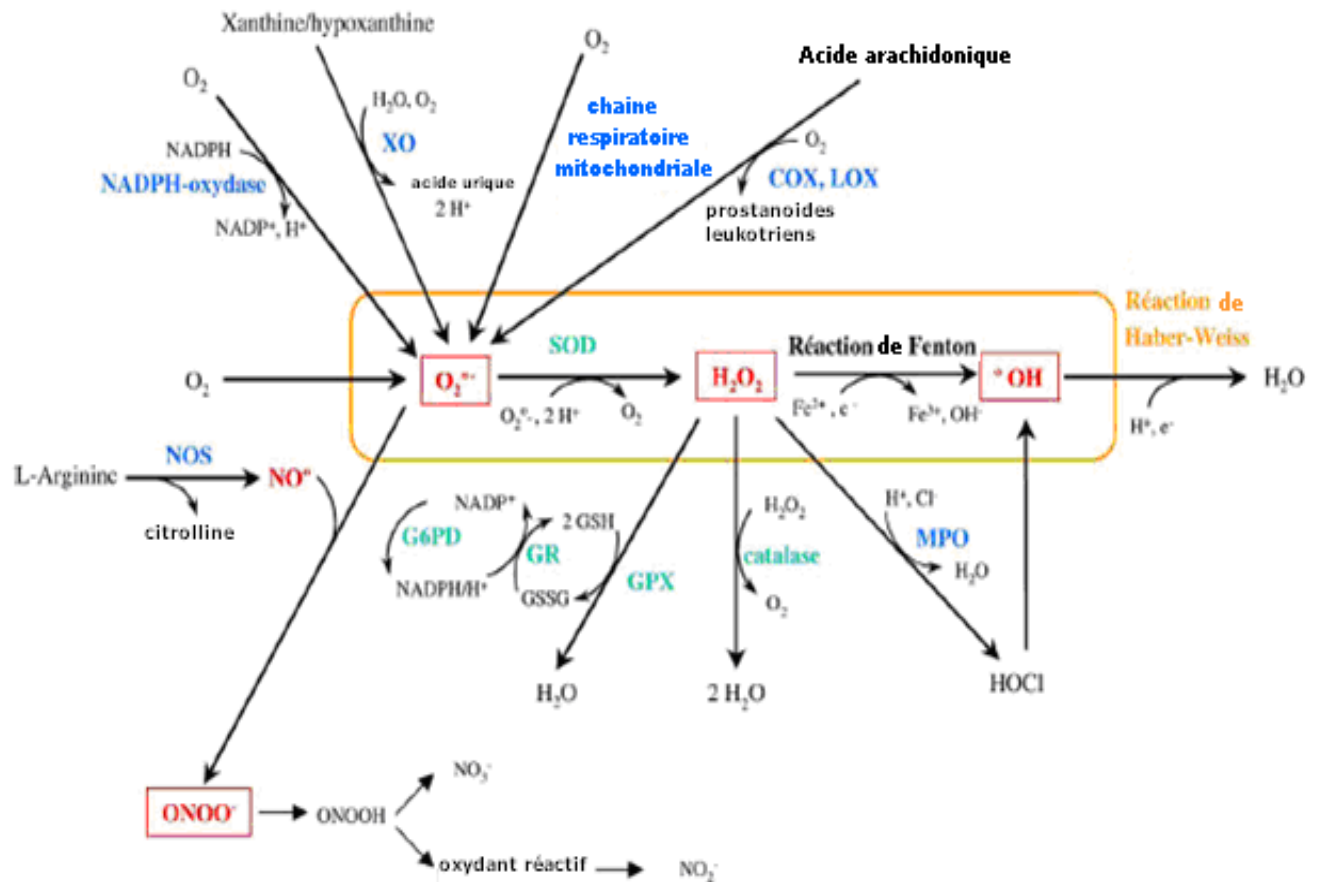


Figure N° 01 : Principales sources de radicaux libres (COX : cyclooxygénase; G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase; GSH : glutathion réduit; GR : glutathion réductase; GPX : glutathion peroxydase; GSSG, glutathion oxydé; LOX : lipoxygénase; MPO : myeloperoxydase (Margaill et al., 2005).

I. 1. 2 Rôle physiologique des radicaux libres

Les espèces réactives (ER) générées par les cellules ont longtemps été considérées comme des produits toxiques. Il est cependant apparu récemment que les ER, en faibles concentrations, jouent un rôle physiologique considérable, en particulier dans la transduction de signaux cellulaires, la phagocytose, le fonctionnement de certaines enzymes, la défense immunitaire contre les agents pathogènes, la destruction par apoptose des cellules tumorales, le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, la régulation de la dilatation capillaire, le fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, la fécondation de l'ovule et la régulation de l'expression des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Griendling et al., 2003 ; Favier, 2003).

Les ERO et les ERN à faible réactivité jouent un rôle crucial dans l'activation de plusieurs voies de signalisation. Le NO en est un exemple classique, puisqu'en activant

la guanylate cyclase cytosolique, il exerce des fonctions physiologiques dans le systèmes vasculaires, immunitaires, neuronaux ainsi que dans les fonctions métaboliques. Il en est de même de l'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Dröge, 2002 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006). Par contre, les ERO et les ERN les plus réactifs sont produits par l'organisme afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires ou pour réguler des fonctions cellulaires létales comme l'apoptose. La production des ERO est stimulée par des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines (Barouki, 2006).

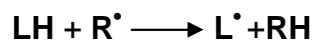
I. 1. 3 Rôle pathologique des radicaux libres

À ces fonctions biologiques, la réactivité particulière des ERO ajoute des propriétés toxiques importantes et diversifiées selon les cibles cellulaires atteintes (Barouki, 2006).

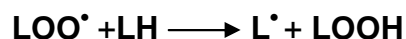
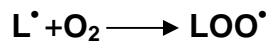
I. 1. 3. 1 Effets sur les lipides

Les doubles liaisons C=C des phospholipides, des glycolipides, et du cholestérol des membranes cellulaires et d'autres systèmes sont les cibles privilégiées de l'attaque radicalaire. Ce processus appelé peroxydation lipidique est à l'origine de la désorganisation structurelle et fonctionnelle des membranes. Cette attaque radicalaire se déroule en trois phases : initiation, propagation et terminaison (Girotti, 1998).

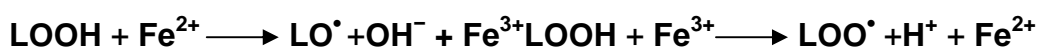
La peroxydation des lipides est généralement initiée par un radical (R[•]) particulièrement réactif selon la réaction :



Le radical lipidique (L[•], radical alkyle) formé lors de cette réaction réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxyde (LOO[•]) capable de transformer un autre acide gras polyinsaturé (LH) en radical lipidique, propageant ainsi la réaction de peroxydation (Schafer et *al.*, 2000 ; Antolovich et *al.*, 2001) :



L'hydroperoxyde lipidique (LOOH) formé lors de la phase de propagation est relativement stable. Cependant, en présence de métaux de transition, il peut reformer de nouveaux radicaux lipidiques (LO[•], radical alcoxyle ou LOO[•], radical peroxyde) selon la réaction suivante (Ré et *al.*, 2005):



La terminaison est entraînée par réaction de deux radicaux lipidiques ou par l'intervention d'un antioxydant liposoluble, dit « briseur de chaîne », tel que la vitamine E (Hennebelle, 2004).

I. 1. 3. 2 Effets sur les protéines

Les effets des ERO sur les protéines sont complexes, allant de l'oxydation du squelette protéique, c'est-à-dire de la chaîne polypeptidique conduisant à son clivage, à celle des chaînes latérales de différents acides aminés conduisant à des réticulations inter- ou intramoléculaires, la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines (figure N° 02) (Ré et *al.*, 2005 ; Valko et *al.*, 2006). La formation de nitrotyrosines est due au peroxyxynitrite hautement toxique (Kirkham et Rahman, 2006). Les acides aminés les plus sensibles à l'oxydation sont les résidus cystéine, méthionine, tyrosine, phénylalanine, tryptophane et histidine (Friguet, 2003).

Certaines protéines voient leur activité augmentée suite à une oxydation, mais la plupart deviennent inactives et particulièrement vulnérables à l'action des protéinases (Ré et *al.*, 2005).

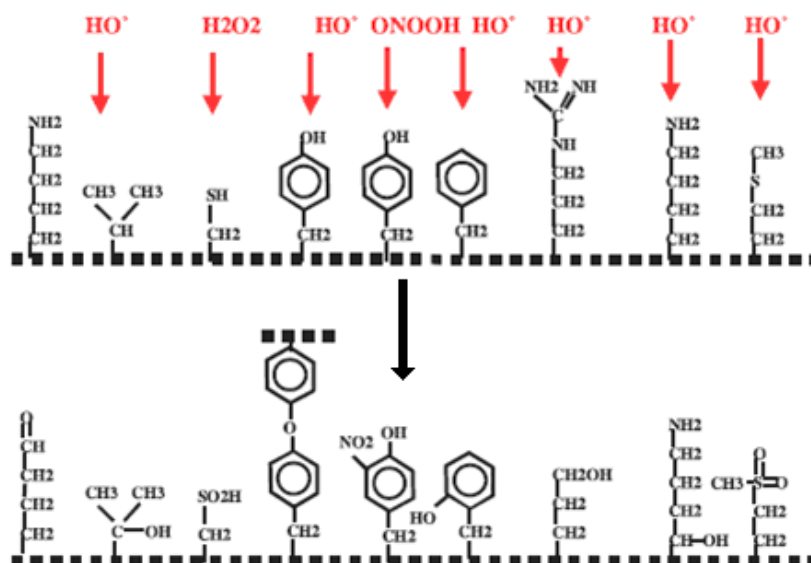


Figure N° 02 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

I. 1. 3. 3 Effets sur les acides nucléiques

Les radicaux libres peuvent interagir directement avec le désoxyribose de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques produisant des cassures simple ou double brins, des pontages ADN-protéines, des bases oxydées, des sites abasiques et des adduits intra-caténares (Barja, 2002). L'un des marqueurs d'une attaque oxydative des acides nucléiques est la présence de 8-hydroxy-guanine (8-OHG) (Valko et *al.*, 2007).

L'ADN mitochondrial est la cible privilégiée des oxydations par les ERO de fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire, de l'absence d'histones protectrices et de sa proximité directe de l'une des principales sources des ERO cellulaire : la chaîne respiratoire mitochondriale (Zhang et *al.*, 1990 ; Wiseman et Halliwell, 1996). En revanche, les processus de réparation de l'ADN semblent pouvoir éliminer pratiquement sans erreurs les lésions oxydatives de l'ADN. Cependant, si les dommages excèdent les capacités de réparation, la récupération cellulaire après un stress oxydatif peut être compromise (Ré et *al.*, 2005).

De part leur action sur les principaux constituants moléculaires de la cellule, les ERO sont à l'origine de nombreuses maladies (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I. 1. 3. 4 Stress oxydant et pathologies

Le stress oxydant est défini comme étant un déséquilibre entre les antioxydants et la charge pro-oxydante en faveur de cette dernière avec comme conséquence de nombreux impacts sur le fonctionnement cellulaire (Pincemail et *al.*, 1999). De nos jours, le stress oxydant semble être impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution. A titre d'exemple, les maladies ischémiques, cardiovasculaires et inflammatoires, l'hypertension, l'asthme, la mucoviscidose, les problèmes liés aux transplantations d'organes, les maladies neurologiques, le cancer ainsi que les maladies gastro-intestinales (Bandyopadhyay et *al.*, 1999 ; Sorg, 2004). En outre des dommages oxydants sont considérés comme facteur important dans le déclin progressif des fonctions des tissus liés au vieillissement (Fukagawa, 1999).

I. 2 Xanthine oxydase

I. 2. 1 Structure de la xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est une métallo-enzyme dont le molybdène constitue le site actif. Chez les mammifères elle existe sous deux formes alternatives du même produit de gène. Dans des circonstances normales, elle est produite sous sa forme déshydrogénase, xanthine déshydrogénase (XDH, EC 1.1.1.204), mais elle peut être aisément convertie en sa forme oxydase (XO, EC1.2.3.2) par l'oxydation de la fonction -SH ou par la protéolyse limitée (Okamoto et *al*, 2004). La XDH montre une préférence pour le NAD⁺ comme substrat d'oxydation, bien qu'elle peut également réagir avec l'O₂, tandis que la XO ne peut pas réagir avec le NAD⁺ et utilise l'O₂ exclusivement (Fukunari et *al.*, 2004).

La xanthine oxydoréductase est un homodimère composé de deux sous unités catalytiquement indépendantes avec une masse molaire de 150 kDa chacune (Enroth et *al.*, 2000) et chaque sous unité enzymatique contient un cofacteur de molybdoptérine (Mo-pt), deux centres [2Fe-2S] distincts et un cofacteur FAD (figure N°03) (Kuwabara et *al.*, 2003).

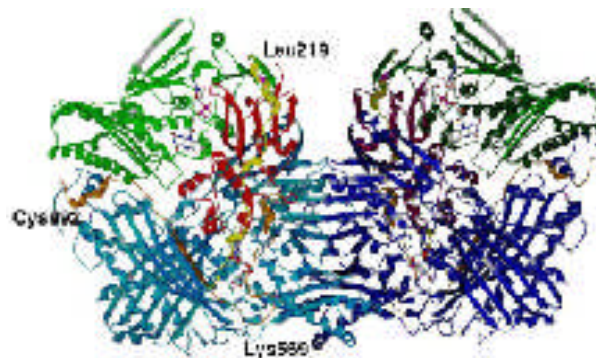


Figure N° 03 : Structure du dimère de xanthine déshydrogénase (Nishino et *al.*, 2003).

Le monomère de la XDH est formé de trois principaux domaines (figure N°04). Le domaine fer-soufre (résidus 3 –165) en rouge, le domaine FAD (résidus 226 –531) en jaune et le domaine Mo-pt (résidus 590 –1.331) en bleu. La boucle reliant le domaine FAD au domaine Mo-pt (résidus 537 –589) est montré en orange (Kuwabara et *al.*, 2003).

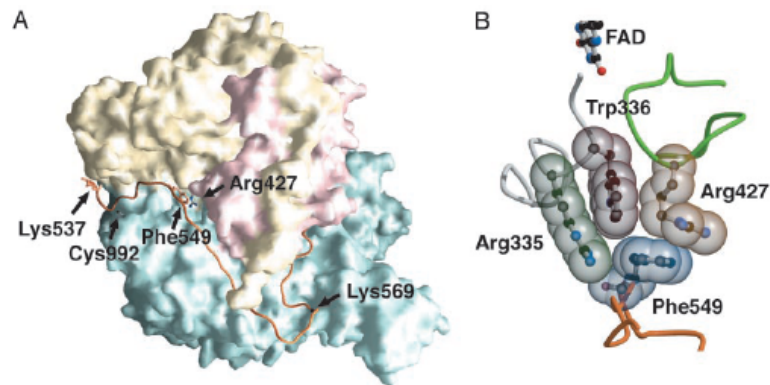


Figure N° 04 : (A) Les trois domaines du monomère de la XDH (B) Les résidus de la XDH qui sont impliqués dans la conversion de la XDH en XO (Kuwabara et *al.*, 2003).

I. 2. 2 La conversion de la forme XDH en forme XO

I. 2. 2. 1 Conversion par clivage protéolytique lors de l'ischémie–reperfusion

Dans les conditions normales, le calcium cytoplasmique est maintenu à un taux très bas (10^{-7} M). En effet, il est en permanence expulsé du cytoplasme ou concentré dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique, lieux de stockage intracellulaire. Une partie du calcium est également chélatée à des protéines, à l'intérieur de la cellule. Cette répartition du calcium dans les différents compartiments est possible grâce au fonctionnement de pompes membranaires. Celle-ci transporte le calcium de façon active en utilisant l'ATP comme source d'énergie. Au cours de l'ischémie, le manque d'oxygène laisse place au métabolisme anaérobie et en l'absence d'ATP, les pompes calciques membranaires vont cesser de fonctionner. La répartition du calcium se trouve donc fortement perturbée et la concentration de calcium libre dans le cytoplasme augmente rapidement et de façon importante (Eschwège, 2005).

Cette dérégulation de l'homéostasie calcique est un événement très important qui va entraîner de nouvelles perturbations. Des protéases calcium dépendantes vont être activées (Eschwège, 2005). L'une d'entre elle, particulièrement la trypsine ou la pancréatine, va permettre la conversion irréversible de la XD en XO, par clivage protéolytique de la boucle reliant le domaine FAD et le domaine Mo-pt (Okamoto et *al.*, 2002).

I. 2. 2. 2 Conversion par oxydation

La XDH peut être convertie en XO par oxydation des résidus cystéines. Des études sur des mutants ont montrés que les groupes thiol des résidus Cys 535 et Cys 992 sont impliqués dans la conversion réversible de la XDH en XO (Nishino et *al.*, 2005).

Les deux modifications (oxydation et protéolyse) induisent un réarrangement structural d'une boucle près de site FAD. Ce mouvement bloque l'axe au NAD^+ et change l'environnement électrostatique du site actif (figure N° 05), reflétant ainsi la commutation de spécificité au substrat observé pour les deux formes de l'enzyme (Enroth et *al.*, 2000).

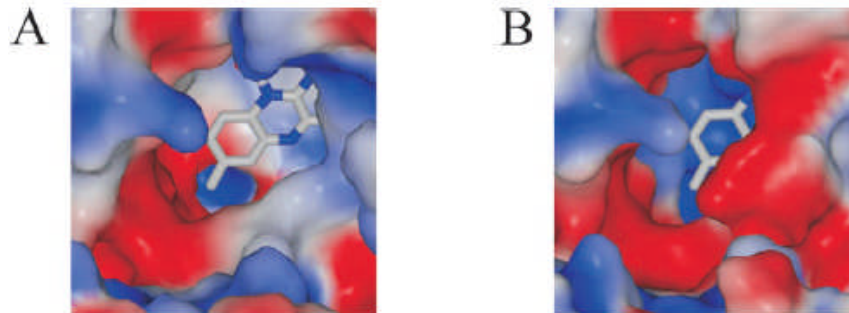


Figure N° 05 : L'environnement électrostatique du site FAD de la XDH (A) et de la XO (B) (Enroth et *al.*, 2000).

I. 2. 3 Rôle physiologique de la XOR

I. 2. 3. 1 Rôle dans le catabolisme des purines

La XOR catalyse les deux dernières réactions du catabolisme des bases puriques, selon le schéma de la figure N°06 :

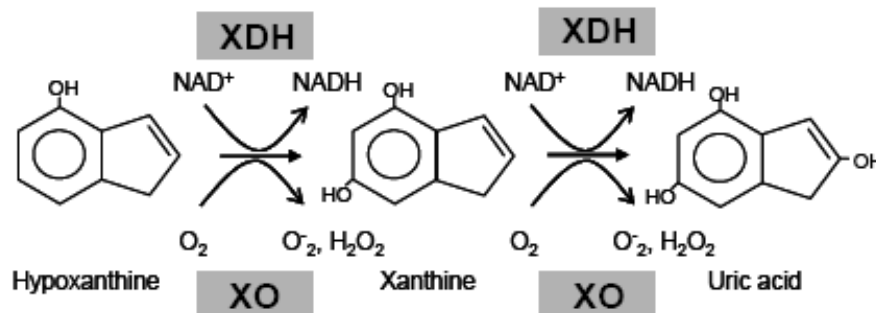


Figure N°06 : les réactions d'oxydation des purines catalysés par la forme déshydrogénase (XDH) et la forme (XO) de la xanthine oxydoréductase (Linder, 2005)

Il s'agit de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique, au cours desquelles deux électrons sont transférés de la xanthine au Mo, réduisant ainsi le Mo (VI) en Mo (IV). Par la suite, les deux électrons sont transmis au FAD par l'intermédiaire du centre fer-soufre avant d'être transféré vers un accepteur final qui peut être (figure N°07) :

- le NAD^+ , lorsque la XOR est sous la forme XDH
- l'oxygène moléculaire O_2 , lorsque la forme XO prédomine : il se forme alors de l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Mc Manaman et Bain, 2002 ; Mueller et *al.*, 2005).

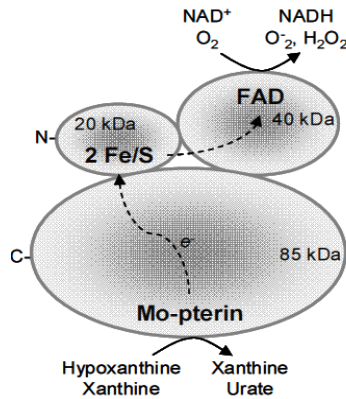


Figure N° 07 : La voie du transfert des électrons lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine ou de la xanthine en acide urique par la XOR (Linder, 2005).

I. 2. 3. 2 Rôle dans la réduction des nitrites en oxyde nitrique

Le radical oxyde nitrique (NO°) est un second messenger qui intervient dans plusieurs processus biologiques. Il est généralement produit par la NO synthétase mais il a été rapporté que le NO peut être également produit par réduction des nitrites inorganiques ou organiques par la XOR (Godber et *al.*, 2001). Dans des conditions anaérobiques, les nitrates inorganiques sont réduites par le site FAD en nitrites inorganiques qui sont à leur tour réduites en oxyde nitrique par le site Mo (figure N° 08) (Harrison, 2002). Aussi, il a été montré que l'augmentation de la concertation de la XOR dans certaines pathologies est accompagné d'une augmentation de taux de NO produit (Godber et *al.*, 2001).

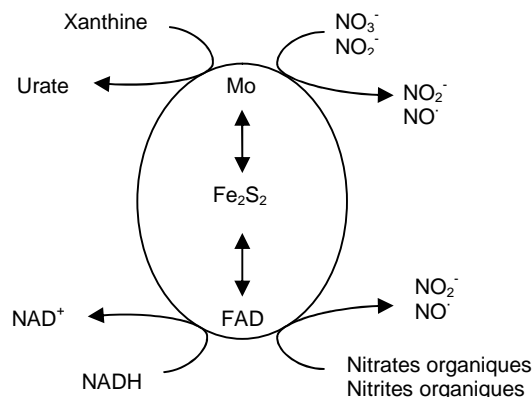


Figure N° 08 : Schéma d'un diagramme montrant la réduction des nitrites et des nitrates par la XOR (Harrison, 2002).

I. 2. 4 Rôle pathologique de la XOR

I. 2. 4. 1 La goutte

La dégradation des bases puriques par la XOR aboutit à la formation de l'acide urique. Ce dernier peut s'accumuler suite à sa surproduction ou sa mauvaise élimination (insuffisance rénale) et se déposer sous formes de cristaux dans les articulations, causant une inflammation douloureuse connue sous le nom de la goutte (Borel et *al.*, 1999).

I. 2. 4. 2 L'ischémie-reperfusion

L'ischémie est définie comme étant une insuffisance (hypoxie) ou un arrêt (anoxie) de l'irrigation sanguine d'un tissu ou d'un organe. La reperfusion désigne l'étape de la revascularisation et de la restauration de l'oxygène aux cellules. Ce phénomène est observé lors d'une greffe ou d'une transplantation d'un organe (Eschwège, 2005 ; Mink et Johnston, 2007).

Au cours de l'ischémie, la XO est convertie en XDH, comme décrit précédemment et l'hypoxanthine, le produit de la dégradation de l'ATP, est accumulé. A la reperfusion et en présence d'une quantité élevée d'hypoxanthine, cette dernière est oxydée en acide urique et l'oxygène moléculaire est réduit en superoxyde et en peroxyde d'hydrogène qui sont à l'origine de lésions tissulaires observées lors de syndrome d'ischémie-reperfusion (figure N° 09) (Pacher et *al.*, 2005).

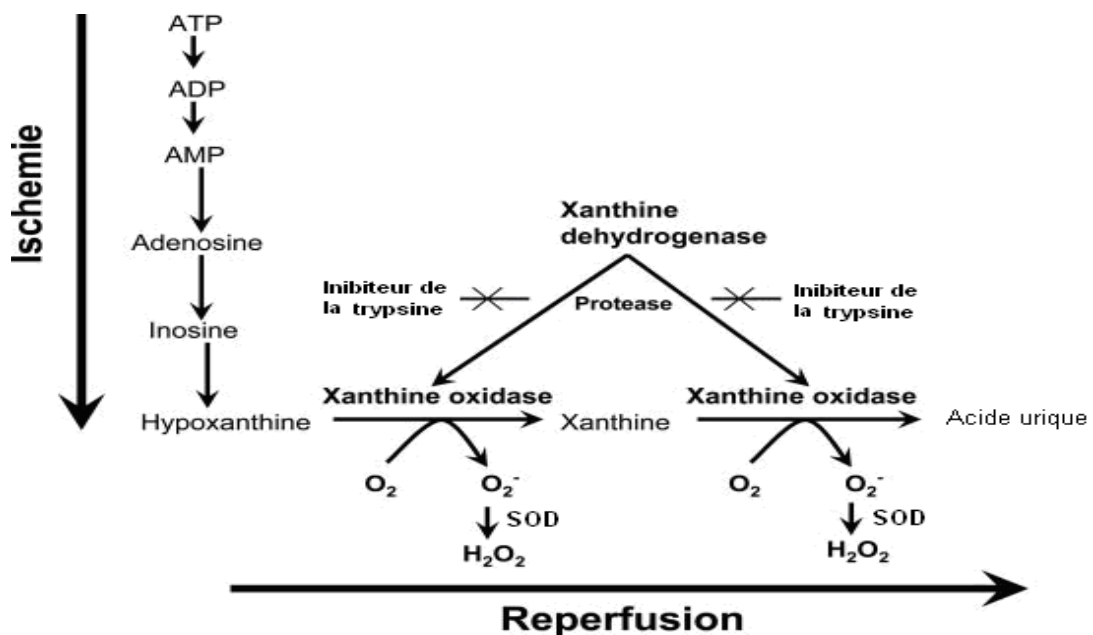


Figure N° 09 : l'hypothèse expliquant les lésions induites au cours de l'ischémie-reperfusion (Pacher et *al.*, 2005).

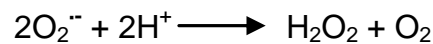
I. 3 Activité antioxydants

Pour lutter contre le stress oxydant, l'organisme dispose de systèmes de défense dont l'efficacité est renforcée par la présence d'oligo-éléments et de substances antioxydants d'origine végétale (Goudable et Favier, 1997). Le terme antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques dits endogènes ou non-enzymatiques exogènes (Ramasarma, 2006).

I. 3. 1 Les antioxydants enzymatiques

I. 3. 1. 1 Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire selon la réaction (Vamecq et *al.*, 2004) :



L'absence de cette enzyme est létale et une trop grande quantité, durant un stress oxydant, entraîne une production d' H_2O_2 excessive qui devient rapidement toxique pour la cellule. La quantité de SOD produite est contrôlée par des gènes spécifiques sensibles aux réactions d'oxydo-réduction (Wassmann et *al.*, 2004).

Il existe 3 isoformes de SOD chez les mammifères : une forme cytosolique et nucléaire associées aux ions cuivre et zinc (SOD Cyto.), une forme mitochondriale associée au manganèse (SOD Mn) et une forme extracellulaire (SOD EC) (Schreibelt et *al.*, 2007). La forme mitochondriale permet la dismutation quasi instantanée de l'anion superoxyde produit au niveau de la chaîne de transport des électrons. La SOD-EC est fermement liée à la membrane des cellules endothéliales et est particulièrement abondante dans l'interstitium de la paroi artérielle (Landmesser et *al.*, 2007).

I. 3. 1. 2 Catalase

La catalase est une enzyme antioxydante intracellulaire localisée principalement dans les peroxysomes, mais peut être retrouvée dans le cytoplasme. C'est une enzyme homotétramérique de 240 kDa et contenant un groupe d'hème et un NADPH dans son centre actif ; elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (Rahman et *al.*, 2006) :



La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydant est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée (Schreibelt et *al.*, 2007).

I. 3. 1. 3 Glutathion peroxydase (GSH-Px) et réductase (GSH-R)

Les glutathions peroxydases sont des enzymes à sélénium de structure très proche, ayant la propriété de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des hydroperoxydes lipidiques en eau et en alcool lipidique, respectivement (Figure N° 10). Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) (Schreibelt et *al.*, 2007). Plus de six types de GSH-Px ont été identifiées chez les mammifères. La GSH-Px1 est généralement exprimée dans le cytosol et dans les mitochondries alors que la GSH-Px2, GSH-Px4, GSH-Px5 et GSH-Px6 sont exprimées dans des organes et des tissus spécifiques (Schreibelt et *al.*, 2007).

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GSH-Px maintienne sa fonction (Rahman et *al.*, 2006).

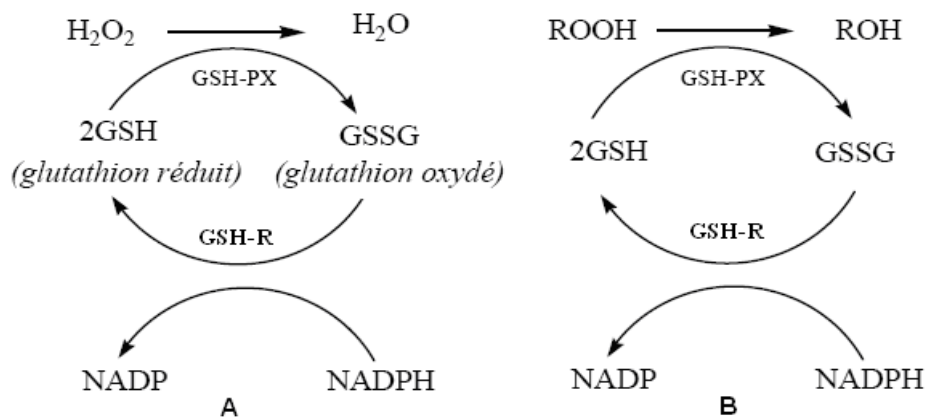


Figure N° 10 : Elimination du peroxyde d'hydrogène (A) et de l'hydroperoxyde (B) par la GSH-Px et la GSH-R (Milane, 2004).

I. 3. 2 Les antioxydants non-enzymatiques

Les mécanismes d'action des antioxydants non enzymatiques peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ERO et chélation des traces métalliques (activité anti-radicalaire).
- L'inhibition des enzymes impliqués dans la formation des radicaux libres tel que la XOR qui fera l'objet de notre étude.

I. 3. 2. 1 Les molécules à activité anti-radicalaire

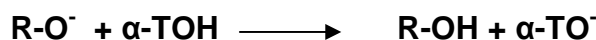
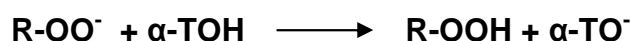
I. 3. 2. 1. 2 Le glutathion

Le glutathion, sous sa forme réduite, est un tripeptide (γ -glutamyl-cystéinyl-glycine) naturel synthétisé par les cellules et doté d'un groupement réducteur représenté par la fonction thiol de sa cystéine (Vincent et *al.*, 2004) ; son rôle d'antioxydant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSH-PX. Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que les vitamines C ou E (Goudable et Favier, 1997).

I. 3. 2. 1. 3 La vitamine E

On regroupe sous le terme de vitamine E la famille des tocophérols et des tocotriénols. Ils sont constitués d'un noyau 6-chromanol sur lequel est fixée une chaîne phytyle qui confère à la vitamine E sa liposolubilité. Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne phytyle. Les quatre isomères (α , β , γ et δ) des tocophérols et tocotriénols se distinguent entre eux par le nombre des groupements méthyles fixés sur le cycle phénolique (Traber et Packer, 2008).

Les tocophérols bloquent la propagation de la peroxydation lipidique en captant les radicaux peroxydes (ROO^\cdot) et alkoxydes (RO^\cdot) grâce aux groupements hydroxyles de leur cycle aromatique formant ainsi des hydroperoxydes lipidiques et le radical tocophéryle ($\alpha\text{-TO}^\cdot$) :



Le radical tocophéryle est peu réactif et n'induit pas de nouvelles réactions radicalaires (Traber et Atkinson, 2007). L' α -tocophérol est l'isomère le plus abondant et possède l'activité antioxydante la plus élevée (Devaraj et Traber, 2003). L'ordre d'efficacité des tocophérols est le suivant : $\alpha > \beta > \gamma = \delta$. (Traber et Packer, 2008).

Une partie de l'activité anti-oxydante de la vitamine E est due à sa capacité de chélater les ions métalliques et d'inhiber certaines enzymes productrices de radicaux libres notamment la XOR (Tableau I) (Wu et *al.*, 2008).

Tableau I : les valeurs des IC₅₀ (µg/ml) des activités antioxydantes de la vitamine E (Chang et al., 2007 ; Wu et al., 2008).

| DPPH | peroxydation lipidique | Cytochrome C | Chélation des ions métalliques | NADPH oxydase | XOR |
|--------|------------------------|--------------|--------------------------------|---------------|------|
| 172.21 | 34.37 | 0.18 | 477.52 | >100 | 0.79 |


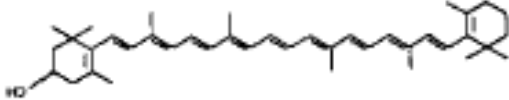

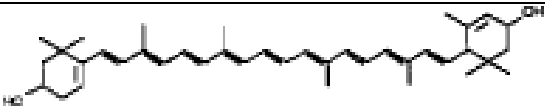



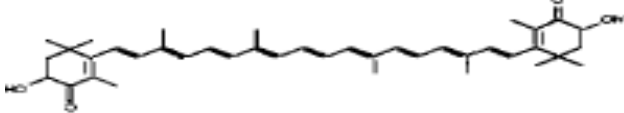
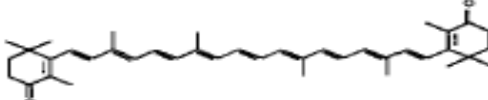
I. 3. 2. 1. 3 La vitamine C (L'acide ascorbique)

C'est un antioxydant hydrosoluble qui peut réagir directement avec de nombreux radicaux en générant le radical ascorbyle peu réactif et rapidement oxydable en anion ascorbyle (Pinnell, 2003). La Vitamine C inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E (Podsdek, 2007). Cependant à forte dose ou sous des conditions particulières, elle peut devenir prooxydante (Kontush et al., 2008).

I. 3. 2. 1. 4 Les caroténoïdes

Ils forment une grande famille de polyènes conjugués pigmentaires aux capacités anti-oxydante remarquables (Paiva et al., 1999). Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en doubles liaisons, ils sont d'excellents piègeurs de radicaux peroxy et d'oxygène singulet (Goudable et Favier, 1997). L'activité antioxydant des caroténoïdes varie d'un composé à un autre. Selon Miller (1996), le lycopène présente l'activité la plus importante (Tableau II).

Tableau II : activité antioxydants de quelques caroténoïdes (Miller, 1996).

| Caroténoïdes | Structure | TEAC (mM) |
|-------------------------|--|-----------------|
| Lycopène |  | 2.9 ± 0.15 |
| β -cryptoxanthine |  | 2.0 ± 0.02 |
| β -carotène |  | 1.9 ± 0.1 |
| Luteine |  | 1.5 ± 0.1 |
| Zeaxanthine |  | 1.4 ± 0.04 |
| α -carotène |  | 1.3 ± 0.04 |
| Echinenone |  | 0.7 ± 0.2 |
| Astaxanthine |  | 0.03 ± 0.03 |
| Canthaxanthine |  | 0.02 ± 0.02 |

TEAC : Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.

I. 3. 2. 1. 5 Les polyphénols

Les polyphénols (ou composés phénoliques) sont des molécules spécifiques du règne végétal et regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (Mompon, 1998). Les composés phénoliques des végétaux supérieurs sont issus de deux principales voies d'aromagenèse: la voie shikimate et la voie de l'acétate (Bruneton, 1999).

➤ La voie de l'acide shikimique représente le principal mode de formation des composés phénoliques chez les plantes (Annexe A) ; c'est aussi par ce mécanisme que sont formés les acides aminés aromatiques (Ribereau-Gayon, 1968). Elle débute par la

condensation de l'acide phosphoénolpyruvique avec l'erythrose-4 phosphate et conduit à la formation de l'acide phénylpyruvique qui donne naissance aux acides aminés aromatiques dont la désamination conduit aux acides cinnamiques et à leur dérivés (acide benzoïque, coumarines) (Richter, 1993 ; Guignard, 1996).

➤ Les composés phénoliques sont aussi formés par condensation répétée d'unités acétates. Ce mode de synthèse conduit à l'élaboration de composés mixtes tels que les flavonoïdes et les quinones (Annexe A) (Guignard, 1979).

Harbrone et Simmonds en 1964 classèrent les polyphénols en 15 classes selon leur structure chimique. Les 15 classes sont représentées dans le tableau III (Ribereau-Gayon, 1968).

Tableau III : les différentes classes de polyphénols (Ribereau-Gayon, 1968) :

| Structure | Classe |
|--------------------|--|
| C6 | phénols simples ; |
| C6-C1 | Acides benzoïques et composés voisins ; |
| C6-C2 | acétophénone et acides phénylacétiques |
| C6-C3 | Acides cinnamiques (acide caféiques) et composés voisins ; |
| C6-C3 | coumarines, isocoumarines et chromones ; |
| C6-C3-C6 | flavones ; |
| C6-C3-C6 | flavanones ; |
| C6-C3-C6 | isoflavones et composés voisins ; |
| C6-C3-C6 | flavonols, dihydroflavonols et composés voisins (catéchines) |
| C6-C3-C6 | anthocyanidines ; |
| C6-C3-C6 | chalcones, aurones, dihydrochalcones ; |
| C30 | biflavonyles (deux fois C6-C3-C6) |
| C6-C1-C6, C6-C2-C6 | benzophénones, xanthones, stilbénes ; |
| C6, C10, C14 | benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones ; |
| C18 | bétacyanines et bétaxanthines. |

D'autres auteurs subdivisent les polyphénols en trois classes : les phénols simples et les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (Hennebelle, 2004).

I. 3. 2. 1. 5. 1 Les phénols simples et les acides- phénoliques

Les phénols simples sont des composés phénoliques ayant un seul cycle de type C_6 et sont peu répandus dans la nature (Figure N° 11) (Ribereau-Gayon, 1968 ; Bruneton, 1993).

Les acides phénoliques, quand à eux, possèdent en plus de la fonction phénolique une autre fonction acide et sont subdivisés en deux sous groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Figure N° 11) (Bravo, 1998 ; Richter, 1993).

- Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque (ex : acide vanilique et acide gallique) et ont une structure de base de type C_6-C_1 (Bruneton, 1999).
- Les acides hydroxycinnamiques dérivent de l'acide cinnamique, ils ont une structure de base de type C_6-C_3 et une distribution très large (ex : acide caféique) (Bruneton, 1993).

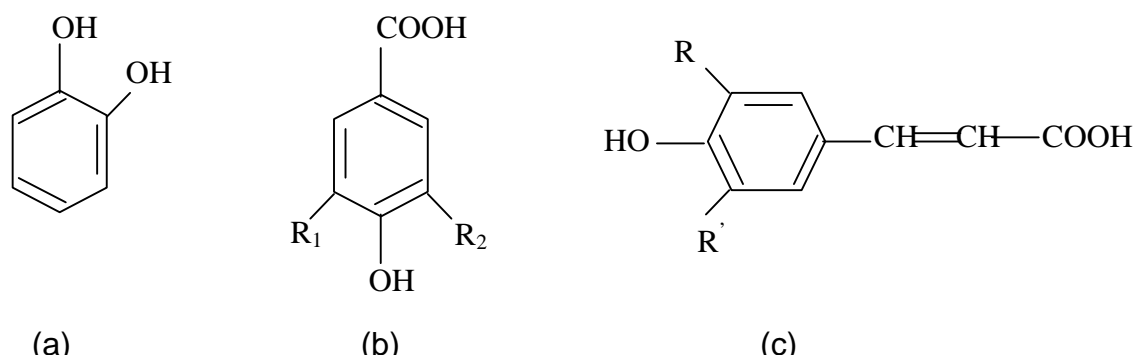


Figure N° 11 : Squelette de base des: (a) phénols simples, (b) dérivés de l'acide benzoïque, (c) dérivés de l'acide cinnamique (Ribereau-Gayon, 1968).

Les acides hydroxycinnamiques montrent une activité antioxydante plus élevée comparée à celle des acides hydroxybenzoïques. L'activité scavenger élevée de l'acide hydroxycinnamique peut être due au groupement $CH=CH-COOH$, qui a une plus grande capacité à céder un hydrogène et à stabiliser un radical libre que le groupement $-COOH$ des acides hydroxybenzoïques (Balasundram, 2006).

I. 3. 2. 1. 5. 2 Les flavonoides

Les flavonoïdes forment le groupe des polyphénols le plus largement distribué dans les plantes. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles et sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments (Bruneton, 1999). Leur structure commune (Figure N° 12) est celle de diphenylpropanes (C6-C3-C6) et sont composés de deux cycles aromatiques (cycle A et cycle B) liés par l'intermédiaire de trois atomes de carbone qui forment généralement un hétérocycle oxygéné (cycle C) (Podsdek, 2007). Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central : anthocyanidines, anthocyanides, flavonoles, iso-flavonoles, flavones, iso-flavones, flavanones, iso-flavones, flavanoles (catechines), iso-flavanoles, flavanes, iso-flavanes, aurones et coumarins (Havsteen, 2002 ; Cheyner, 2007). Des exemples illustratifs de chaque classe sont représentés dans le tableau IV.

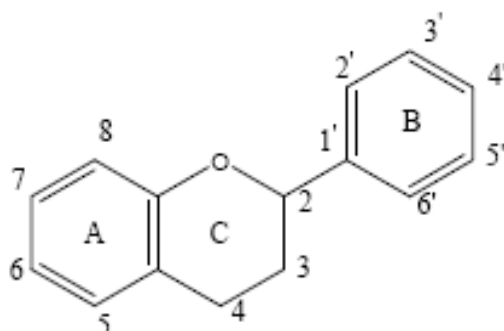
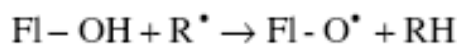


Figure N° 12 : Squelette de base des flavonoides (Apak, 2007).

Tableau IV : les différents groupes des flavonoïdes (Havsteen, 2002 ; Heim et al., 2002).

| Groupe | Structure | Exemples |
|----------------------------------|-----------|--|
| anthocyanidines et anthocyanides | | Apigénidine : R=H; R' =OH; R''=H |
| Flavonoles | | Kaempferol : R=H; R' =OH; Quercétine : R=OH; R' = OH. |
| Iso-flavonoles | | — |
| Flavones | | Orysin : R= H; R' =H; apigénin : R= H; R' = OH; luteolin : R= OH; R' = OH. |
| Iso-flavones | | Génistine: R=H; R'=OH, R''=H; |
| Flavanones | | Naringénin : R=H; R'=OH, R''=OH; Eriodictyol : R=OH; R'=OH, R''=OH; Liquiritin : R=H; R'=OH, R''=OH. |
| Iso- flavanones | | — |
| Flavanoles | | (+) catéchine : R=OH; R'=OH, R''=H; |
| Iso-flavanoles | | — |
| Flavanes | | — |
| Iso-flavanes | | Laxiflorane : R=H; R'=OH, R''=OCH ₃ ; |
| Aurones | | Aurensidin : R= H; R' = OH; Sulfuretin : R= H; R' =H; Marinetin : R= OH; R' = OH. |
| Coumarines | | Esculetine : R= H |

A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (FI-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Où R· représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle.

Le radical flavonoxy (FI-O·) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable comme illustré en figure N° 13.

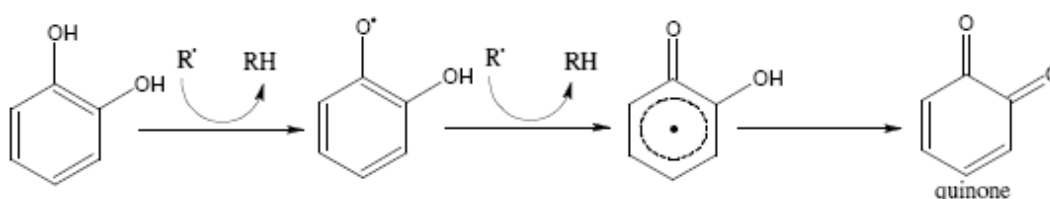


Figure N° 13 : Piégeage des ROS (R·) par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

En outre, le radical flavonoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet pro-oxydant indésirable des flavonoïdes (Pietta, 2000).

La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux dépend essentiellement de leur structure. Ainsi, les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les quatre critères suivants :

- Un degré d'hydroxylation élevé et une structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (3' et 4' catéchol) qui possède un meilleur effet électrodonneur et forme ainsi une cible favorable aux radicaux libres (Pietta, 2000 ; Heim et *al.*, 2002).
- La présence du groupement 5'-OH sur le cycle B (le groupement pyrogallol) (Balasundram et *al.*, 2006).
- La présence d'une double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C qui est responsable de la délocalisation des électrons (Pietta, 2000).
- La présence du groupement 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 (Heim et *al.*, 2002; Balasundram et *al.*, 2006).

Il a été rapporté que la O-méthylation et la glycosylation diminuent l'activité scavenger des flavonoïdes à cause des effets stériques qui perturbent la coplanarité du flavonoïde (Heim et *al.*, 2002). Aussi, Les flavonoïdes sont de bons chélateurs des ions métalliques (Derbel et Ghedira, 2005). Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont (figure N° 14) :

1. un noyau catéchol sur le cycle B,
2. les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C,
3. les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Pietta, 2000).

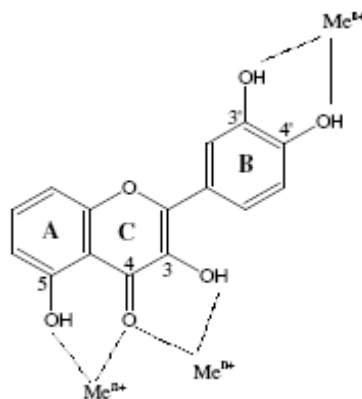


Figure N° 14 : Les sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me^{2+}) (Pietta, 2000).

I. 3. 2. 1. 5. 3 les tannins

Les tannins sont des molécules polyphénoliques hydrosolubles. Ils sont présents dans les feuilles, les fleurs et les graines des plantes (Watterson et Butler, 1983).

La plus part des propriétés biologiques des tannins sont liées à leur capacité de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines. Les liaisons non covalentes, hydrogènes, et hydrophobes participent à la formation de complexes tannins-protéines (Mc Mannus et *al.*, 1981). On distingue classiquement 2 groupes de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés ou proanthocyanidines (Figure N°15) (Bruneton, 1987).

- **les tannins condensés** : sont des polymères d'unités flavoniques le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C8 ou C4-C6 ; ils sont résistant à l'hydrolyse (A. Rahim et *al.*, 2008).
- **les tannins hydrolysables** : sont des esters de glucose (ou de composés apparentés) et d'acides-phénols : acide galique (tannins galiques) ou d'acide hétérocatéchique et ses dérivés (tannins ellagiques). Ces tannins sont caractéristiques des dicotylédones alors que les proanthocyanidols sont aussi présents chez les fougères et les gymnospermes (Bruneton, 1987).

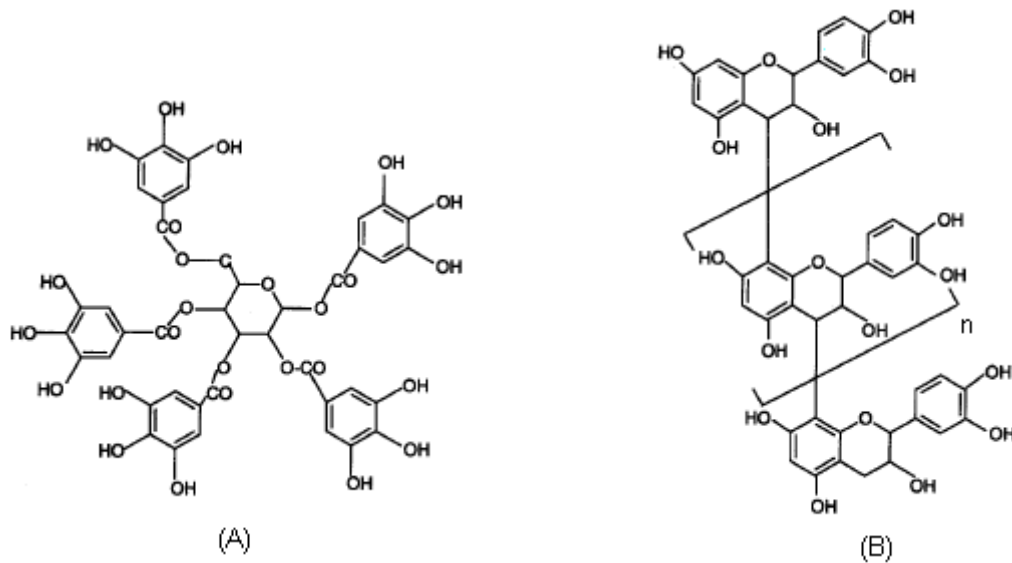


Figure N° 15 : Structure des tannins. **(A)** : hydrolysables, **(B)** : condensés (Bennick, 2002).

Les tanins hydrolysables et les procyanidines présentent des propriétés antioxydantes significatives. Ils inhibent aussi bien l'auto-oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate que la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes (Huang et Ferraro, 1991).

Les tanins hydrolysables sont de très bons capteurs de radicaux peroxyde et alkoxyde, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique ; tandis que les tanins condensés sont de très bons piègeurs de radicaux superoxydes (Derbel et Ghedira, 2005). Les tannins agissent comme donneurs de protons aux radicaux libres, d'où la formation de radicaux tanniques plus stables. Ils sont par conséquent de remarquables substances anti-radicalaires (Huang et Ferraro, 1991). Un exemple très souvent relaté est celui du thé vert dont la composition est dominée par les gallocatéchines (Nakagawa et Yokozawa, 2002).

Comme le montre le tableau N° V, un composé phénolique pur ou un extrait de plante médicinale n'a pas forcément le même effet sur tous les radicaux libres. A titre d'exemple, il peut être un bon inhibiteur de la peroxydation lipidique mais avec une très faible activité scavenger du radical hydroxyle. C'est le cas de l'extrait de *Caesalpinia digyna*, de l'acide gallique et caféique et du kaempferol. Pour cela, la combinaison de plusieurs composés phénoliques ou extraits de plantes est parfois plus avantageuse.

Tableau V : Les valeurs d'IC₅₀ (µg/ml) de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, de l'activité scavenger du radical DPPH et du radical hydroxyle de quelques extraits de plantes et polyphénols :

| Substance / plante | Peroxydation lipidique | Activité anti-DPPH | Activité anti- OH | Références |
|--|------------------------|--------------------|-------------------|--|
| Extraits de plantes médicinales | | | | |
| <i>Argyrea cymosa</i> | 82.33 | 13.33 | 54.00 | (Badami et al., 2007) |
| <i>Caesalpinia digyna</i> | 27.50 | 4.86 | 335.76 | (Srinivasan et al., 2007) |
| <i>Hypsizigus marmoreus</i> | - | 15.0 | 13.75 | (Lee et al., 2007) |
| <i>Limonium Wrightii</i> | 200 | 500 | 1300 | (Aniya et al., 2002) |
| <i>Ulmus davidiana</i> | - | 2.81 | 57.12 | (Jung et al., 2008) |
| <i>Astragali membranaceus</i> | 15.3 | 1152.1 | - | (Choi et al., 2002) |
| <i>Houttuynia cordata</i> | 6.5 | 434.8 | - | |
| <i>Morus alba</i> | 15.0 | 90.3 | - | |
| <i>Polygonatum odoratum</i> | 9.5 | 493.1 | - | |
| <i>Saururus chinensis</i> | 6.2 | 216.6 | - | |
| Acides phénoliques | | | | |
| Acide caféique* | 21.4 | 6.46 | 4400 | (Aniya et al., 2002 ; Thuong et al., 2009) |
| Acide gallique | 50 | 2.63 | 18800 | (Wu et al., 2007) |
| Flavonoïdes | | | | |
| Catéchine | 62.3 | 4.8 | 53.65 | (Choi et al., 2002 ; Badami et al., 2007) |
| Morine | 84.5 | 12.2 | - | |
| Naringenine | 98.4 | 481.3 | - | |
| Quercétine | 63.1 | 8.1 | 97.0 | |
| Rutine | 59.7 | 18.7 | - | |
| Kaempferol | 22.7 | 32.8 | >5000 | (Thuong et al., 2009) |
| Tannins | | | | |
| Pistafoline A | 3.30 | 3.37 | - | (Zhao et al. 2005) |
| Pistafoline B | 5.82 | 5.48 | - | |
| Inhibiteurs synthétiques | | | | |
| BHT | 90 | 10 | 21.6 | (Singh et al., 2006; Donga et Yao, 2008) |
| BHA | 5.19 | 6.16 | 86.16 | (Badami et al., 2007; Atmani et al., 2009) |

* : µM

I. 3. 2. 2 Inhibiteurs de la xanthine oxydase

I. 3. 2. 2. 1 Inhibiteurs synthétiques

Seul inhibiteur de la xanthine oxydase sur le marché canadien, aux États-Unis et au Royaume-Uni jusqu'à 2008, l'allopurinol est le médicament le plus souvent prescrit dans la prophylaxie de la goutte. Un sondage auprès de rhumatologues révèle que l'allopurinol est l'hypo-uricémiant de premier recours prescrit par 99 % d'entre eux. (Pohar et Murphy, 2006). L'allopurinol (4-hydroxypyrazolo-(3,4-d) -pyrimidine) est un analogue de l'hypoxanthine, à faible concentration, est à la fois un substrat et un inhibiteur compétitif de la xanthine oxydase. A plus forte concentration, il devient un inhibiteur non compétitif. Il est transformé par la xanthine oxydase en oxoallopurinol ou oxypurinol (4,6-dihydroxypyrazolo-(3,4-d)pyrimidine), qui est lui-même un inhibiteur non compétitif de la xanthine-oxydase (figure N° 16) (Krenitsky, 2007).

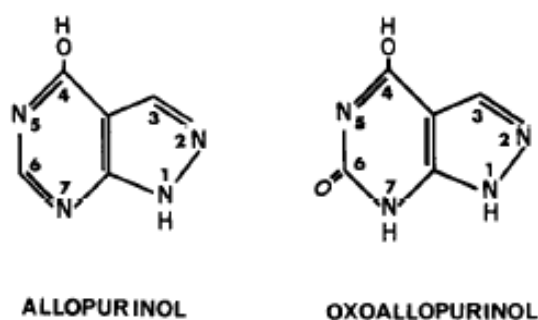


Figure N° 16 : Structure de l'allopurinol et de l'oxoallopurinol (Krenitsky ,2007).

Des études récentes sur le mécanisme d'action de l'allopurinol révèlent que la conversion de l'allopurinol en oxypurinol est accompagnée d'une production concomitante du radical superoxyde, ce qui n'est pas le cas avec l'oxypurinol (Galbusera et *al.*, 2006). En outre il s'est avéré que l'allopurinol peut induire le syndrome d'hypersensibilité et le syndrome de Stevens-Johnson chez les patients (Hsieh et *al.*, 2007).

Plus récemment les scientifiques se tournent vers d'autres inhibiteurs comme le febuxostat (TEI-6720, TMX-67). Contrairement à l'allopurinol et l'oxypurinol qui présentent l'inconvénient d'inhiber, en plus de la XO, d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme des bases puriques et pyrimidiques du fait de leurs similitudes structurelles avec les bases puriques, le febuxostat (TEI-6720, TMX-67) est un

puissant inhibiteur sélectif de la XO car il ne présente pas d'analogie structurelle avec les bases puriques (figure N° 17) (Takano et *al.*, 2005).

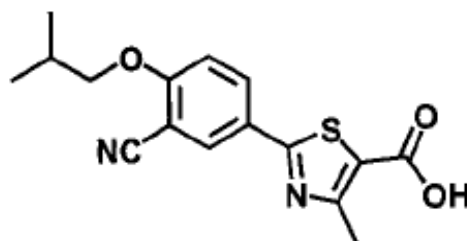


Figure N° 17 : Structure de Febuxostat (TEI-6720) (Fukunari et *al.*, 2004).

Le febuxostat (TEI-6720; TMX-67) est un médicament administré par voie orale destiné à la prise en charge de l'hyperuricémie et de la goutte. En inhibant de façon sélective la xanthine oxydase, le febuxostat réduit le taux d'acide urique sérique, et peut ainsi prévenir la goutte aiguë.

Des données probantes révèlent que le febuxostat est un inhibiteur de la xanthine oxydase plus puissant que l'allopurinol et qu'il serait donc avantageux dans les cas réfractaires (Pohar et Murphy, 2006). Le febuxostat présente un mode d'inhibition de type mixte, avec un K_i de 0,6 nM (Takano et *al.*, 2005).

I. 3. 2. 2. 2 Les inhibiteurs d'origine végétale

Les effets indésirables des inhibiteurs de synthèse ont incité les chercheurs à la découverte d'inhibiteurs d'origine végétale. Plusieurs extraits de plantes médicinales appartenant à différentes familles ont été testés et les principes actifs ont été isolés et étudiés.

I. 3. 2. 2. 2. 1 les acides phénoliques

Les études menées sur l'activité biologique des acides phénoliques révèlent que certains composés appartenant à cette classe de polyphénols sont de bons inhibiteurs de la XOR Chang et ses collaborateurs (2007) ont montré que l'acide caféique est un puissant inhibiteur compétitif de la XOR (tableau VI). Sa structure chimique présente deux groupements hydroxyles sur le noyau benzoïque (R1 et R2) (figure N° 18).

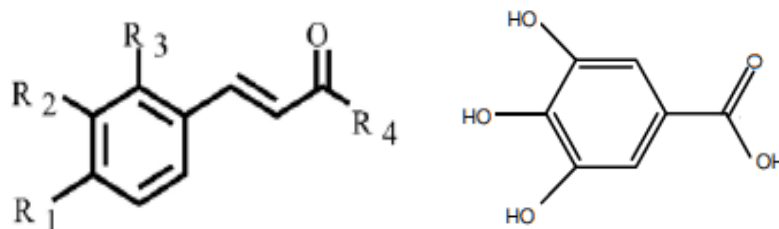


Figure N° 18 : Structure chimique de l'acide caféique (R₁=OH; R₂=OH, R₃=H et R₄=OH), l'acide ferulique (R₁=OH; R₂=OCH₃, R₃=H et R₄=OH) à gauche et de l'acide gallique à droite (Fogliani et *al.*, 2005 ; Chang et *al.*, 2007).

L'acide caféique interagit favorablement avec le site actif de la XOR grâce à la formation de liaisons hydrogènes et aux interactions électrostatiques entre les deux groupements hydroxyles et la chaîne d'acides aminés Arg 880, Glu 1261, et Thr 1010 de la XOR (figure N° 19). L'acide ferulique qui présente une structure similaire mais avec une substitution de groupement hydroxyle avec un groupement méthoxy exhibe une activité anti-xanthine oxydase plus faible que l'acide caféique, ce qui démontre l'importance des deux groupements hydroxyles dans la liaison avec la XOR (Chang et *al.*, 2007). L'acide gallique, présente aussi ces deux groupements est également un bon inhibiteur de la XOR (figure N° 18) (Fogliani et *al.*, 2005)

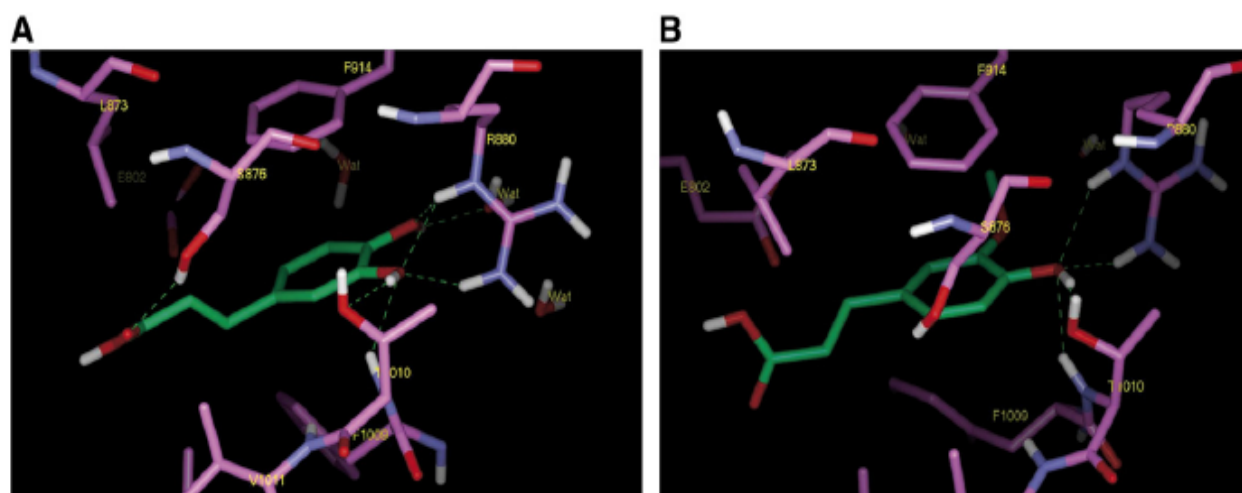


Figure N° 19 : Modèle moléculaire de la liaison des phenylpropénoïdes au site actif de la xanthine oxydase. Modèle tridimensionnel des dérivés de phenylpropénoïdes : (A) acide caféique, (B) acide ferulique (Chang et *al.*, 2007).

I. 3. 2. 2. 2 Les flavonoïdes

L'étude de l'activité anti-xanthine oxydase des flavonoïdes montre que les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols n'ont aucune influence sur l'activité de la xanthine oxydase et seuls les flavonols et les flavones ont la capacité d'inactiver l'enzyme. En effet, les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols diffèrent des flavones et des flavonols par l'absence de la double liaison entre C-2 et C-3. Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C, suggérant une importance capitale de cette double liaison dans l'inhibition de la XO (Cos et *al.*, 1998 ; Lin et *al.*, 2002).

Des études sur la relation structure-activité combinées à des modélisations informatiques, ont montré que la présence de groupements hydroxyles en C7 et C5 et le groupement carbonyle en C4 contribuent favorablement aux liaisons hydrogènes et aux interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et les acides aminés Arg 880, Glu 1261, et Thr 1010 du site actif (figure N°20). L'apigénine qui présente ces trois groupements est un bon inhibiteur de la XOR. Cependant la présence du groupement hydroxyle en C-3 diminue légèrement l'activité, cela peut être expliqué par la déstabilisation de l'extension de l'hydroxyle polaire dans la région apolaire du site actif induisant une diminution de l'affinité de liaison (Lin et *al.*, 2002).

Les flavones montrent des activités presque similaires quelque soit les substituants du cycle B, indiquant que le cycle B n'a que peu d'influence sur l'inhibition de l'enzyme pour les flavones (Cos et *al.*, 1998).

Les flavonoïdes glycosylés, comme l'isovitexine (tableau VI), ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés, à cause de l'encombrement stérique induit par ces groupements glycosidiques (Lin et *al.*, 2002).

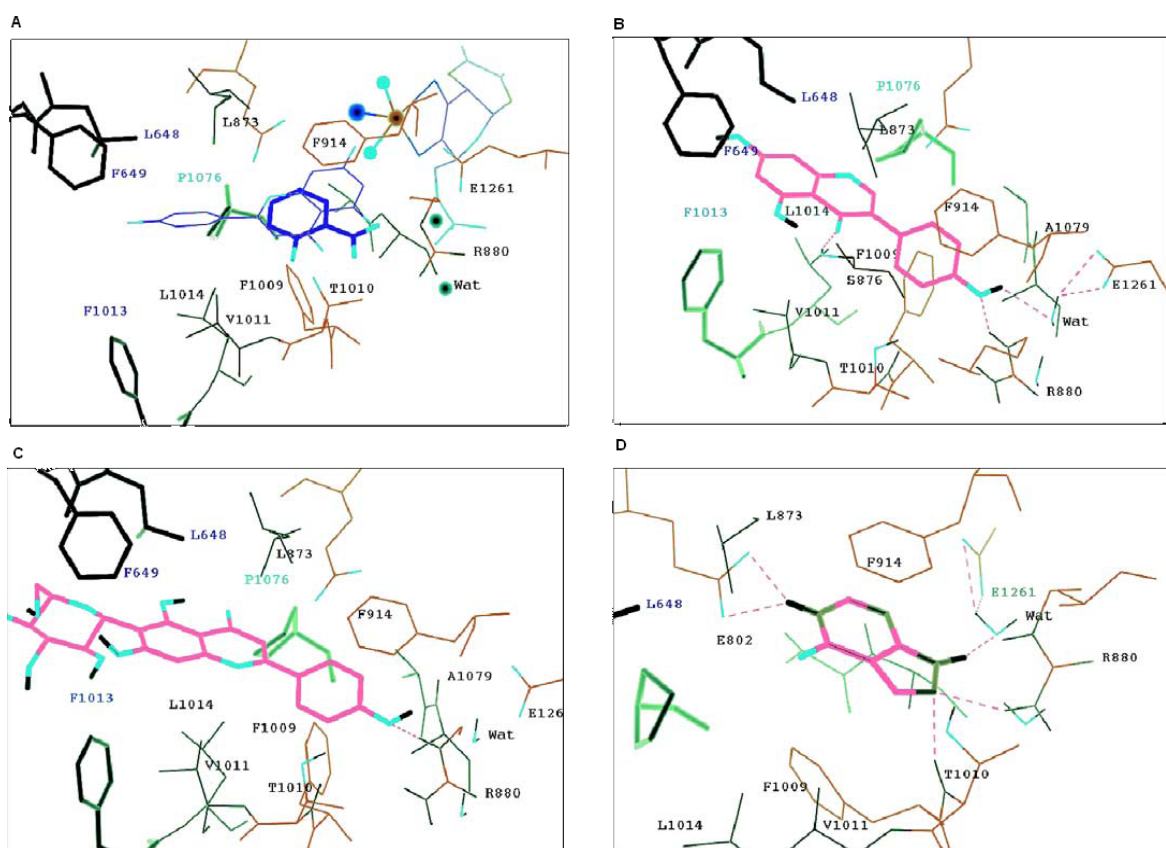


Figure N° 21 : Modèle moléculaire de la liaison des flavonoïdes au site actif de la xanthine oxydase. Modèle tridimensionnel de l'apigénine (rose) superposé sur le salicylate (bleu) (A), genestéine (B), isovitexine (C) et l'allopurinol (D) (Lin et *al.*, 2002).

Tableau VI : La valeur de K_i et le type d'inhibition de quelques flavonoïdes (Lin et *al.*, 2002 ; Takano et al., 2005).

| Composés | Mode d'inhibition | K_i (mM) |
|-------------|-------------------|---------------------|
| Allopurinol | Compétitive | 0.34 ± 0.22 |
| Febuxostat | Mixte | $0.6 \cdot 10^{-6}$ |
| Apigénine | Compétitive | 0.61 ± 0.31 |
| Quercétine | Compétitive | 1.40 ± 0.78 |
| Myricétine | Compétitive | 2.17 ± 1.13 |
| Genistéine | Compétitive | 3.23 ± 1.01 |
| Isovitexine | Compétitive | 5.22 ± 2.02 |

I. 3. 2. 2. 2. 3 Les tannins

Hatano et ses collaborateurs démontrèrent en 1990 que l'effet inhibiteur des tannins hydrolysables augmente avec l'augmentation de leur poids moléculaire et de leur nombre en groupement OH porté sur le noyau phénolique (Hatano et *al.*1990). Des études plus récentes faites sur les tannins ellagiques (hydrolysables) isolés à partir de *Cunonia macrophylla* de la famille des *Cunoniaceae*, montrent que le poids moléculaire n'est pas le seul facteur influençant l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase par les tannins mais l'efficacité dépend aussi de la structure du composé isolé. Pour certains composés à poids moléculaire élevé comme les acides mallotinique, mallorepanine et chebulagique l'activité était faible alors que d'autres molécules à faibles poids moléculaire comme l'acide ellagique et l'acide ellagique-4-O-b-D D-xylopyranoside exhibent une forte activité avec une IC₅₀ de 2,8 µg/ml et 2,1 µg/ml, respectivement (tableau VII). Cette efficacité semble être due à la présence du xylose (Fogliani et *al.*, 2005).

Tableau VII : les valeurs des IC₅₀ (µg/ml) de l'activité anti-xanthine oxydase de quelques composés phénoliques et extraits de plantes.

| Substance / Plante | IC ₅₀ (µg/ml) | Références |
|--|--------------------------|---------------------------|
| Extraits de plantes médicinales | | |
| <i>Morus alba</i> | 5.9 | Choi et al., 2002 |
| <i>Houttuynia cordata</i> | 15.5 | |
| <i>Saururus chinensis</i> | 25 | |
| <i>Astragali membranaceus</i> | 59.2 | |
| <i>Polygonatum odoratum</i> | 90.9 | |
| <i>Allium Cepa</i> | 13 | Hanaee et al., 2004 |
| <i>Cinnamomum cassia</i> | 18 | Kong et al., 2000 |
| <i>Chrysanthemum indicum</i> | 22 | |
| <i>Lycopus europaeus</i> | 26 | |
| <i>Lychnophora trichocarpa</i> | 28.84 | Ferraz Filha et al., 2006 |
| <i>Lychnophora passerina</i> | 44,12 | |
| <i>Lychnophoriopsis candelabrum</i> | 49.34 | |
| <i>Lychnophora staavioides</i> | 51.06 | |
| Acides phénolique | | |
| Acide caféique | 65.58 | Chang et al., 2007 |
| Acide gallique | 7.1 | Fogliani et al., 2005 |
| Flavonoïdes | | |
| Quercétine | 0.9 | Choi et al., 2002 |
| Morine | 8.6 | |
| Naringénine | 20.3 | |
| Catéchine | 23.3 | |
| Rutine | 116.6 | |
| Tannins | | |
| Acide ellagique-4-O-b-D D-xylopyranoside | 2.1 | Fogliani et al., 2005 |
| Acide ellagique | 2.8 | |
| Acide chebulagique | 46.3 | |
| Corilagine | 72.9 | |
| Mallorepanine | >100 | |
| Inhibiteurs synthétiques | | |
| Allopurinol | 0.82 | Hanaee et al., 2004 |

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

II. 1 Matériels

En raison de leur utilisation en médecine traditionnelle locale et l'absence de travaux antérieurs sur leur activité biologique et leur composition biochimique, l'écorce de *Ulmus campestris* et l'écorce de *Fraxinus angustifolia* ont été choisies afin d'évaluer les activités anti-radicalaire et anti-xanthine oxydase de leurs extraits.

Les deux plantes ont été cueillies dans la forêt d'Amizour wilaya de Bejaia en octobre 2007 dans un endroit naturel loin de toute pollution.

II. 1. 1 *Ulmus campestris* :

L'orme est largement distribué dans toute la zone tempérée. Il est réparti dans le sud et l'est de l'Europe, l'Afrique du nord (Algérie, Tunisie et Maroc), l'Asie mineure et une partie de l'Asie centrale (Lepoittevin, 2004). C'est un arbre d'environ 30 m, à l'écorce fissurée, aux feuilles doublement dentées, souvent asymétriques et rudes au toucher. Les fleurs sont sans pétales, en glomérules rouges sur les rameaux de l'année précédente. Les fruits sont ailés et appelés samares. Ils apparaissent en Mars-Avril, avant les feuilles et sont groupés en boules. Les graines sont produites à 40 ans (Mauhin, 2005).

II. 1. 1. 1 Nom vernaculaire

En Algérie, il est connu sous le nom d'Ulmo, en France sous l'orme champêtre (Orme : nom issu de l'ancien français *olme*, lui-même issu du latin *ulmus*), quant aux pays anglophones ils le surnomment Elem.

II. 1. 1. 2 Usages traditionnels

Ulmus campestris fait partie de la liste des plantes médicinales recensées en Algérie et possède des vertus médicinales : Appliqué localement, il possède des propriétés calmantes dans les cas d'irritations et d'inflammations, solutionne les problèmes de goutte et soulage les rhumatismes, et oralement il traite les problèmes gastro-intestinaux et urinaires, les diarrhées, les dysentéries et les maux de gorge (Lepoittevin, 2004). En usage externe, on s'en sert pour les dermatoses. L'extrait de cette plante est astringent, diurétique, diaphorétique et dépuratif (Mauhin, 2005).

II. 1. 1. 3 Place dans la systématique

Royaume : plantae

Embranchement : Spermatophytes (Phanérogames)

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsides (SYN. : Dicotylédones)

Ordre : Urticales

Famille : Ulmacées

Genre : *Ulmus*

Espèce : *Ulmus campestris*

(Gausson, 1982)



Figure N° 22 : Photographies de l'écorce de *U. campestris*

II. 1. 1. 4 Principes actifs de la plante

Peu de données existent sur la composition de cette plante ; L'élément principal de l'écorce est le mucilage composé de sucres hydrosolubles. La présence de l'amidon a été démontrée (Lepoittevin, 2004). La plante est riche en composés phénoliques, notamment les tannins et en substances amères (Mauhin, 2005 ; Baba Aissa, 2000).

II. 1. 2 *Fraxinus angustifolia* :

Fraxinus angustifolia est un arbre caractéristique des forêts méditerranéennes (Tonon, et al. 2001). Il possède des feuilles étroites et il est de taille moyenne, qui atteint rarement 20 m de haut (Baba Aissa, 2000).

II. 1. 2. 1 Nom vernaculaire

En Algérie il est connu sous le nom d'aslène ou encore dardar, par contre en France il est connu sous le nom de frêne.

II. 1. 2. 2 Usages traditionnels

Fraxinus est utilisé en médecine traditionnelle pour ces effets purgative et diurétiques aussi bien que pour le traitement de la constipation, de l'hydropisie, de l'arthrite, de la douleur rhumatismale et de la cystite (Calis et al., 1993). Les feuilles et les fruits du frêne sont anti-rhumatismaux, astringents, laxatifs et fébrifuges. L'écorce est anti-hémorroïdaire, fébrifuge et astringente (Baba Aissa, 2000).

II. 1. 2. 3 Place dans la systématique

Royaume : plantae

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Magnoliopsides

Ordre : Scrophulariales

Famille : Oleaceae

Genre : Fraxinus

Espèce : *Fraxinus angustifolia* (Calis, 1995).



Figure N° 23: Photographie de l'écorce de *F. angustifolia*

II. 1. 2. 4 Principes actifs de la plante

Ce sont essentiellement les tannins, les résines, les glucosides, les coumarines, les flavonoides et la vitamine C (Baba Aissa, 2000). De récentes études phytochimiques ont montré que l'écorce de *Fraxinus angustifolia* est pauvre en flavonoides mais modérément riche en tannins (Atmani et *al.*, 2009).

II. 2 Méthodes

II. 2. 1 Séchage

Après la récolte, le matériel végétal a été débarrassé des débris, lavé à l'eau et séché à l'étuve à 40°C pendant une semaine. Il est, ensuite, conservé dans des flacons à l'abri de la lumière. Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toutes activités enzymatiques responsables de leur dénaturation.

II. 2. 2 Broyage et tamisage

L'écorce séchée a été broyée à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Les poudres obtenues ont été tamisées à travers un tamis de 125µm puis de 63µm afin de récupérer une poudre de granulométrie inférieure à 63µm.

II. 2. 3 Extraction des polyphénols

Le protocole d'extraction adopté dans cette étude est celui décrit par Chiang *et al.* (1994) avec quelques modifications (figure N° 24).

Procédure

Les poudres des écorces de *Ulmus campestris* et de *Fraxinus angustifolia* ont été macérées dans de l'éthanol pure (99,98%) avec un rapport de (1g / 4ml) sous agitation et à l'ombre dans des ballons scellés convenablement pendant 24 heures. Le mélange est ensuite transféré dans des éprouvettes à décantation pendant 24 heures. Le surnageant a été récupéré, centrifugé à 1500g durant 10min puis séché sous la hôte et à température ambiante jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Une partie de l'extrait éthanolique sec a été reprise dans un mélange d'éthyle acétate et d'eau avec un rapport de 3/1 et laissée macérer pendant 24 heures. Les deux phases organique et aqueuse ont été séparées puis séchées.

Le résidu sec d'éthyle acétate a été pesé puis deux parties égales de cet extrait ont été soumises à une troisième extraction, l'une dans un mélange hexane/eau (3 /1) et l'autre dans un mélange chloroforme/eau (3/1). Après une macération de 24 heures, les deux phases organique et aqueuse ont été récupérées séparément, séchées puis pesées.

Le taux d'extraction de chaque étape est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_1 - P_0) / P] 100$$

Tel que :

P₀ : poids du cristalliseur vide.

P₁ : poids du cristalliseur avec l'extrait sec.

P : poids de la poudre ou de l'extrait sec soumis à l'extraction.

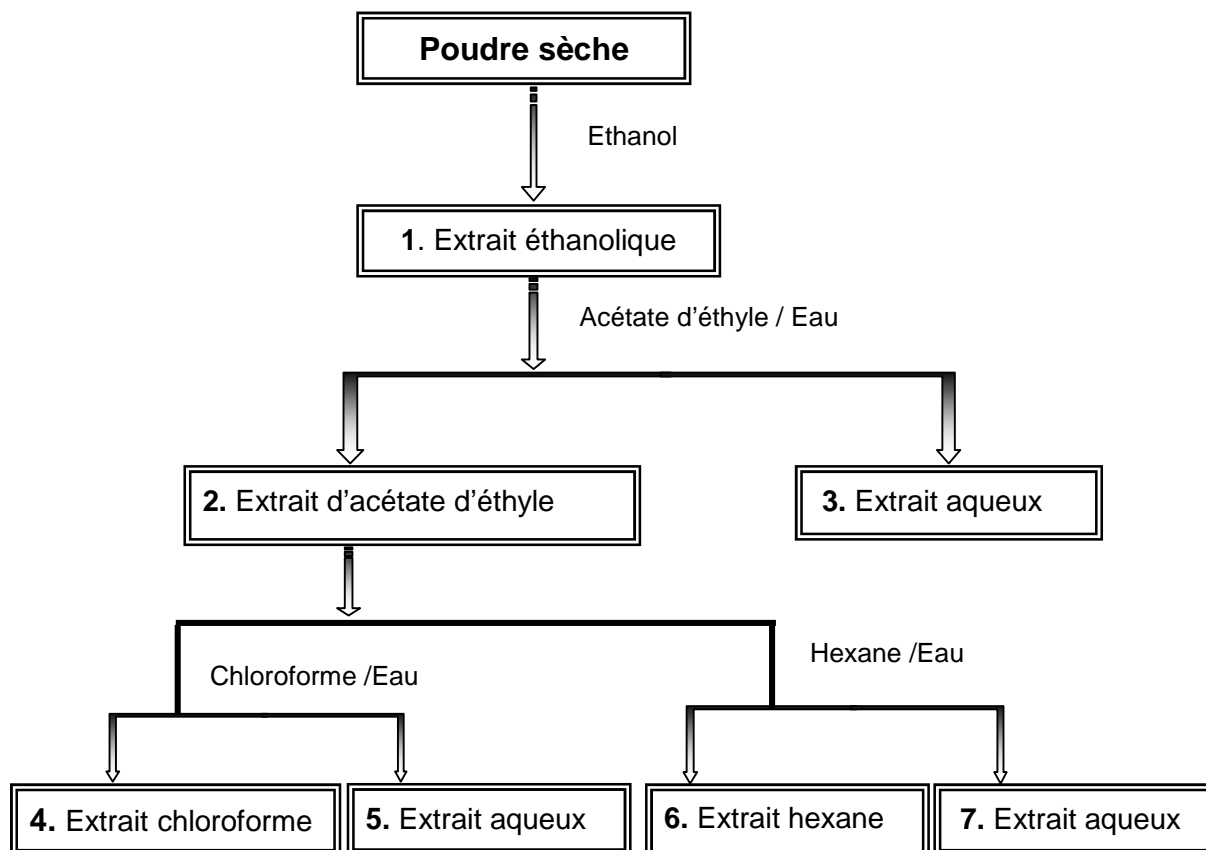


Figure N° 24 : schéma de protocole d'extraction des principes actifs à partir de la poudre de l'écorce de *Ulmus campestris* et de l'écorce de *Fraxinus angustifolia*.

II. 2. 4 Les dosages

II. 2. 4. 1 Dosage des phénols totaux

La quantité des phénols totaux dans les extraits des écorces de *Ulmus campestris* et de *Fraxinus angustifolia* a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu proposée par Singleton et Rossi (1965) et modifiée par *Kahkonen et al.* (1999). C'est une méthode colorimétrique simple, rapide et présentant l'intérêt de ne pas nécessiter un chauffage. Cette méthode colorimétrique est basée sur la formation d'un complexe de coloration bleu entre les polyphénols et l'acide phosphomolybdène-phosphotungstène du réactif de Folin-Ciocalteu. Le complexe coloré formé possède un maximum d'absorption à 765 nm.

- **Procédure**

Un volume de la solution d'extrait est ajouté à du réactif de Folin-Ciocalteu, le tout a été introduit dans un tube de centrifugation et additionné de 0,8 ml de carbonate de sodium (7,5%). Le mélange a été vortexé puis incubé à température ambiante et à l'obscurité

pendant 30min. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 765 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait.

En se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec la catéchine (annexe B) les concentrations en phénols totaux ont été calculées et exprimées en milligrammes d'équivalent catéchine par gramme d'extrait sec.

II. 2. 4. 2 Dosage des flavonoïdes

L'analyse quantitative des flavonoïdes a été réalisée selon le protocole de Mimica-Dukić (1992) in (Maksimović *et al.*, 2004) avec quelques modifications. La méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à chélater des métaux (chlorure d'aluminium) et de former un complexe de coloration jaunâtre.

- **Procédure**

Un volume de la solution d'extrait a été additionné à du réactif de chlorure d'aluminium et mélangé afin de bien homogénéiser. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 430 nm, contre un blanc contenant uniquement de l'extrait et de l'eau distillée. Les concentrations en flavonoïdes ont été exprimées en milligrammes d'équivalent de quercétine (annexe B) par gramme d'extrait sec.

II. 2. 4. 3 Dosage des tannins

Les tannins contenus dans les extraits ont été estimés en procédant par la méthode de Hagerman et Butler (1978), qui est basée sur la précipitation du complexe BSA-tannin formé. Les tannins précipités sont dosés par mesure de l'absorbance à 510 nm après formation du complexe ion ferrique -tannin de coloration violette.

- **Procédure**

Un volume d'une solution de BSA et de solution d'extrait ont été mélangés et incubés pendant 24 heures à 4°C. Le mélange a été ensuite centrifugé à 3000g pendant 15 min et le culot a été récupéré et dissout dans 4ml de la solution de SDS et de triethanolamine (TEA). Afin de révéler la présence des tanins, 1ml du réactif FeCl₃ a été ajouté et le mélange est porté au vortex. Après 15 min d'incubation l'absorbance a été mesuré à 510nm contre un blanc contenant du réactif FeCl₃ et de la solution de SDS/TEA. La teneur en tannins des extraits a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide tannique (annexe B).

II. 2. 5 Mesure du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits des deux plantes a été déterminé selon la méthode de Oyaizu et al. (1986). Elle consiste à mesurer la capacité des extraits à réduire le complexe Fe^{3+} / ferricyanure de potassium en forme ferreuse. Cette réduction s'accompagne d'un virage de la couleur jaune vers du bleu vert dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait.

- **Procédure**

1ml de la solution d'extrait a été mélangé avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5ml de ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] et le tout a été incubé à 50 °C pendant 20 mn. Après l'ajout de 2,5 ml d'acide trichloracétique le mélange a été centrifugé à 3000g pendant 10 mn. 2,5 ml du surnageant ont été récupérés et additionnés de 2,5ml d'eau distillée et de 0,5 ml de chlorure ferrique. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une augmentation du pouvoir réducteur.

II. 2. 6 Activité scavenger du radical hydroxyle

La méthode utilisée est celle de Smirnoff et Cumbes *in* (Gu et al., 2008) qui consiste en la production du radical OH à partir de H_2O_2 en présence de Fe^{2+} par la réaction de Fenton. L'ajout de salicylate à la solution permet la formation d'un complexe coloré salicylate-Fe qui absorbe à 532 nm, alors que l'hydroxylation de salicylate (figure N° 25) permet la décoloration de la solution. L'extrait ayant l'effet scavenger du radical hydroxyle le plus important montre une faible décoloration et par conséquent une absorbance importante à 532 nm.

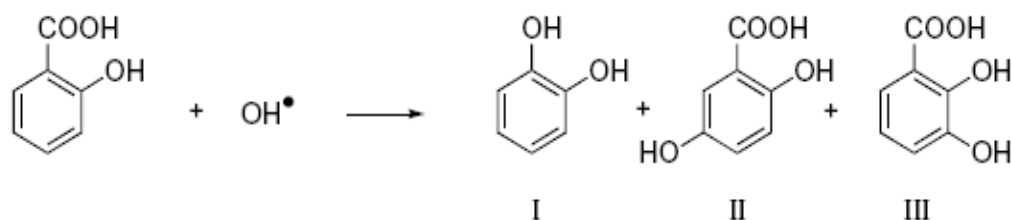


Figure N° 25 : L'hydroxylation de l'acide salicylique par oxidation radicalaire [catéchol (I), acide 2,5-dihydroxybenzoïque (II) et acide 2,3-dihydroxybenzoïque (III)]. (Freinbichler et al., 2008).

- **Procédure :**

Dans des tubes de centrifugation, un volume de 1ml de la solution d'extrait a été additionné de 0,3ml (8mM) de FeSO₄, 0,25ml (20mM) de H₂O₂ et 1ml de l'acide salicylique respectivement, puis incubé à 37°C pendant 30min. Ensuite le volume a été ajusté à 3ml avec de l'eau distillée et le mélange a été centrifugé à 2000 rpm pendant 10 min. La mesure de l'absorbance (A₁) du surnageant a été effectuée à 510nm. Le taux d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = [(A_1 - A_0) - A_2 / (A_3 - A_2)] 100$$

Tel que

A₀ : L'absorbance du blanc de l'extrait préparé de la même façon que précédemment sans salicylate.

A₁ : L'absorbance de l'extrait

A₂ : L'absorbance du blanc préparé de la même façon que précédemment sans extrait.

A₃ : L'absorbance du blanc du blanc préparé de la même façon que précédemment sans H₂O₂ ni extrait.

II. 2. 7 Inhibition de la peroxydation lipidique

Afin de déterminer l'état d'oxydation des lipides, une grande variété de méthodes est disponible dont la plus utilisée est celle du malondialdéhyde, un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Lefèvre et *al.*, 1998). Ce test repose sur la formation d'un complexe coloré rose résultant de la réaction entre une molécule de malonaldéhyde et deux molécules d'acide 2-thiobarbiturique. Le complexe coloré formé absorbe à 532-535 nm.

De nombreuses adaptations de cette méthode ont été développées dont celle proposée par Ruberto et *al.* (2000) *in* (Pandey et *al.*, 2007) . Cette méthode utilise le jaune d'œuf comme une source riche en lipide (la lécithine) et présente l'avantage d'extraire le complexe MDA-(TBA)₂ par le n-butanol, ce qui permet d'éliminer en partie les interférents dans la réaction des TBARS (thiobarbituric acid-reactive species) (Jardine et *al.*, 2002).

- **Procédure**

0,5 ml de l'homogénat d'œuf et 0,1 ml d'extrait ont été introduits dans le tube de centrifugation et le volume a été ajusté à 1 ml par de l'eau distillée. Afin d'induire la

peroxydation lipidique, 0,05 ml FeSO₄ (0,07 M) ont été ajoutés et le tout a été incubé pendant 30 min à 37°C. Le mélange réactionnel a été ensuite additionné de 1,5 ml d'acide acétique (20%, pH = 3,5), 1,5 ml de TBA (0,8% p / v dans 1,1% sodium dodécyl sulfate) et 0,05 ml de TCA (20%), puis vortexé et porté à l'eau bouillante pendant 60 min.

Après refroidissement, 5 ml de butanol-1 ont été ajoutés à chaque tube et centrifugés à 3000 tr/ min pour 10 min. L'absorbance (A₁) de la couche supérieure organique a été mesurée à 532 nm. Le taux d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = [A_0 - (A_1 - A_2) / A_0] 100$$

Tel que

A₀ : L'absorbance du blanc qui a été préparé de la même façon que précédemment sans extrait.

A₁ : L'absorbance de l'extrait

A₂ : L'absorbance du blanc de l'extrait qui a été préparé de la même façon que précédemment sans TBA.

II. 2. 8 Purification de la XOR

La purification de la XOR à partir du lait bovin a été réalisée selon la méthode décrite par Sanders et ses collaborateurs en 1997 avec quelques modifications. C'est une méthode de fractionnement par centrifugation en présence du sulfate d'ammonium suivi d'une chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine. Afin de préserver l'activité de l'enzyme, toutes les manipulations ont été effectuées à 4°C.

- **Procédure**

Le lait frais a été additionné de 1mM d'EDTA et de 1,25 mM de salicylate de sodium puis centrifugé à 3000 g pendant 30 min. La crème récupérée a été suspendue dans un tampon phosphate de 0,2 M contenant 1 mM d'EDTA et 5 mM de dethiothreitol (DTT), et laissé agiter pendant 60 min. La suspension ainsi obtenue a été centrifugée à 6000 g pendant 30 min, et la phase aqueuse a été récupérée et filtrée à travers la laine de verre. 15 % (v/v) de butanol glacial et 15 % (p/v) de sulfate d'ammonium ont été ajoutés progressivement au filtrat obtenu avec agitation pendant 60 min et le tout a été centrifugé à 10000 g pendant 20 min. La couche supérieure de butanol a été enlevée et la phase aqueuse a été filtrée à travers la laine de verre. Le

filtrat récupéré a été additionné de 20% de sulfate d'ammonium puis maintenue sous agitation pendant 60 min. Après centrifugation à 11000 g pendant 60 min une couche brunâtre a été récupérée et suspendue dans un petit volume de tampon phosphate (50 mM, pH 6,3), et dialysée contre le même tampon pendant une nuit. La solution récupérée a été soumise à une dernière centrifugation à 20000 g pendant 60 min, le surnageant récupéré a été filtré à travers une membrane de 0,22 µm puis injecté dans une colonne d'héparine préalablement équilibré avec un tampon phosphate contenant 0,1M NaCl. Après un dernier lavage de la colonne avec un tampon phosphate contenant 0,08 M NaCl, l'enzyme a été élué avec un tampon phosphate contenant 0,25 M NaCl et dialysée pendant une nuit contre un tampon phosphate (50 mM, pH 7,3). Afin de confirmer la présence de l'enzyme active dans la solution brut ainsi obtenue, un balayage par un spectrophotomètre UV-VIS et un test d'activité ont été réalisés.

II. 2. 9 Activité anti- xanthine oxydase des extraits de *Ulmus campestris*

L'activité anti- xanthine oxydase a été déterminée en suivant la production de l'acide urique par mesure de l'absorbance à 295 nm toutes les 5 secondes sur un intervalle de temps de trois minutes.

• Procédure

1760 µl du tampon bicine (50mM, pH 8,3) ont été additionnés de 200µl de la solution de xanthine (1mM préparée dans le tampon bicine), 20 µl de la solution d'extrait (10 mM préparée dans le DMSO) et 20 µl de la solution de xanthine oxydase. L'absorbance du mélange réactionnel a été mesuré à 295 nm avant et après l'ajout de la xanthine oxydase. Un test d'activité a été réalisé de la même façon en remplaçant la solution d'extrait par le DMSO.

L'activité de la xanthine oxydoréductase a été déterminée à partir de la moyenne des pentes des spectres obtenus et l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase exprimée en pourcentage est calculée comme suit :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = [1 - (A_1 / A_0)] 100$$

Tel que :

A₁ : l'activité de l'enzyme en présence de l'extrait.

A₀ : l'activité de l'enzyme en absence de l'extrait.

II. 2. 10 Détermination des IC₅₀

Les extraits ayant montré l'activité la plus élevée ont été testés à différentes concentrations afin de déterminer les concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀).

II. 2. 11 Etude chromatographique:

Afin de caractériser les composés phénoliques responsables des activités biologiques testées, des fractionnements par chromatographie sur couche mince et par chromatographie sur colonne de silice ont été effectués.

II. 2. 11. 1 Chromatographie sur couche mince :

Les différents extraits de *Fraxinus angustifolia* et de *Ulmus campestris* ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice (Silica Woelm GF-DC). Le système d'éluant utilisé est un mélange d'acétone, toluène et de l'acide formique à un rapport de (60, 60, 10) dans le cas de *Ulmus campestris* et un mélange d'éthyle acétate, acide formique, acide acétique et d'eau à un rapport de (100,11,11,26) dans le cas de *Fraxinus angustifolia*. Une révélation à la vanilline sulfurique a été réalisée selon la méthode de Stahl (1969) in Eloff et al. (2005). Des photographies des chromatogrammes avant la révélation à la lumière du jour et sous une lampe à Ultra-violet et après la révélation ont été prises.

Le rapport frontal de chaque spot a été déterminé :

$$\text{Le rapport frontal (RF)} = D_1 / D_0$$

Tel que :

A₁ : Distance parcourue par le constituant

D₀ : Distance parcourue par le front de l'éluant.

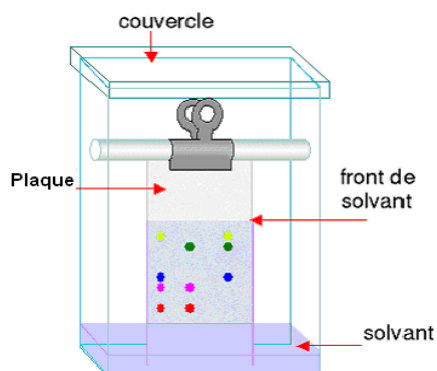


Figure N° 26 : schéma du développement chromatographique d'une plaque

II. 2. 11. 2 Chromatographie sur colonne de gel de silice :

Une chromatographie sur colonne de gel de silice a été réalisée sur l'extrait éthanolique de l'écorce *Ulmus campestris*. Le gel de silice a été activé dans du chloroforme et l'élution a été réalisée par des solvants de polarité croissante. Les fractions chromatographiques obtenues ont été testées et leur activités anti-xanthine oxydase et anti-radicalaire ont été déterminées.

II. 2. 12 Etude spectrale

L'extrait éthanolique fractionné par chromatographie sur colonne ainsi que les fractions chromatographiques obtenues ont été soumis à un balayage spectral allant de 200 à 1000 nm afin de comparer les allures des spectres et de réunir les fractions qui présentent le même profil.

II. 2. 13 Etude statistique

Les résultats obtenus dans cette étude ont été analysés en utilisant le test LSD avec $p=0,05$ par le logiciel Statistica, version 5.0 afin d'obtenir une meilleure interprétation des résultats.

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

III. 1 Extraction

L'extraction des composés phénoliques est influencée par : la granulométrie de la poudre, la vitesse d'homogénéisation, la nature et le volume de solvant, le pH, la température, le nombre et la durée de l'extraction (Escribano-Bailono et Santos-Buegla, 2003). Tous ces paramètres doivent être maîtrisés avec précision pour un produit final de qualité optimale. Dans cet objectif le séchage, le broyage et le tamisage ont été réalisés et le protocole d'extraction de Chiang et *al.*, (1994) a été choisi. Ce protocole consiste à extraire le maximum de composés phénoliques par macération dans l'éthanol puis de les séparer par une extraction liquide-liquide en fonction de leurs polarités, afin de réaliser un fractionnement préliminaire de l'extrait éthanolique. Ainsi, les composés polaires seront concentrés dans les phases aqueuses et les composés apolaires dans les phases organiques (acétate d'éthyle, chloroforme et hexane).

Les taux d'extraction ont été calculés par rapport à la matière sèche (poudre ou extrait sec) soumise à l'extraction. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Taux d'extractions obtenus à partir des écorces de *Ulmus campestris* et de *Fraxinus angustifolia*.

| Solvants | <i>Ulmus campestris</i> | <i>Fraxinus angustifolia</i> |
|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| Ethanol | 6.81 % | 6.76 % |
| Ethyle acétate / Eau | 13.08 % / 68.56 % | 21.63 % / 76.82% |
| Chloroforme / Eau | 38.76% / 42.64% | 70 % / 23.64% |
| Hexane / Eau | 27.42% / 65.32% | 28.44 % / 9.17% |

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que le taux d'extraction de la première phase, obtenu avec *Ulmus campestris* est similaire à celui obtenu avec *Fraxinus angustifolia* ; les deux plantes présentent un taux appréciable, et ce malgré que l'extraction par macération est une méthode discontinue, le solvant n'étant pas continuellement renouvelé, la matière végétale n'est jamais complètement épuisée.

Dans l'extraction acétate d'éthyle / eau, le taux d'extraction de la phase aqueuse est beaucoup plus élevé que celui de la phase organique et cela pour les deux plantes.

Ceci s'explique par le fait que les polyphénols sont généralement des composés polaires de part leur richesse en groupements hydroxyles.

Les extractions chloroforme/eau et hexane/eau ont donné des phases aqueuses plus concentrées que les phases organiques dans le cas de *U. campestris*, alors que dans le cas de *F. angustifolia*, les phases organiques sont nettement plus concentrées que les phases aqueuses correspondantes. Cette différence dans les taux d'extraction pourrait traduire une différence dans la nature des composés phénoliques extraits des deux plantes. *F. angustifolia* semblerait être plus riche en composés apolaires, comparé à *U. campestris*.

III. 2 Dosages

III. 2. 1 Les phénols totaux

Le taux de phénols totaux dans les extraits des deux plantes est calculé à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec la catéchine, et récapitulé dans la figure suivante :

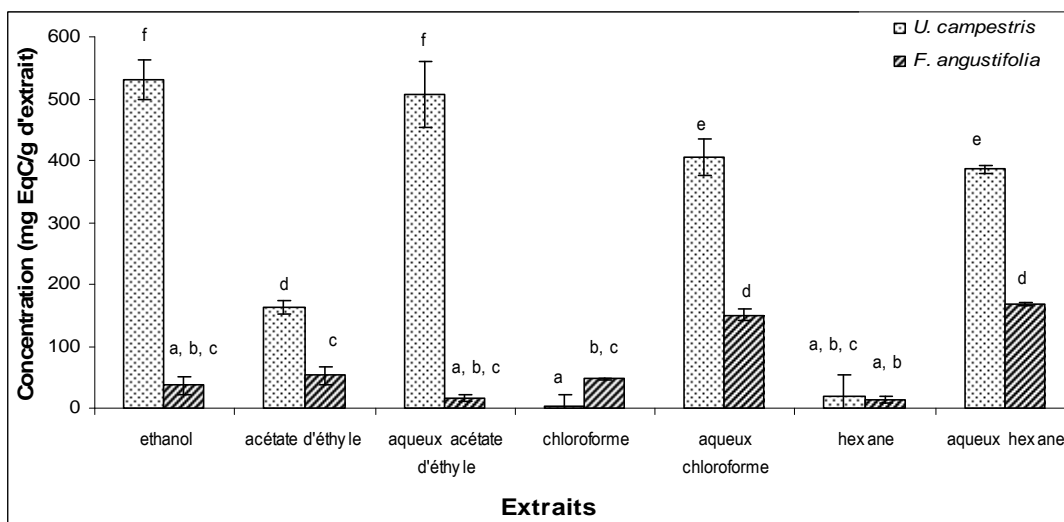


Figure N° 25 : Représentation graphique des taux en phénols totaux des extraits des écorces de *U. campestris* et de *F. angustifolia*.

On constate que les meilleures teneurs en phénols totaux sont retrouvées dans les extraits éthanolique ($530 \pm 31,49$ mg Eq C/g d'extrait) et aqueux d'acétate d'éthyle ($507,54 \pm 53,00$ mg Eq C/g d'extrait) de *Ulmus campestris*, alors que les teneurs les plus faibles sont observées pour les extraits organiques. Cela indique que les phénols contenus dans cette plante seraient essentiellement polaires. Les extraits de *Fraxinus angustifolia* quant à eux ont montré une teneur en phénols totaux relativement faible dont les meilleurs taux ont été observés pour les extraits aqueux d'hexane

(167,95±1,49 mg Eq C/g d'extrait) et aqueux du chloroforme (150,14 ± 9,82 mg Eq C/g d'extrait). La richesse des extraits polaires en composés phénoliques est une chose prédictible vu la propriété de ces derniers d'être solubles dans l'eau et les solvants polaires et peu solubles dans les solvants apolaires (Macheix et al 2005).

Le taux en phénols totaux des extraits de *Ulmus campestris* est significativement ($p < 0,05$) plus important que celui retrouvé avec les extraits de *Fraxinus angustifolia* à l'exception des extraits du chloroforme et d'hexane. Un faible taux en composés phénoliques de *Fraxinus angustifolia* (34.36 ± 0.63 mg /g) a été également rapporté par Villar et ses collaborateurs (2006).

III. 2. 2 Les flavonoïdes

Le taux en flavonoïdes dans les différents extraits exprimé en milligrammes d'équivalent de rutine par gramme d'extrait (mg Eq R/g d'extrait) est représenté dans l'histogramme suivant :

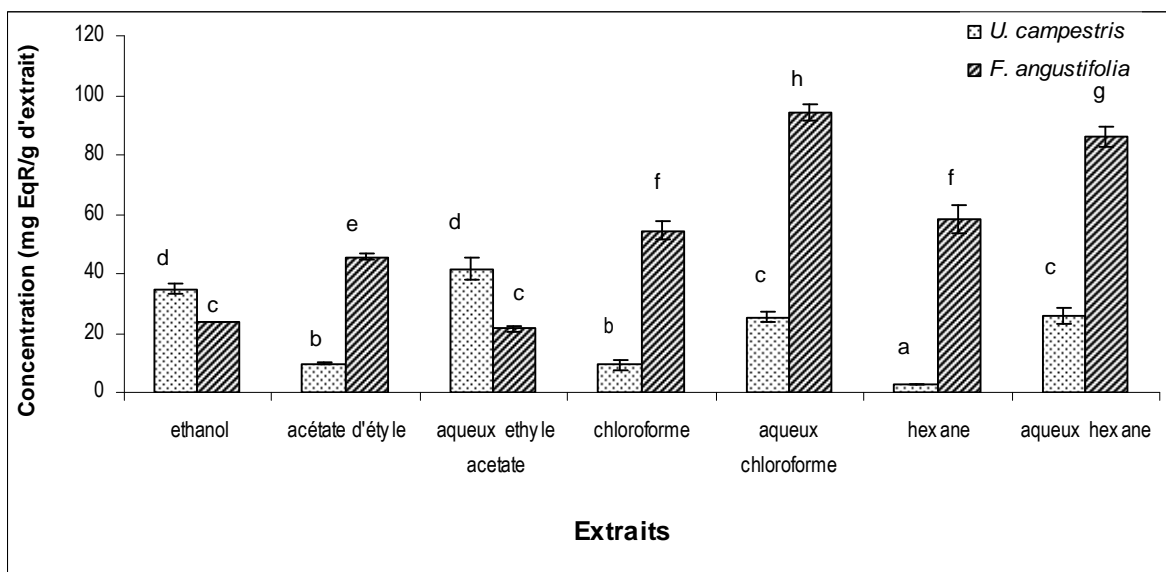


Figure N° 26 : Représentation graphique des taux en flavonoïdes des extraits des écorces de *U. campestris* et de *F. angustifolia*.

D'après la figure ci-dessus, on constate que les phases aqueuses de *Ulmus campestris* sont plus riches en flavonoïdes que les phases organiques correspondantes avec un taux maximal pour l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle (41,61±1,71mg Eq R/g d'extrait) suivi de l'extrait éthanolique (34,69±3,48 mg Eq R/g d'extrait). Ce qui confirme la richesse de cette plante en composés polaires. En ce qui concerne les extraits de *F. angustifolia*, le taux le plus élevé a été obtenu avec l'extrait aqueux du chloroforme

(94,07±1,57 mg Eq R/g d'extrait) suivi de l'aqueux d'hexane (86,24±2,86 mg Eq R/g d'extrait), les phases organiques ont montré également des teneurs en flavonoides élevées et largement supérieures à celles obtenues avec l'extrait éthanolique ; ceci s'explique par la sélectivité de la méthode qui a permis de concentrer les flavonoides dans les dernières phases de l'extraction.

III. 2. 3 Les tannins

La teneur en tannins des différents extraits des deux plantes étudiées exprimée en milligrammes d'équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait (mg Eq AT/g d'extrait) est représentée dans l'histogramme suivant :

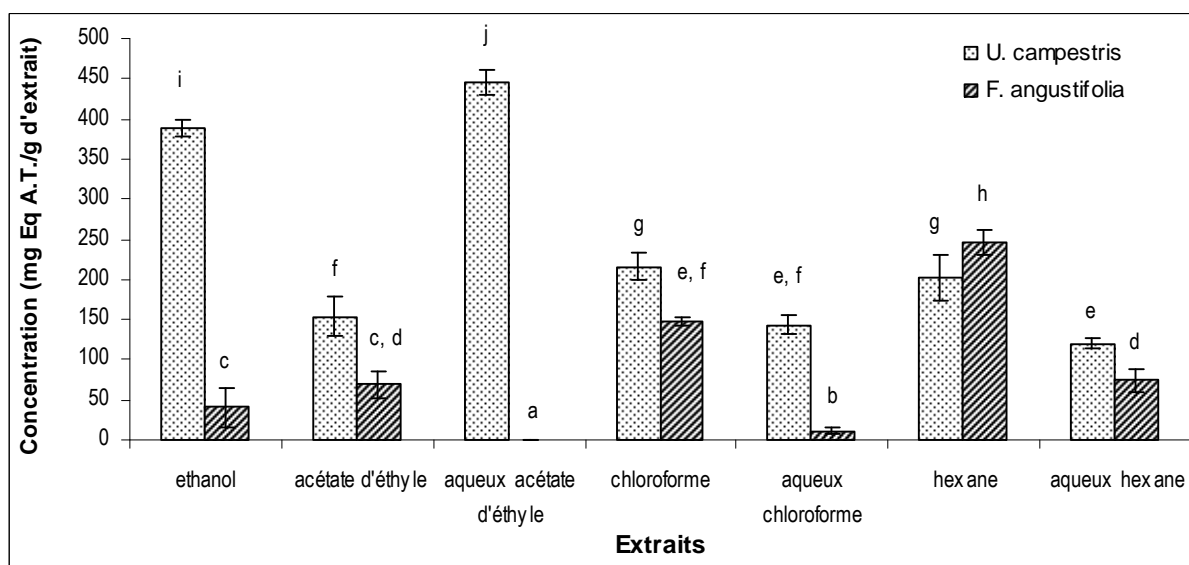


Figure N° 27 : Représentation graphique des taux en tannins des extraits des écorces de *U. campestris* et de *F. angustifolia*.

On remarque que tous les extraits de *Ulmus campestris* ont exhibé des teneurs en tannins appréciables, elles varient de $445,89 \pm 15,33$ à $119,77 \pm 6,90$ mg Eq AT/g d'extrait. La teneur la plus élevée est obtenue avec l'extrait aqueux de l'acétate d'éthyle suivi de l'extrait éthanolique. Pour l'écorce de *Fraxinus angustifolia* les tanins sont plus concentrés dans les phases organiques que dans les phases aqueuses, voir même nulle dans l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle.

En comparant les teneurs en tannins des extraits bruts éthanoliques de *Ulmus campestris* ($389,11 \pm 10,05$ mg Eq AT/g d'extrait) et de *Fraxinus angustifolia* ($40,64 \pm 24,39$ mg Eq AT/g d'extrait) ; on constate que l'écorce de la première est la plus riche en cette classe de composés phénoliques.

En conclusion, les résultats des dosages montrent que *Ulmus campestris* est plus riche en phénols totaux, en flavonoides et en tannins que *Fraxinus angustifolia*. L'analyse des résultats révèle aussi que les polyphénols de *U. campestris* sont essentiellement des tannins, alors que ceux de *F. angustifolia* sont variés. Ceci reflète une différence significative dans la composition en polyphénols des écorces des deux plantes, malgré qu'elles appartiennent à la même classe de Dicotylédones et qu'elles sont récoltées dans le même endroit et à la même période indiquant ainsi que la composition en polyphénols est caractéristique de l'espèce.

En outre, les teneurs en phénols totaux et en tannins obtenues avec les extraits de *Fraxinus angustifolia* sont globalement inférieures à celles retrouvées par Atmani et ses collaborateurs (2009) avec la même plante récoltée également dans la même région en juillet 2005 (tableau IX). Cette différence est probablement due à la période de la récolte et aux variations climatiques dans la région durant ces dernières années (une pluviosité élevée a marqué l'année de la récolte). En effet des contraintes abiotiques (sécheresse, salinité, température élevée et ensoleillement) sont capables de stimuler la biosynthèse des substances de stress, notamment les polyphénols et l'absence de ces contraintes peut être à l'origine de la diminution de taux en polyphénols observé dans cette présente étude. Plusieurs travaux (Ksouri et al., 2008 ; Chen et al., 2009) ont montré l'implication de divers stress tels que les stress thermique et hydriques ainsi que l'ensoleillement (Toor et al., 2006) dans la synthèse des polyphénols.

Tableau IX : Taux de phénols totaux, de flavonoides et de tannins dans les extraits de l'écorce de *Fraxinus angustifolia* récolté en 2005 (Atmani et al., 2009).

| Extraits | phénols totaux (mg Eq Catéchine/g extrait) | Flavanoïdes (mg Eq Quercétine/g extrait) | Tannins (mg Eq Acide Tannique /g extrait) |
|------------------------------|--|--|---|
| Ethanolique | 142.37 ± 7.48 | 6.6 ± 0.08 | 157.93 ± 34.48 |
| Organique d'acétate d'éthyle | 113.78 ± 8.27 | 6.2 ± 0.28 | 112.63 ± 9.54 |
| Aqueux d'acétate d'éthyle | 215.7 ± 14.16 | 4.93 ± 0.67 | 177.22 ± 16.91 |

III. 3 pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité antioxydants de l'extrait testé, elle est basée sur la réduction du fer (III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fer (II) (Chu et al.,2000). Les résultats obtenus sont récapitulés dans la figure N° 28 :

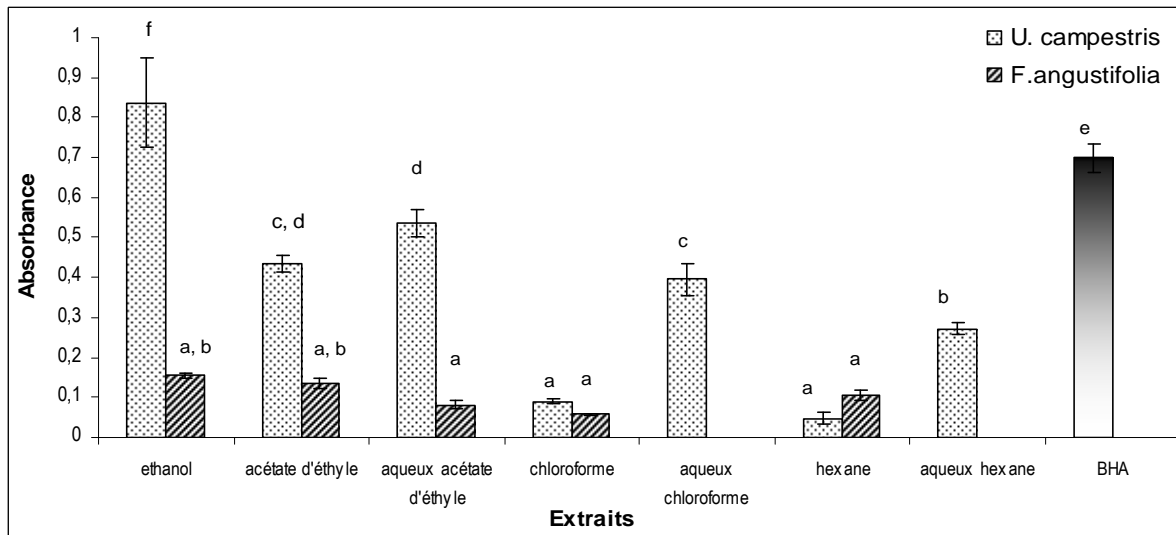


Figure N ° 28 : Représentation graphique du pouvoir réducteur des extraits des écorces de *U. campestris* et de *F. angustifolia* et de standard utilisé à 100µg / ml.

D'après la figure N°28 on remarque une différence significative ($p < 0,05$) entre le pouvoir réducteur des différents extraits de *Ulmus campestris*, la capacité la plus élevée a été obtenue avec l'extrait éthanolique $0,84 \pm 0,11$ UA. Les extraits de *Fraxinus angustifolia* quant à eux ne présentent pas de différence significative ($p < 0,05$). On constate aussi que les extraits de *U. campestris*, notamment les extraits polaires ont exhibé une capacité réductrice beaucoup plus élevée que celle retrouvée avec les extraits de *F. angustifolia*. Ceci peut être expliqué par la richesse de *U. campestris* en phénols totaux qui contribuent fortement dans le pouvoir réducteur, vu leur capacité à transférer des électrons et des protons.

L'extrait éthanolique de *U. campestris* a exhibé une capacité réductrice ($0,84 \pm 0,11$ UA) supérieure à celle obtenue avec la BHA ($0,70 \pm 0,036$ UA), un standard de référence ayant un très bon pouvoir réducteur, ceci a été confirmé par Gulcin et ses collaborateurs (2004). Cela signifie que *U. campestris* possède une capacité réductrice très élevée. En effet, cette capacité élevée a été déjà rapportée par Jung et ses

collaborateurs (2008) sur différents extraits de l'écorce de *U. davidiana* dont l'extrait acétate d'éthyle qui a exhibé un pouvoir réducteur de 0.26 UA à 100 µg/ml.

III. 4 Activité scavenger du radical hydroxyle

III. 4. 1 Activité scavenger du radical hydroxyle des différents extraits à 100 µg/ml

L'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical hydroxyle est représentée dans la figure N° 29. Un standard a été également testé.

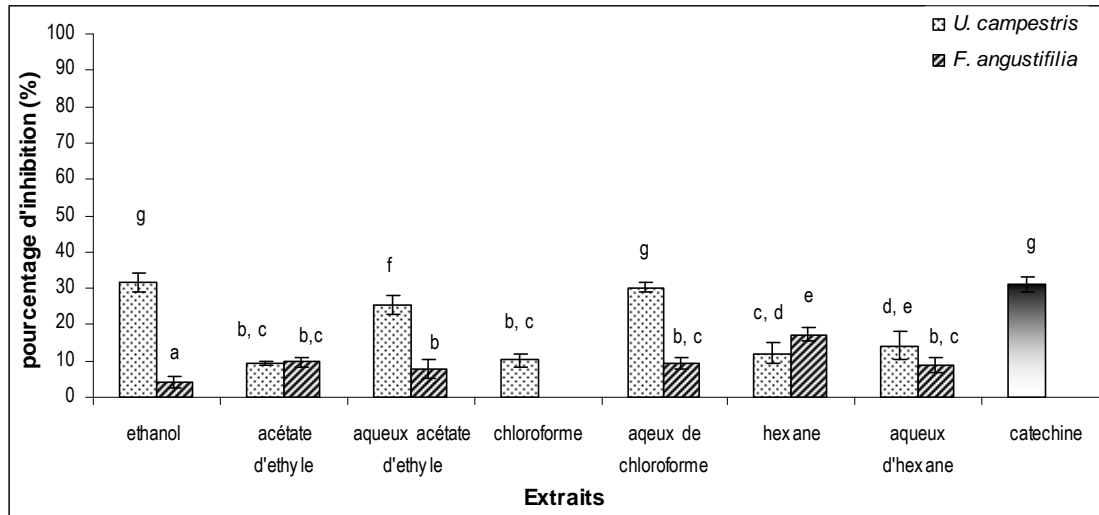


Figure N° 29 : Représentation graphique du pourcentage d'activité scavenger du radical hydroxyle par les extraits des écorces de *U. campestris* et de *F. angustifolia* et de standard utilisé à 100µg / ml.

On remarque que les extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle de *Ulmus campestris* ont exhibé les activités anti-radicalaires les plus élevées, elles sont de $31,65 \pm 2,44$ % et $30,12 \pm 1,35$ %, respectivement. Ces valeurs sont de même ordre de grandeur que celle obtenue avec la catéchine ($31,20 \pm 2,01$ %). L'étude statistique a montré qu'il n'y a pas une différence significative ($p < 0,05$) entre les trois activités. Cette constatation concorde avec les résultats retrouvés par Jung et ses collaborateurs (2008) où l'activité scavenger du radical hydroxyle de l'extrait aqueux ($53,65 \pm 0,01$ %) d'une plante appartenant au même genre, *Ulmus davidiana*, est proche de celle de la catéchine ($56,94 \pm 0,01$ %).

Les phases organiques ont exhibé une faible activité scavenger du radical hydroxyle comparées aux phases aqueuses et à l'extrait éthanolique, suggérant ainsi que l'activité des extraits serait due à la présence de composés phénoliques riches en groupements hydroxyles et qui agissent en synergie avec d'autres composés. Des résultats similaires ont été obtenus par Tiwari et Tripathi (2007) qui ont testé l'effet scavenger du radical

hydroxyle d'un arbre, *Vitex negundo* Linn., utilisé en médecine traditionnelle indienne. Ils ont montré que les activités des extraits éthanolique brut et aqueux sont supérieures à celles des extraits apolaires. L'ordre de l'activité scavenger obtenu est le suivant : Extrait éthanolique total > extrait méthanolique > extrait aqueux > extrait acétate d'éthyle > extrait d'hexane (Tiwari et Tripathi, 2007).

Tous les autres extraits y compris les extraits de *Fraxinus angustifolia*, n'ont pas exhibé une forte activité anti-radicalaire à 100 µg/ml. Il faudra des concentrations plus importantes afin d'observer un effet scavenger considérable. L'activité la plus importante chez *F. angustifolia* a été observée avec l'extrait d'hexane, elle est probablement due à la richesse de cet extrait en tannins qui sont de bons chélateurs des ions métalliques et qui ont un haut potentiel donneur d'hydrogène. L'effet scavenger du radical hydroxyle d'un composé phénolique dépend essentiellement de ces deux propriétés.

III. 4. 2 Détermination des concentrations inhibitrices 50 %

L'activité scavenger du radical hydroxyle des extraits éthanolique et aqueux du chloroforme de l'écorce de *U. campestris* à différentes concentrations est illustrée dans la figure N° 30.

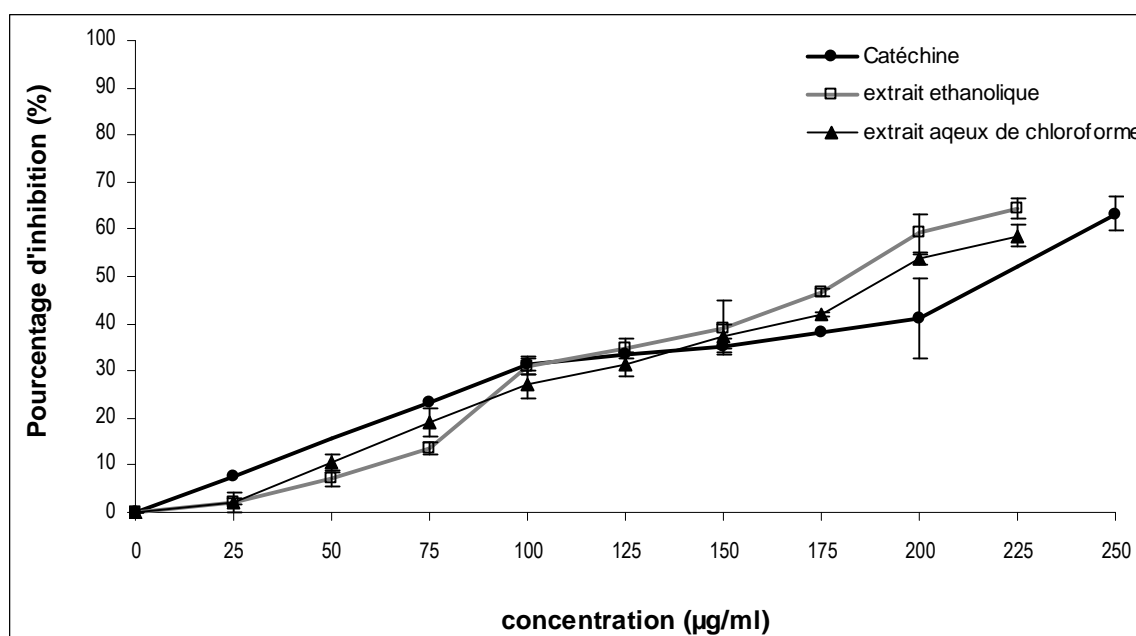


Figure N° 30 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de la formation du radical hydroxyle en fonction de la concentration en catéchine, en extraits éthanolique et aqueux de chloroforme de l'écorce de *U. campestris*.

Comme le montre la figure N° 30, l'activité scavenger du radical hydroxyle est proportionnelle aux concentrations des extraits et du standard utilisé. La concentration la plus faible pour laquelle un effet antioxydant est observé est 10µg/ml, en utilisant la droite de régression pour chaque extrait (Annexe C) on obtient les concentrations inhibitrices 50%. Les IC₅₀ des extraits éthanolique, aqueux du chloroforme et de la catéchine sont de 152,56 µg/ml, 167,78 µg/ml et 204,43 µg/ml, respectivement. Les IC₅₀ des extraits de *U. campestris* sont légèrement inférieures à celle de la catéchine ce qui signifie que les extraits de *U. campestris* ont une meilleure activité.

L'IC₅₀ de l'extrait d'hexane de *F. angustifolia* n'a pas pu être déterminée car à concentrations supérieures à 100µg/ml l'extrait devient insoluble dans le tween 80 à 0,1%.

III. 5 Inhibition de la peroxydation lipidique

III. 5. 1 Inhibition de la peroxydation lipidique par les différents extraits à 100µg/ml

Les résultats de l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique des extraits des deux plantes, exprimés en pourcentage (%), sont récapitulés dans l'histogramme suivant :

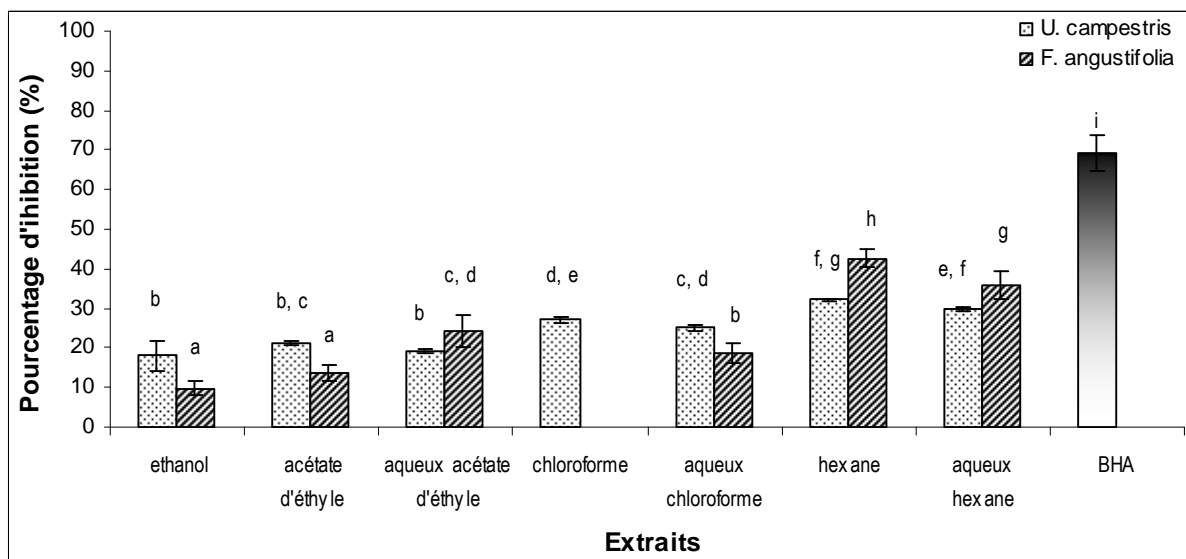


Figure N° 31 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique par les extraits des écorces de *U. campestris* et de *F. angustifolia* et du standard utilisé à 100µg / ml.

D'après la figure N° 31, on remarque que pour les deux plantes, le maximum d'inhibition est obtenu avec l'extrait d'hexane suivi par l'aqueux d'hexane, alors que l'activité la plus faible est obtenue avec l'extrait éthanolique. Puisque les extraits d'acétate d'éthyle, au chloroforme et à l'Hexane sont des fractions de l'extrait éthanolique, ceci laisse supposer que soit l'extrait éthanolique renferme des substances antagonistes qui s'inhibent les unes les autres et qui ne laissent exprimer l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique qu'une fois fractionnées. Ou bien, l'extraction a permis de concentrer les substances actives dans les dernières phases et d'éliminer les non actives sous forme d'interphase. Le clivage des polymères peu ou pas actifs en composés plus actifs par le solvant de l'extraction est aussi probable.

On note également que tous les extraits ont exhibé une activité plus faible que celle obtenue avec la BHA, le standard de référence. Ce dernier a montré un bon effet protecteur vis-à-vis de la peroxydation lipidique (69, 39±4,54 %).

L'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique, mais vis-à-vis de l'acide linoléique a été déjà mise en évidence dans les extraits de *Fraxinus angustifolia* par Atmani et ses collaborateurs (2009).

Selon Heim et ses collaborateurs (2000), cette protection contre l'oxydation des lipides peut être attribuée à :

- (1) l'effet scavenger des radicaux libres formés dans le milieu réactionnel.
- (2) la terminaison de la chaîne de réactions de la peroxydation lipidique, impliquant les radicaux peroxy et hydroperoxydes.
- (3) la chélation des cations bivalents utilisés pour initier des événements oxydatifs *in vitro*.
- (4) les interactions avec d'autres initiateurs qui sont capables de réduire et de recycler le radical flavonoïdes, ou vice-versa.

III. 5. 2 Détermination des IC₅₀ de la BHA et de l'extrait d'hexane de *U. campestris*

Les profils de l'évolution de l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique en fonction de la concentration en BHA et en extrait d'hexane de l'écorce de *U. campestris* sont représentés dans la figure N° 32.

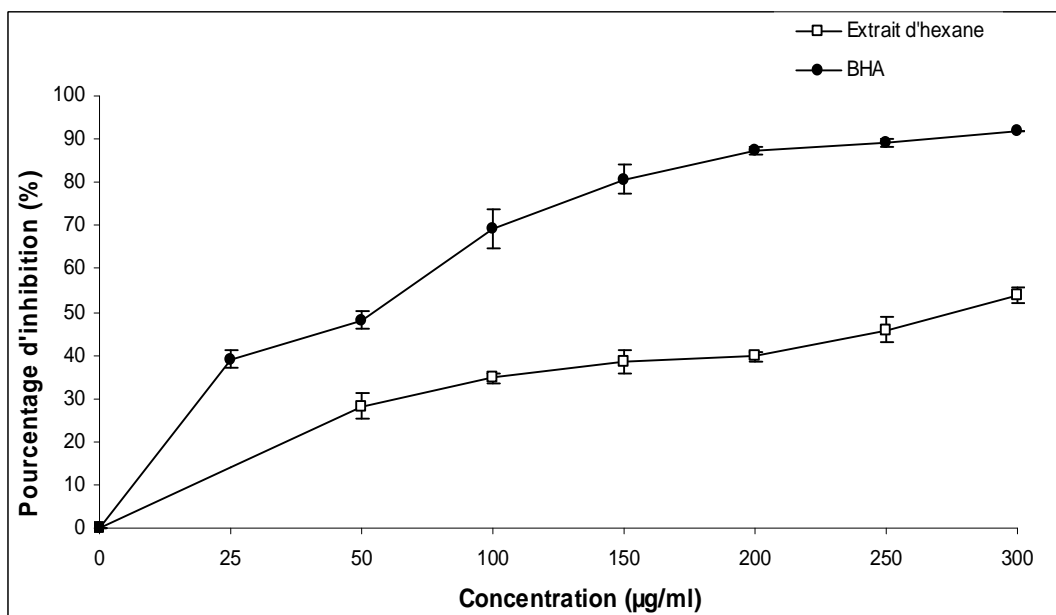


Figure N° 32 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique en fonction de la concentration de l'extrait d'hexane de l'écorce de *U. campestris* et de la BHA.

Dans la gamme de concentration étudiée, on note une augmentation du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique en fonction de la concentration en extrait. En utilisant les courbes de régression (Annexe C), les IC_{50} de la BHA et de l'extrait d'hexane ont été estimées à 44,47 µg/ml et 281,39 µg/ml, respectivement. Ces résultats montrent que la BHA possède une forte activité inhibitrice de la peroxydation lipidique, en effet à 300 µg/ml l'activité antioxydants de la BHA atteint $91 \pm 0,06$ %. Cette forte activité a été démontrée par Miguel et ses collaborateurs ; à 62,5 µg/ml la BHA a exhibé un pourcentage d'inhibition de $60,3 \pm 3,8$ % (Miguel et *al.*, 2004).

En comparant nos résultats avec ceux retrouvés dans la littérature, on conclut que les extraits de nos plantes ont exhibé une bonne activité inhibitrice de la peroxydation lipidique. Une étude, utilisant le même protocole, réalisée par Dasgupta et De (2007) sur 12 espèces de plantes a révélé des IC_{50} beaucoup plus élevées allant de 345 µg/ml à 3970 µg/ml, d'où une activité inhibitrice plus faible.

III. 6 Activité anti-xanthine oxydase

III. 6. 1 Activité anti-xanthine oxydase des différents extraits à 100 µg/ml

L'activité anti-xanthine oxydase des extraits de *Ulmus campestris* est représentée dans la figure ci-dessous. L'allopurinol a été utilisé comme standard de référence :

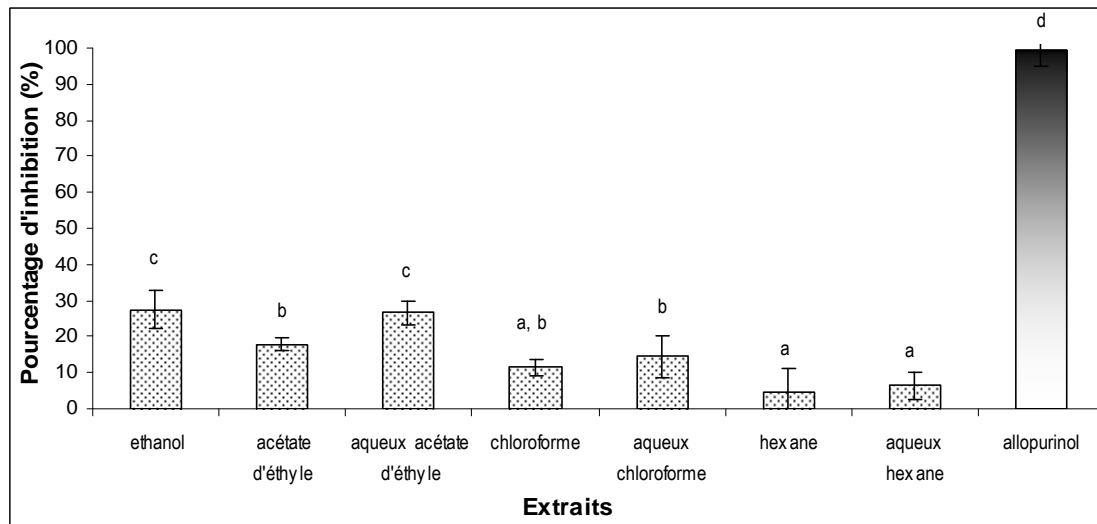


Figure N° 33 : Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la XOR par l'allopurinol et les extraits de l'écorce de *U. campestris* à 100µg / ml

La figure N° 33 montre que les extraits éthanolique et aqueux d'acétate d'éthyle ont exhibé une activité inhibitrice significative qui correspond à $27,35 \pm 5,29 \%$ et $26,56 \pm 3,10 \%$, respectivement. Les autres extraits ont montré une activité plus faible. Les extraits aqueux ont exhibé des activités inhibitrices plus élevées que celles des phases organiques correspondantes. Cela laisse supposer que les composés à l'origine de cette inhibition sont de nature polaire. L'activité inhibitrice de ces composés peut être due aux groupements hydroxyles qui sont primordiales pour l'activité et qui confèrent aux polyphénols le caractère polaire.

En fonction des résultats obtenus, nous pouvons conclure que les extraits de *Ulmus campestris* possèdent une faible activité anti-xanthine oxydase, comparés à l'allopurinol qui un très puissant inhibiteur de cette enzyme, mais cette activité reste appréciable. En outre l'allopurinol est une substance pure alors que nos extraits sont des mélanges de plusieurs substances d'où une plus faible concentration en substances actives.

L'activité anti-xanthine oxydase a été mise en évidence dans plusieurs espèces de plante médicinales appartenant à diverses familles, elle a été détectée chez *Trachelospermum jasminoides* de la famille des Apocynaceae, *Smilax globra* de la famille des Liliaceae, *Fraxinus rhynchophylla* de la famille des oleacea (kong et *al.*, 2000), *Lagerstroemia speciosa* de la famille des Lythraceae (Unno et *al.*, 2004) et beaucoup d'autres espèces, mais c'est la première fois que l'activité anti-xanthine oxydase d'une plante appartenant a la famille des Ulmaceae est étudiée.

III. 6. 2 Détermination des IC50 de l'allopurinol et de l'extrait éthanolique

Le profile de l'évolution de l'activité anti-xanthine oxydase en fonction de la concentration en allopurinol ainsi qu'en extrait éthanolique de l'écorce de *U. campestris* sont représentés dans la figure N°34 et N°35, respectivement.

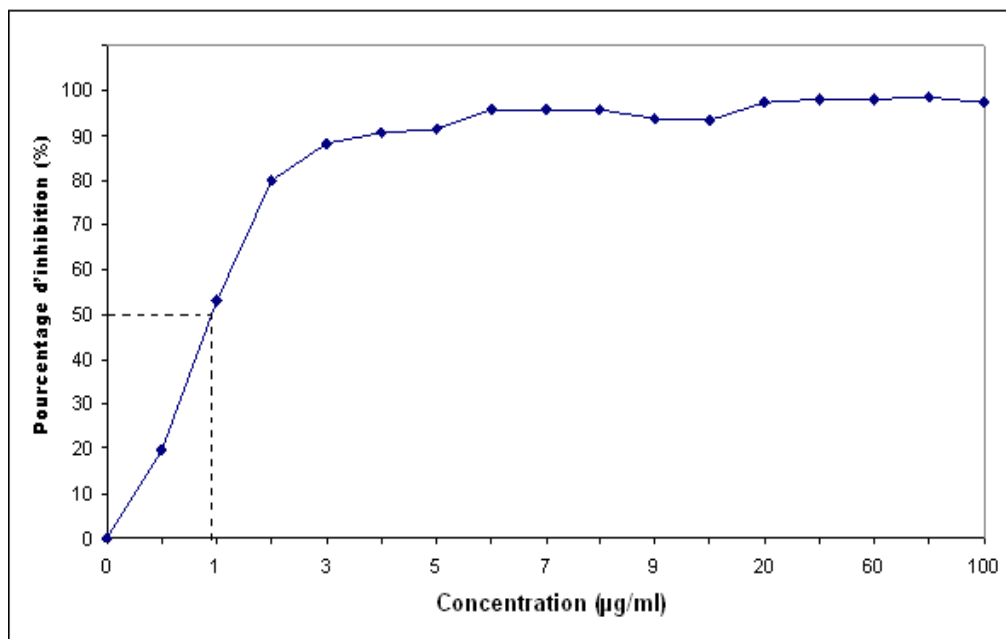


Figure N° 34 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de la XOR en fonction de la concentration en allopurinol

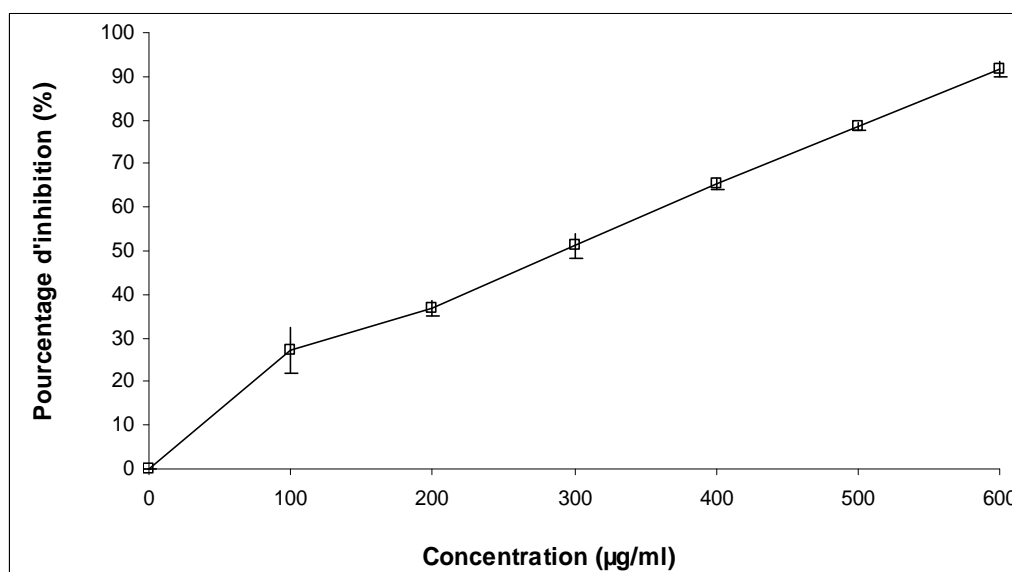


Figure N° 35 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de la XOR en fonction de la concentration en extrait éthanolique de *Ulmus campestris*.

Comme le montre la figure N° 34, l'allopurinol est un puissant inhibiteur son IC_{50} est atteint à 0,9 µg/ml alors qu'avec l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* (figure N°35), l' IC_{50} est de 285,25 µg/ml (Annexe C), indiquant une plus faible activité anti-xanthine oxydase. Mais à des concentrations plus élevées l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* est concéderai comme un puissant inhibiteur de la XOR, à 600mg/ml le pourcentage d'inhibition est de $91,77 \pm 1,83$, mais reste à déterminer si ces concentrations ne sont pas toxiques.

III. 7 Corrélation entre les teneurs en polyphénols et les activités biologiques testées

III. 7. 1 Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité scavenger du radical hydroxyle

L'activité scavenger du radical hydroxyle des extraits de *Ulmus campestris* présente une corrélation positive et significative avec le taux en phénols totaux ($R = 0,70$) (figure N° 36) et en flavonoides ($R = 0,64$) (figure N° 37), mais aucune corrélation n'a été observée avec la teneur en tannins (figure N° 38), contrairement aux extraits de *Fraxinus angustifolia* qui n'ont présenté aucune corrélation entre l'effet scavenger du radical hydroxyle et le taux en phénols totaux ou en flavonoides, mais une assez bonne corrélation positive a été observée avec les teneurs en tannins ($R= 0,74$).

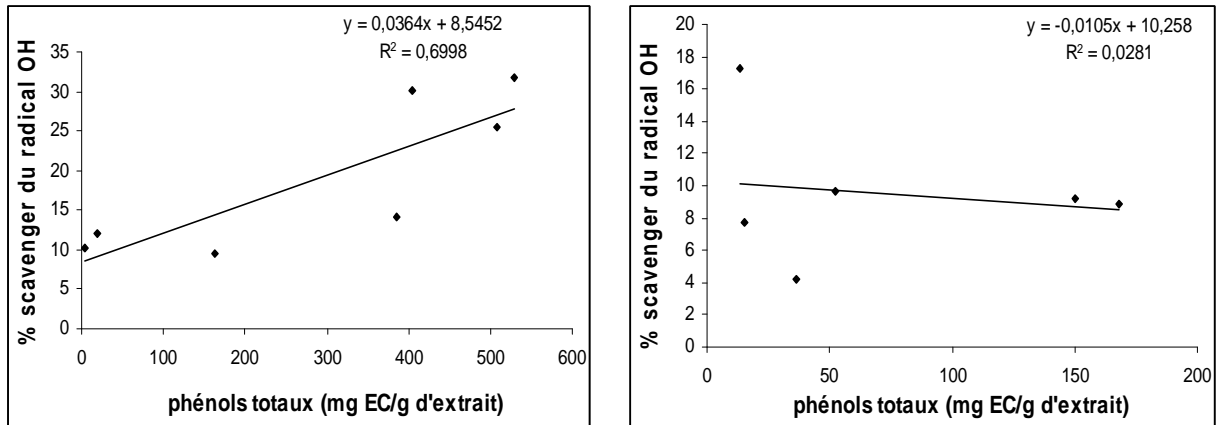


Figure N° 36 : Corrélation linéaire entre le taux en phénols totaux et le pourcentage de l'activité scavenger du radical hydroxyle des extraits de *U. campestris* (à gauche) et de *F. angustifolia* (à droite).

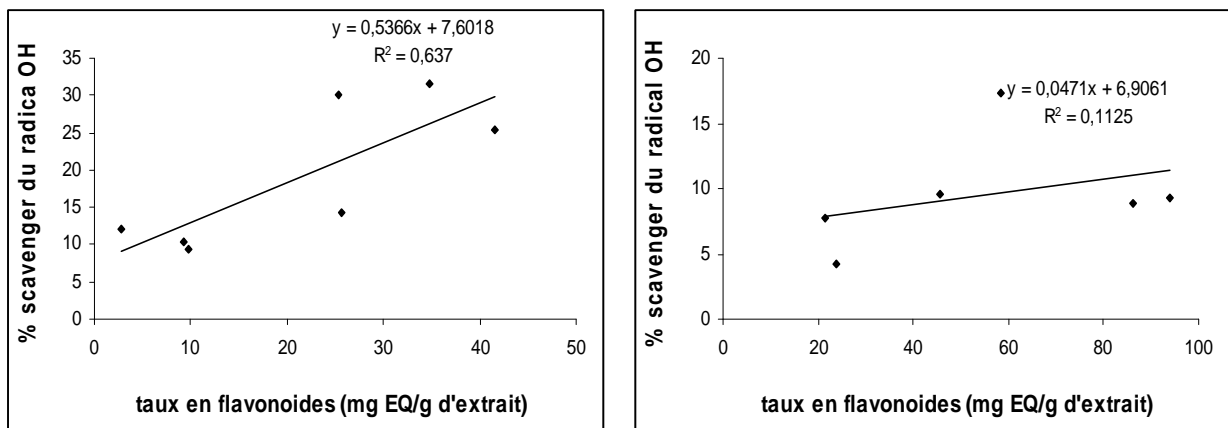


Figure N° 37 : Corrélation linéaire entre le taux en flavonoïdes et le pourcentage de l'activité scavenger du radical hydroxyle des extraits de *U. campestris* (à gauche) et de *F. angustifolia* (à droite).

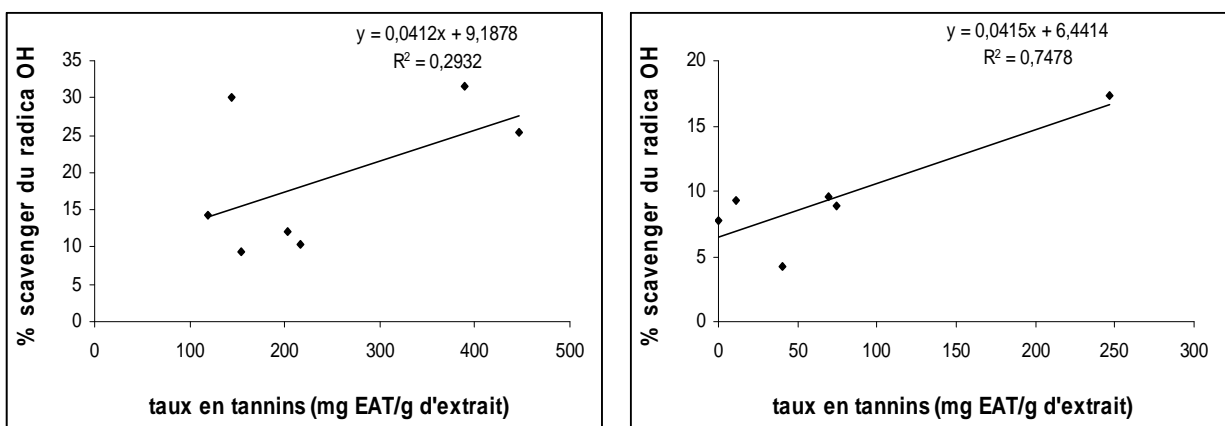


Figure N° 38 : Corrélation linéaire entre le taux en tannins et le pourcentage de l'activité scavenger du radical hydroxyle des extraits de *U. campestris* (à gauche) et de *F. angustifolia* (à droite).

III. 7. 2 Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique

Les figures N° 39, N° 40 et N° 41 montrent qu'il n'existe pas de bonnes corrélations linéaires entre le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique et les teneurs en composés phénoliques des extraits de *Ulmus campestris* et de *Fraxinus angustifolia*. Les coefficients de corrélation obtenus varient entre 0,495 et 0,006. Ainsi, des teneurs élevées en composés phénoliques ne traduisent pas des pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique élevés.

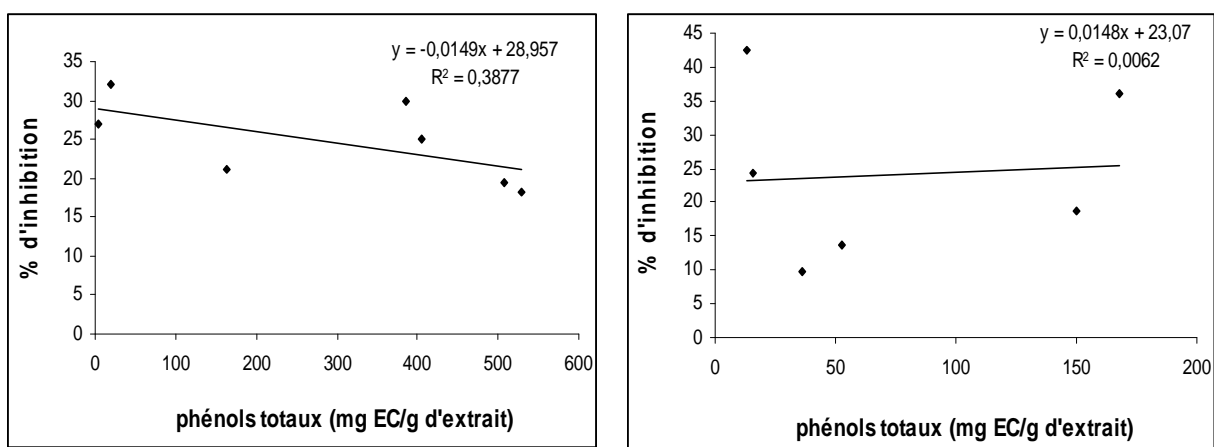


Figure N° 39 : Corrélation linéaire entre le taux en phénols totaux et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de *U. campestris* (à gauche) et de *F. angustifolia* (à droite).

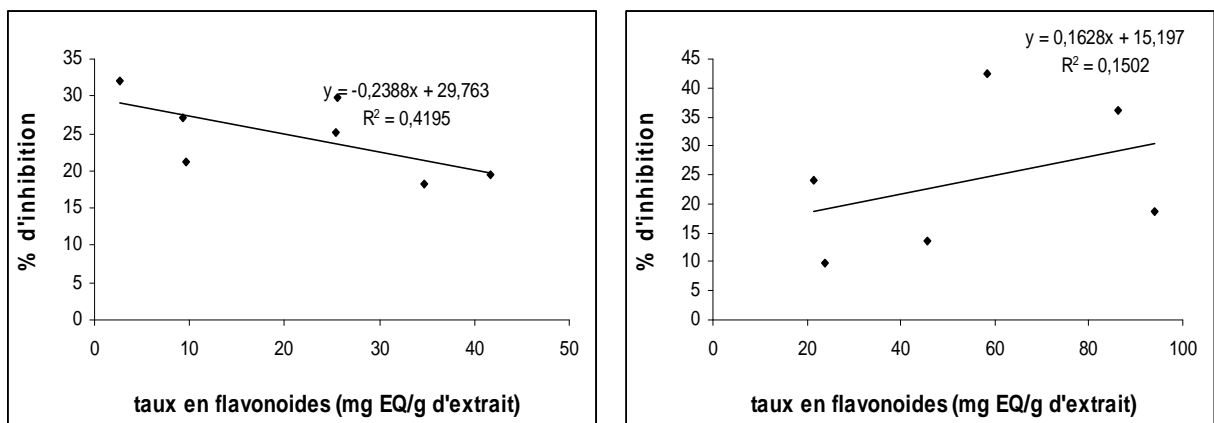


Figure N° 40 : Corrélation linéaire entre le taux en flavonoides et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de *U. campestris* (à gauche) et de *F. angustifolia* (à droite).

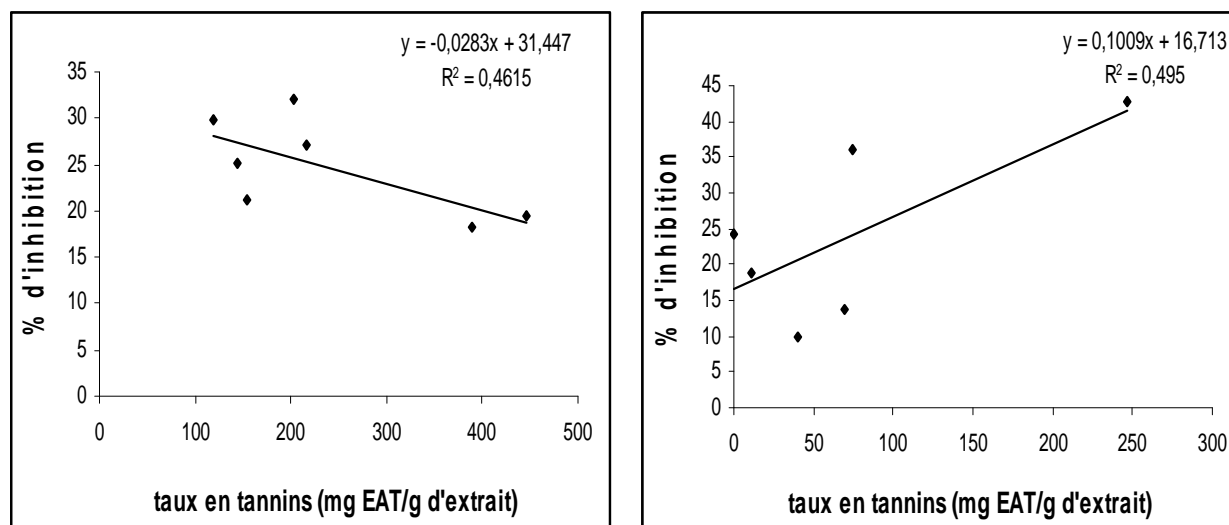


Figure N° 41 : Corrélation linéaire entre le taux en tannins et le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de *Ulmus campestris* (à gauche) et de *Fraxinus angustifolia* (à droite).

III. 7. 3 Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-xanthine oxydase

Les résultats obtenus montrent une faible corrélation linéaire positive entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-xanthine oxydase (figure N° 42). Ceci peut être expliqué par la présence dans les extraits de *U. campestris* de composés minoritaires mais à activité anti-xanthine oxydase élevée. Les coefficients de corrélation entre les teneurs en phénols totaux, en flavonoides et en tannins et l'activité anti-xanthine oxydase sont de 0,44 ; 0,52 et 0,64, respectivement.

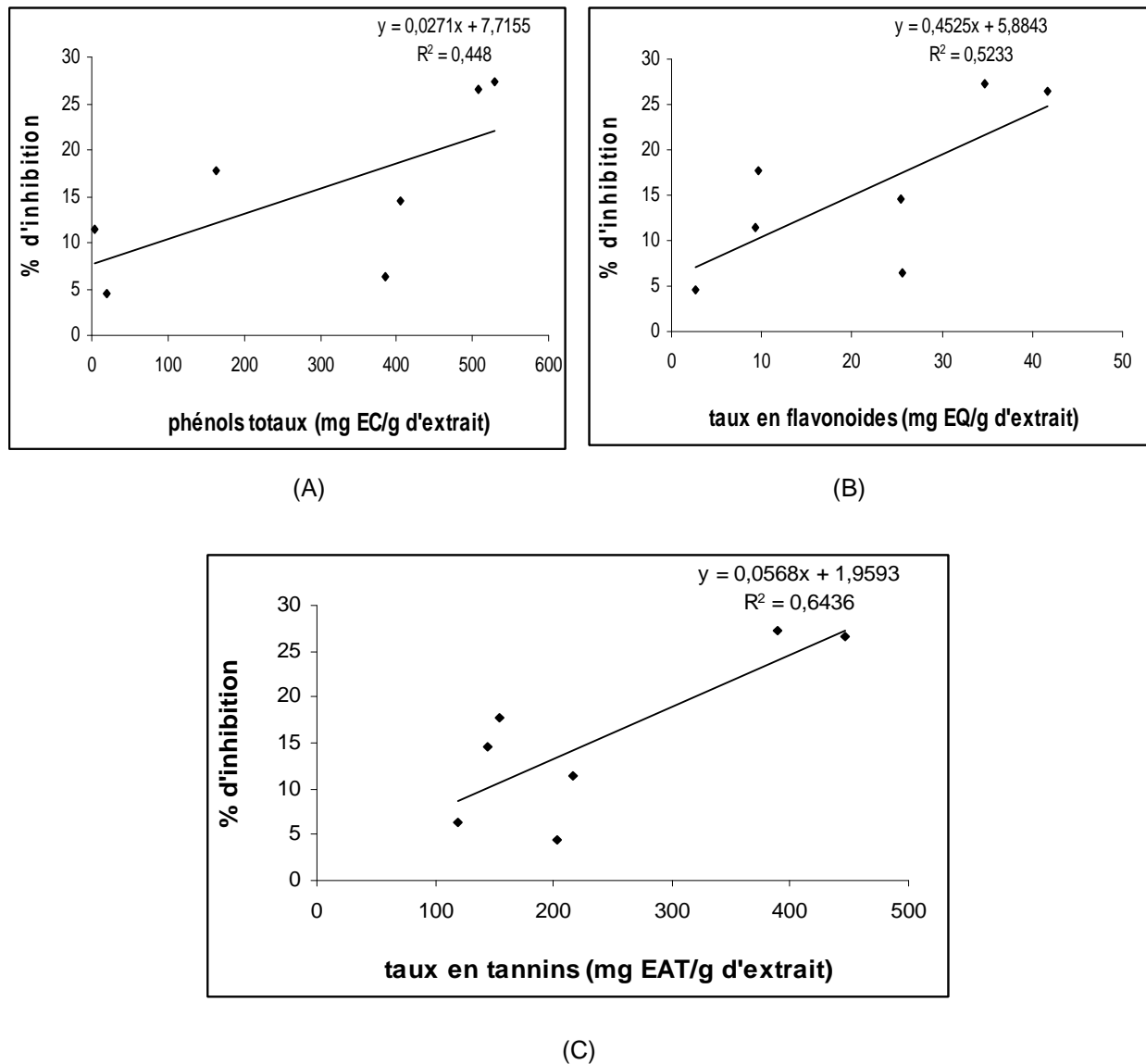


Figure N° 42 : Corrélation linéaire entre le taux en phénols totaux (A), en flavonoides (B) et en tannins (C) et le pourcentage d'inhibition de la XOR par les extraits de *U. campestris*.

De nombreuses études portant sur des extraits de plantes médicinales et autres ont montré l'existence d'une corrélation linéaire positive entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydants (Banerjee et al., 2005 ; Anagnostopoulou et al., 2006 ; Djeridane et al., 2006 ; Termentzi et al., 2006 ; Sanchez et al., 2007 ; Malencic et al., 2008). Toutefois les résultats de ces différents travaux sont très variables et sont fonction de l'espèce étudiée, de la nature et de la pureté des composés extraits ainsi que du protocole d'extraction utilisé (Spigno et De Faveri, 2007). En effet un protocole d'extraction ayant une bonne sélectivité comme celui utilisé dans cette

présente étude affaiblie cette théorie du fait que la nature des composés phénolique serait différente d'un extrait à l'autre. Les extraits contenant, même à faible quantité, des polyphénols présentant un degré d'hydroxylation élevé, des groupement 3', 4' et 5'-OH, une double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C et un groupement 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 (Heim, 2002; Balasundram et *al.*, 2006), auront une activité plus importante que ceux ayant des teneurs élevées en polyphénols qui ne présentent pas ces groupements.

L'absence d'une corrélation significative entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydants a été rapportée par Kahkonen et ses collaborateurs sur 92 extraits de plantes appartenant à différentes catégories (fruits, légumes, herbes, céréales, arbre), selon ces auteurs, la teneur en polyphénols ne prédit pas l'activité antioxydants car cette dernière ne dépend pas uniquement de la quantité en composés phénoliques mais de la structure chimique des composés en question (Kahkonen et *al.*, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus par Arlorio et ses collaborateurs (2008) sur les extraits de la graine de cacao (*Theobroma cacao L.*).

De même pour l'activité anti-xanthine oxydase, les études montrant l'existence d'une corrélation linéaire positive ou négative entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-xanthine oxydase (Sangeetha et *al.*, 2008) sont contestés par d'autres résultats montrant que certaines plantes ayant des taux élevés en polyphénols comme *Morus alba* et *Morus canadense* ne présentent pas une activité anti-xanthine oxydase significative (Owen et Johns, 1999).

III. 8 Résultats de fractionnement par chromatographie sur couche mince

Afin d'avoir une appréciation qualitative des composés phénoliques présents dans les sept extraits des écorces de *U. campestris* et de *F. angustifolia*, des chromatographies sur couche mince (CCM) comparatives des sept extraits des deux plantes et de quelques standards ont été réalisées. L'observation des chromatogrammes à la lumière du jour, sous lampe UV et après révélation à la vanilline sulfurique a permis de visualiser différentes fractions. Les rapports frontaux (RF) obtenus sont donnés dans le tableau X.

Tableau X : Les rapports frontaux des différentes fractions visualisées sur les chromatogrammes des extraits des écorces de *U. campestris* et de *F. angustifolia*

| <i>Ulmus campestris</i> | | <i>Fraxinus angustifolia</i> | |
|-------------------------|------|------------------------------|------|
| Fractions | RF | Fractions | RF |
| F ₀ | 0 | F ₀ | 0 |
| F ₁ | 0,10 | F ₁ | 0,13 |
| F ₂ | 0,25 | F ₂ | 0,39 |
| F ₃ | 0,30 | F ₃ | 0,45 |
| F ₄ | 0,47 | F ₄ | 0,56 |
| F ₅ | 0,60 | F ₅ | 0,61 |
| F ₆ | 0,65 | F ₆ | 0,69 |
| F ₇ | 0,73 | F ₇ | 0,72 |
| F ₈ | 0,82 | F ₈ | 0,76 |
| – | – | F ₉ | 0,80 |
| – | – | F ₁₀ | 0,95 |

III. 8. 1 Les chromatogrammes de *Ulmus campestris*

Les résultats de la séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits de *U. campestris* sont représentés dans les figure N°43, N°44 et N°45.

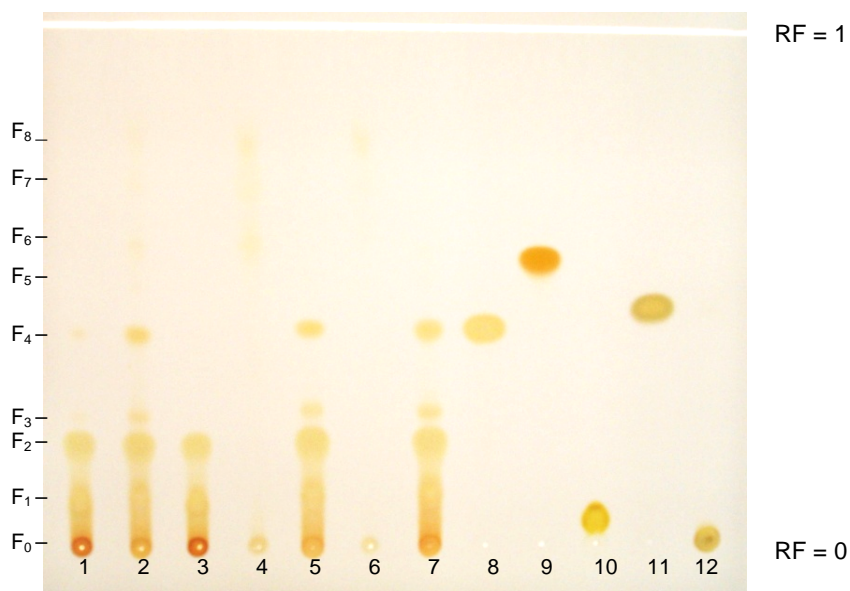


Figure N° 43 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de *U. campestris* (1 : éthanolique. 2 : acétate d'éthyle. 3 : aqueux d'acétate d'éthyle. 4 : hexane. 5 : aqueux d'hexane. 6 : chloroforme. 7 : aqueux de chloroforme) et des standards utilisés (8 : Catéchine. 9 : Quercetine. 10 : Rutine. 11 : Acide gallique. 12 : Acide tannique) à la lumière du jour.

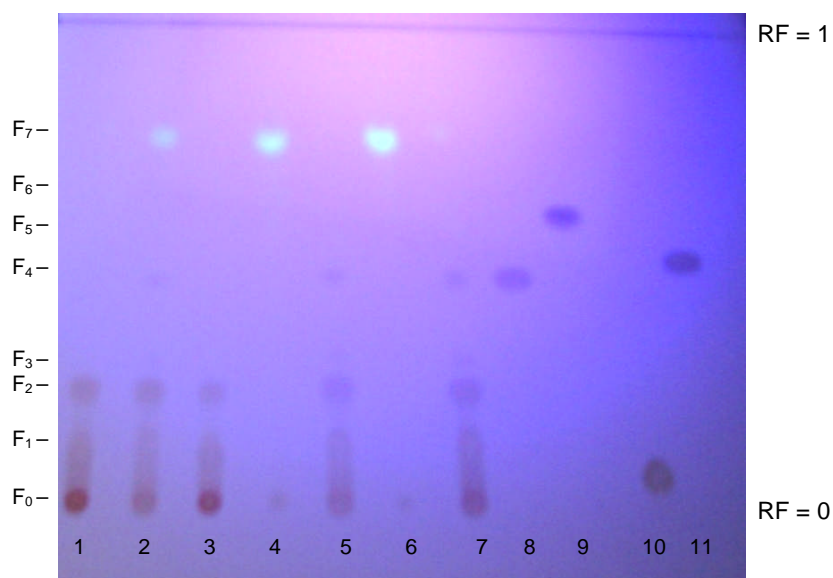


Figure N° 44 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de *U. campestris* (1 : éthanolique. 2 : acétate d'éthyle. 3 : aqueux d'acétate d'éthyle. 4 : hexane. 5 : aqueux d'hexane. 6 : chloroforme. 7 : aqueux de chloroforme) et des standards utilisés (8 : Catéchine. 9 : Quercetine. 10 : Rutine. 11 : Acide gallique.) sous UV.

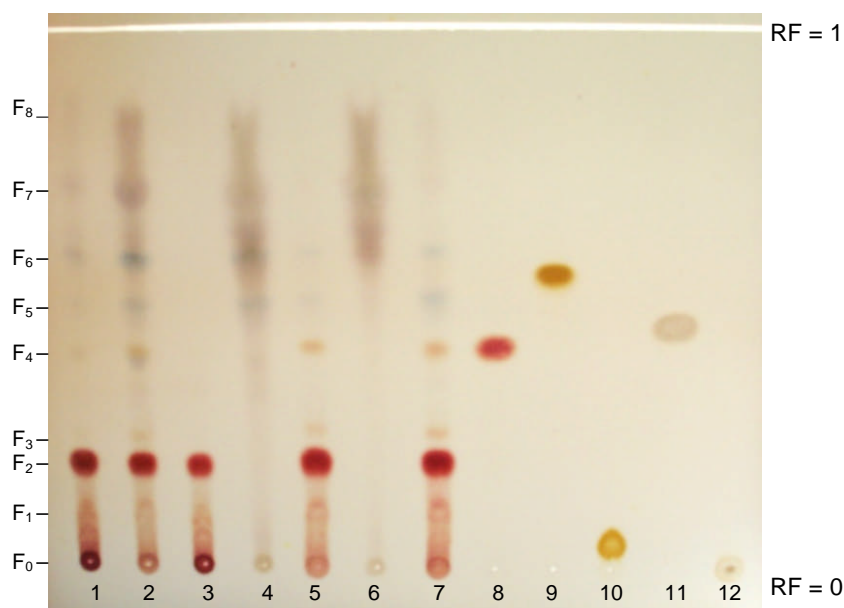


Figure N° 45 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de *U. campestris* (1 : éthanolique. 2 : acétate d'éthyle. 3 : aqueux d'acétate d'éthyle. 4 : hexane. 5 : aqueux d'hexane. 6 : chloroforme. 7 : aqueux de chloroforme) et des standards utilisés (8 : Catéchine. 9 : Quercétine. 10 : Rutine. 11 : Acide gallique. 12 : Acide tannique) après révélation à la vanilline sulfurique

En comparant les RF ainsi que la coloration des spots observée sur les chromatogrammes à la lumière du jour, sous lampe UV et après révélation à la vanilline sulfurique avec ceux des étalons appliqués dans les mêmes conditions expérimentales, on a pu identifier la catéchine qui correspondrait à la fraction F₄ dans l'extrait brut et les phases aqueuses de *Ulmus campestris*. Ce même composé, a été déjà purifié par Jung et al. (2008) à partir de l'écorce de *Ulmus davidiana*, une plante de la même famille que la notre.

Les fractions à partir de F₀ jusqu'à F₃ présentent une coloration rouge après révélation à la vanilline sulfurique. Cette couleur est caractéristique des catéchines et des tannins condensés (Jork et al., 1994). Ces fractions correspondraient aux polymères de catéchines qui ont migré suivant leur poids moléculaire et leur degré de polymérisation. La catéchine qui est un monomère (F₄) a migré le premier, les composés hautement polymérisés présentent des RF faibles ainsi la fraction F₀ (RF=0) correspondraient aux polymères de catéchine les plus complexes.

La fraction F₇ présente dans les extraits organiques apparaît d'une fluorescence bleuâtre sous UV (250 nm) prouvant ainsi qu'il s'agit de composés ayant plusieurs doubles liaisons conjuguées. D'après Misirli et Ozeker (1998), cette fraction correspondrait probablement à des acides phénoliques simples.

III. 8. 2 Les chromatogrammes de *Fraxinus angustifolia*

Les figures N° 46, 47 et 48 représentent les photographies des chromatogrammes de *Fraxinus angustifolia* à la lumière du jour, sous lampe UV et après révélation à la vanilline sulfurique, respectivement :

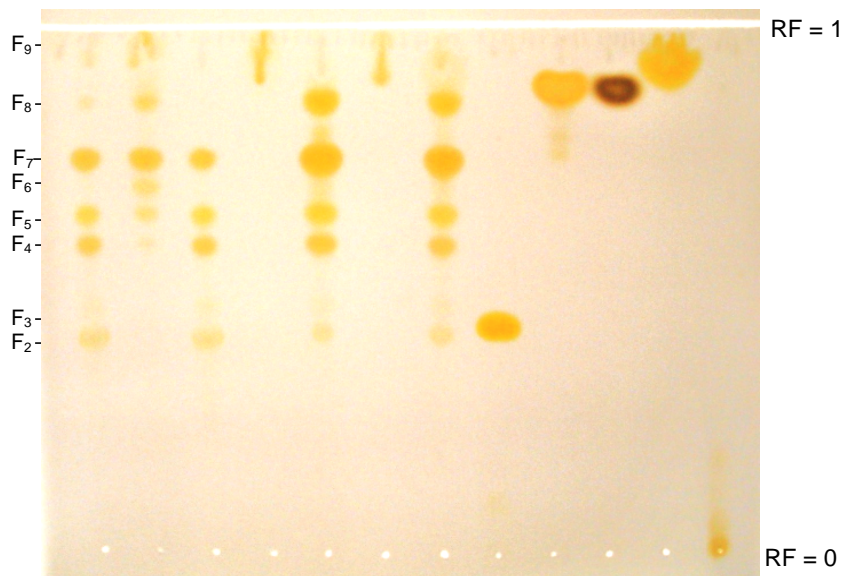


Figure N° 46 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* (1 : éthanolique. 2 : acétate d'éthyle. 3 : aqueux d'acétate d'éthyle. 4 : hexane. 5 : aqueux d'hexane. 6 : chloroforme. 7 : aqueux de chloroforme) et des standards utilisés (8 : Rutine. 9 : Catéchine. 10 : Acide gallique. 11 : Acide caféique. 12 : Acide tannique) à la lumière du jour.

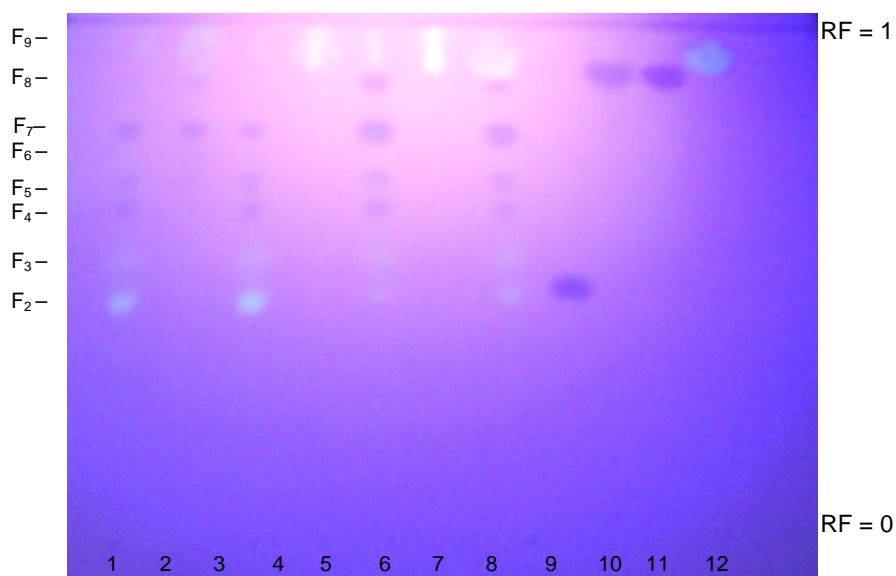


Figure N° 47 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* (1 : éthanolique. 2 : acétate d'éthyle. 3 : aqueux d'acétate d'éthyle. 4 : hexane. 5 : aqueux d'hexane. 6 : chloroforme. 7 : aqueux de chloroforme) et des standards utilisés (8 : Rutine. 9 : Catéchine. 10 : Acide gallique. 11 : Acide caféique. 12 : Acide tannique) sous UV.

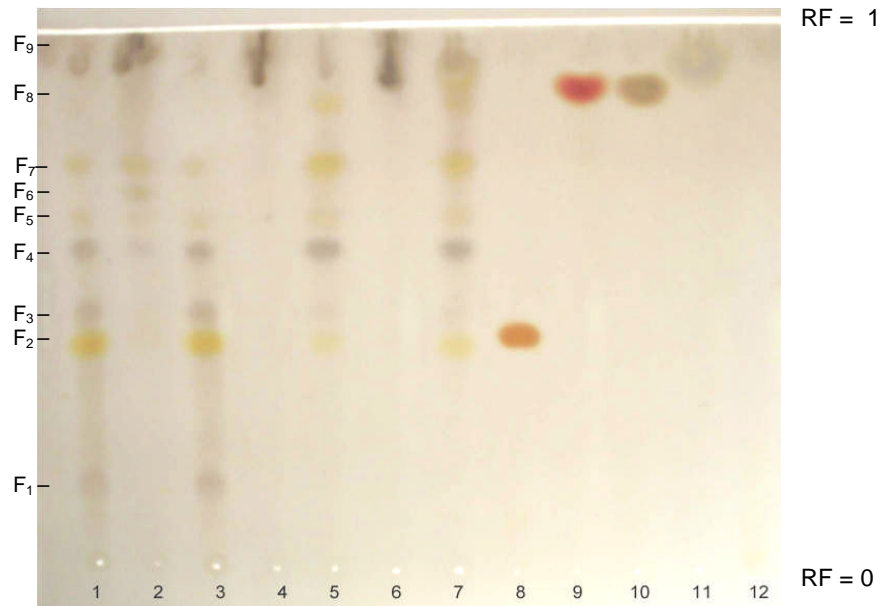


Figure N° 48 : Chromatogramme des extraits de l'écorce de *F. angustifolia* (1 : éthanolique. 2 : acétate d'éthyle. 3 : aqueux d'acétate d'éthyle. 4 : hexane. 5 : aqueux d'hexane. 6 : chloroforme. 7 : aqueux de chloroforme) et des standards utilisés (8 : Rutine. 9 : Catéchine. 10 : Acide gallique. 11 : Acide caféique. 12 : Acide tannique) après révélation à la vanilline sulfurique

D'après ces chromatogrammes on constate la diversité et la richesse des extraits aqueux de l'écorce de *F. angustifolia* comparés aux extraits organiques. Parmi les 9 spots apparus sur le chromatogramme seulement un, la fraction F9, a été retrouvée dans l'extraits d'hexane et du chloroforme alors que 8 / 9 spots sont présents dans les extraits aqueux.

L'observation des chromatogrammes sous UV a révélé l'éventuel présence d'acides phénoliques simples (fractions F9 et F2 et F3) dans les sept extraits de *Fraxinus angustifolia* de part leur couleur fluorescente sous UV.

La fraction F9 correspondrait fort probablement à l'acide caféique car elle présente un RF et une couleur similaires à ceux de l'acide caféique.

La présence de phénols simples comme l'acide gallique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide protocatehique, l'acide vanillique, l'acide syringique, et l'acide 2,4-dihydroxybenzoïque dans les extraits de plantes appartenant au genre *Fraxinus* a été rapportée par Kostova et Iossifova (2007). L'acide caféique a été identifié par ces auteurs chez trois espèces, à savoir, *F. americana*, *F. excelsior* et *F. ornus*.

III. 9 Résultats de la chromatographie sur colonne et des activités des fractions obtenues

L'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* a montré des teneurs en polyphénols considérables et des taux d'inhibition appréciables pour les trois activités testées à savoir l'activité scavenger de radical hydroxyle, l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique et l'activité anti-xanthine oxydase. Pour cela il a été choisi afin de faire l'objet d'une séparation chromatographique sur colonne. Les spectres de balayage des fractions éluées (Annexe D) ont été comparés afin de réunir les fractions qui présentent le même profil. Il en a résulté 8 fractions distinctes qu'on a numérotées de 1 à 8 suivant l'ordre d'éluion. Les activités de ces fractions ont été évaluées et les résultats obtenus sont représentés dans les figures N° 49, N° 50 et N° 51 :

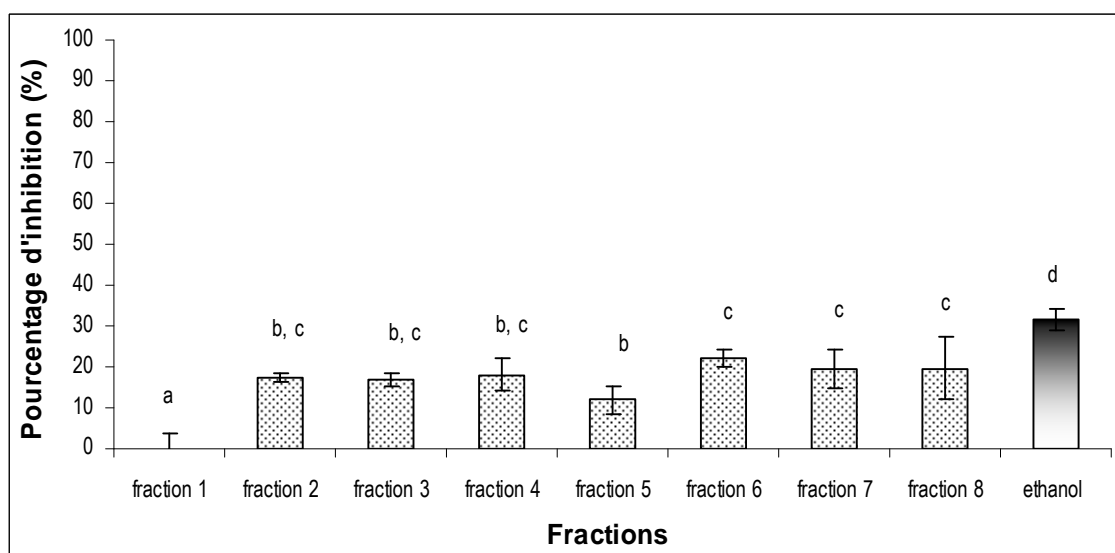


Figure N° 49 : Représentation graphique de l'activité scavenger du radical hydroxyle par les fractions de l'extrait éthanolique de *ulmus campestris* à 100µg / ml.

D'après l'histogramme ci-dessus on constate que toutes les fractions, à l'exception de la fraction 1, ont exhibé une activité anti-radicalaire significative vis-à-vis du radical hydroxyle. Mais cette activité reste inférieure à celle de l'extrait éthanolique brut, ce qui laisse présumer que le ou les composés responsables de cette activité ont été probablement repartis entre différentes fractions et que l'activité scavenger du radical hydroxyle de l'extrait éthanolique est due à la synergie entre ces composés. Il existe principalement quatre types de synergie : (i) premièrement, la régénération des antioxydants fortement actifs par les formes moins actives. Ce type de synergie est observé entre l'alpha-tocophérol et quelques composés phénoliques comme

la (+)-catechine, (-)-épicatéchine et la quercétine). (ii) Deuxièmement, des synergies peuvent également être créées par l'interaction des antioxydants à différents mécanismes d'action comme les piègeurs de l'oxygène singulet et les briseurs de la chaîne de la peroxydation lipidique ou les chélateurs des métaux de transition. (iii) L'interaction des antioxydants à différentes polarités pourrait induire la synergie, c'est le cas de l'ascorbate et de α -tocophérol. (iv) Il peut également y avoir des synergies entre les antioxydants et des substances sans aucune activité antioxydants, telle que l'albumine de sérum de boeuf (BSA) (Laguerre et al., 2007).

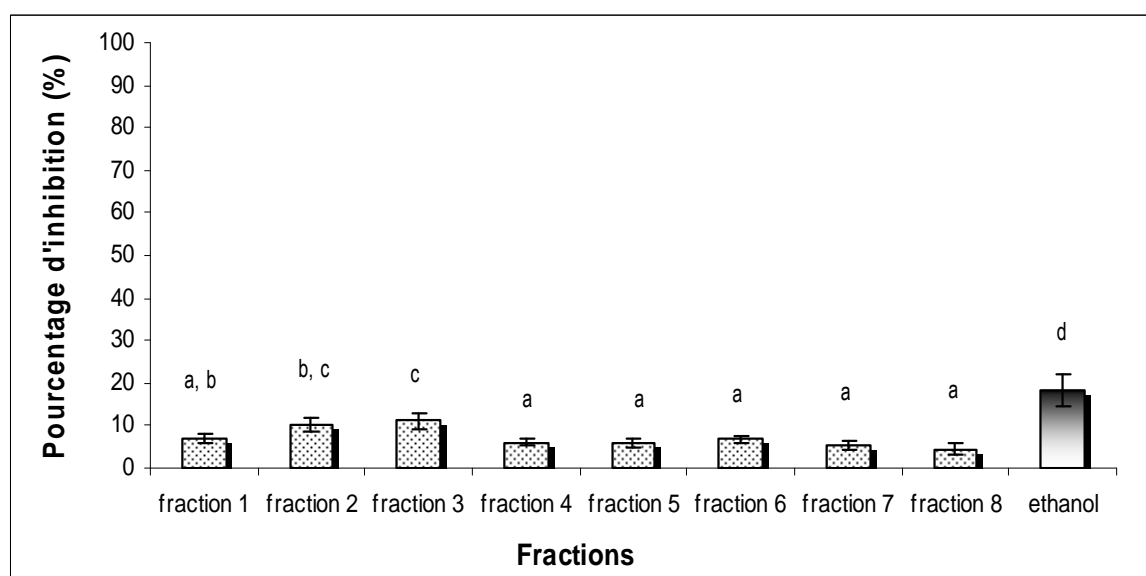


Figure N° 50: Représentation graphique du pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique par les fractions de l'extrait ethanolique de *ulmus campestris* à 100µg / ml.

La figure N° 50 illustre le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique par les fractions chromatographiques de l'extrait ethanolique de *Ulmus campestris*. Il en ressort que seules les fractions 2 et 3 ont exhibé une activité inhibitrice significative sur la peroxydation lipidique mais cette activité reste inférieure à celle de l'extrait brut. Ceci signifie que le fractionnement par chromatographie sur gel de silice n'a pas permis de concentrer le ou les composés actifs dans une même fraction, bien au contraire, les composés actifs ont été repartis entre deux fractions ou plus ce qui a provoqué une diminution de l'activité.

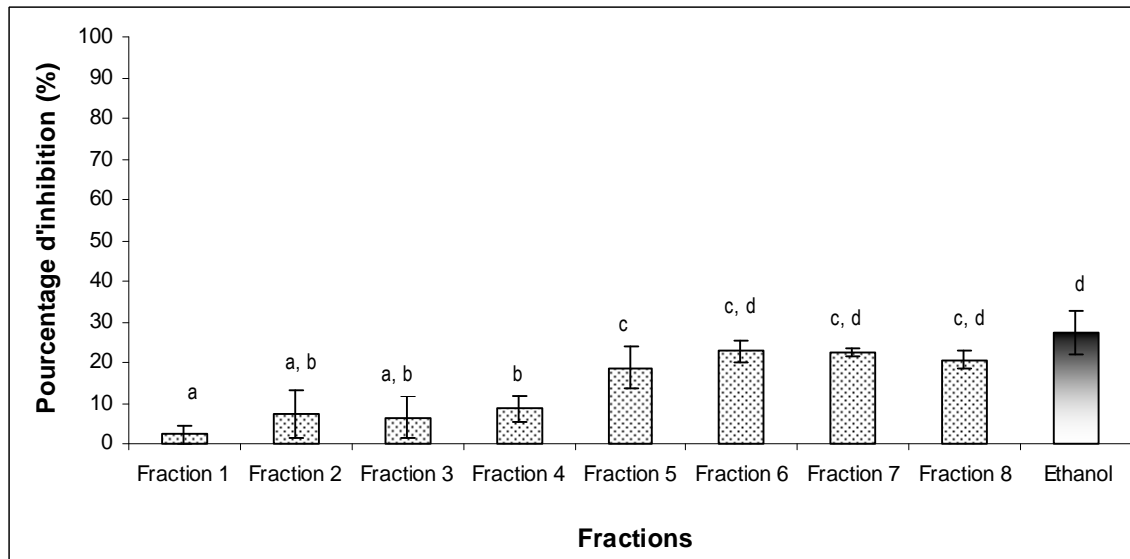


Figure N° 51 : Représentation graphique de l'activité anti-xanthine oxydase des fractions de l'extrait éthanolique de *ulmus campestris* à 100µg / ml

L'analyse des résultats de la figure N° 51 montre que l'activité anti-xanthine oxydase est proportionnelle à la polarité de la fraction. Les trois dernières fractions, les plus polaires, ont exhibé l'activité inhibitrice de la XO la plus importante, ceci pourrait être dû comme déjà discuté à leur richesse en groupement hydroxyle. Mais toutes ces valeurs restent inférieures ou proches de la valeur de l'extrait brut. Ceci n'est pas vraiment surprenant dans la mesure où les extraits obtenus par le fractionnement préliminaire lors de l'extraction ont montré une activité inhibitrice vis à vis de la XOR inférieure à celle obtenue avec l'extrait éthanolique ce qui laisse supposer que l'activité de ce dernier est due à la synergie entre les polyphénols extraits.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Les plantes sont de formidables et quasi-inépuisables réservoirs de molécules naturelles bioactives. *Ulmus campestris* et *Fraxinus angustifolia* sont deux parmi les innombrables plantes utilisées en médecine traditionnelle algérienne et dont les effets thérapeutiques pourraient être dus aux composés phénoliques. Pour l'extraction de ces derniers, nous avons adopté une méthode sélective, basée sur le degré de solubilité des composés phénoliques dans les différents solvants en fonction de leur polarité. La sélectivité de cette méthode a été confirmée par les résultats des différents dosages, des tests d'activités et de la caractérisation par chromatographie sur couche mince des extraits des deux plantes étudiées.

Les dosages effectués ont révélé également que l'écorce de *Ulmus campestris* est riche en polyphénols, essentiellement en tannins, en revanche l'écorce de *Fraxinus angustifolia* présente des taux faibles en phénols totaux, en flavonoides et en tannins mais grâce à la sélectivité de la méthode d'extraction, les polyphénols ont été concentrés et leur taux dans les dernières phases a considérablement augmenté.

La mesure du pouvoir réducteur a montré que les extraits de *Ulmus campestris* possède une capacité réductrice très élevée à 100µg/ml, dépassant même celle du standard utilisé (BHA). Les extraits de *Fraxinus angustifolia* quant à eux ont exhibé un pouvoir réducteur plus faible mais appréciable.

En ce qui concerne les activités anti-radicalaires, les extraits de *Ulmus campestris* ont montré des pourcentages d'inhibition appréciables. À 100 µg/ml, le meilleur effet scavenger du radical hydroxyle a été obtenu avec l'extrait éthanolique suivi de l'extrait aqueux du chloroforme, leurs IC₅₀ ont été estimées à 152,56 µg/ml et 167,78 µg/ml respectivement. Alors que le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique a été maximal avec l'extrait d'hexane et son l'IC₅₀ a été estimée à 281,39 µg/ml. En revanche les extraits de *Fraxinus angustifolia* ont exhibé des activités plus faibles mais qui restent significatives. L'extrait d'hexane a montré les meilleures activités scavenger du radical hydroxyle et inhibitrices de la peroxydation lipidique à 100 µg/ml ; elle sont de 17,31 ± 1,79% et 42,62 ± 2,43%, respectivement.

Les extraits de *Ulmus campestris* ont également montré un effet inhibiteur sur la XOR notamment l'extrait éthanolique qui a présenté une IC₅₀ de 285,25 µg/ml

La caractérisation des extraits des deux plantes par chromatographie sur couche mince nous a permis de dresser des profils chromatographiques dont l'un correspondrait probablement à la catéchine chez *Ulmus campestris* et l'autre à l'acide caféique chez *Fraxinus angustifolia* avec l'éventuelle présence des acides phénoliques dans les extraits des deux plantes.

La mesure des activités biologique des 8 fractions obtenues après fractionnement de l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* par chromatographie sur colonne de gel de silice a révélé des taux d'inhibition inférieurs aux taux obtenus avec l'extrait brut. Ceci nous a permis de conclure que les activités citées préalablement peuvent être dues à une synergie entre les polyphénols de cet extrait.

Les résultats de la présente étude méritent d'être affinés et pour cela il serait intéressant de :

- se focaliser sur l'étude de la composition chimique en tenant compte de l'âge de la plante, de la période de la récolte, du lieu, etc. Ceci va permettre d'observer les différents changements sur les plans qualitatif et quantitatif des composés phénoliques afin d'estimer à quelles conditions ou à quelle période telle ou telle extrait pourrait donner un rendement satisfaisant ou avoir une activité intéressante.
- compléter cette étude par des investigations concernant la probable présence d'autres activités antiradicalaires et antioxydants tel que l'activité scavenger de radical NO[•] et l'activité inhibitrice de Cytochrome C et de NADPH oxydase car il n'existe pas de teste *in vitro* qui pourrait évaluer l'activité antioxydante globale d'un échantillon. Seule la combinaison de différents tests peut donner une appréciation de la capacité antioxydante de l'échantillon à tester.
- purifier et d'identifier les principes actifs responsables de ces activités par des techniques plus performantes tel que HPLC, GC-MS et RMN.

En fin il est important de suivre cette étude par des applications *in vivo* en étudiant la toxicité de ces composés, leur activité antioxydants, leur biodistribution ou leur accumulation dans certains tissus afin de mettre en place un traitement naturel efficace et mieux toléré par l'organisme.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Arlorio, M.; Locatelli, M.; Travaglia, F.; Coriesson, J-D.; Grosso, E. D.; Minassi, A.; Appendino, G. and Martelli, A. (2008). Roasting impact on the contents of clovamide (N-caffeoyl-L-DOPA) and the antioxidant activity of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*; **106** : 967–975
- Anagnostopoulou, M. A.; Kefalas, P.; Papageorgiou, V. Andreana, P.; Assimopoulou, N. and Boskou D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*; **94** : 19–25.
- Aniya, Y. ; Miyagi, C. ; Nakandakari, ; A. Kamiya, S. ; Imaizumi N. and Ichiba T. (2002). Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine* ; **9** : 239–244.
- Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; and Robards, K. (2001). Metsu for testicule antioxydant activité. *Theo analyste*, **127** : 183-198.
- Apak, R.; Güçlü, K.; Demirata, B.; Özyürek, M.; Çelik, S. E.; Bektaşoğlu, B. K. Berker, K. I. and Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* ; **12** : 1496-1547.
- Atmani, D.; Chaher, N.; Berboucha, M.; Ayouni, K.; Lounis, H.; Boudaoud, H.; Debbache, N. and Atmani, D. (2009) Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry* ; **112** : 303–309.
- Baba, A. F. (2000). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb. Substances végétales d'Afrique d'orient et d'occident. Librairie Moderne. *Roiba Dépôt légal*. N°91, 1-294.
- Badami, S.; Vaijanathappa, J. and Bhojraj S. (2008). In vitro antioxidant activity of *Argyrea cymosa* bark extracts. *Fitoterapia* : 1-3.
- Bahorun, T.; Soobrattee, M. A.; Luximon-Ramma, V. and Aruoma OI. (2006). Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet Journal of Medical Update* ; **1** (2) : 1-17.
- Balasundram, N.; Sudram, K. and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, **99** : 191–203.
- Bandyopadhyay, U.; Das, D.; and Banerjee, R. K. (1999), Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*; **77** (5) : 658-666.
- Banerjee, A. ; Dasgupta, N. and De, B. (2005). In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*; **90** : 727–733
- Barja, G. (2002). Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Research Reviews*; 397–411.
- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine Sciences* ; **22** : 1-13.

- Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio* ; **2** (1) : 43-52.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Croit. Revy. Oral.Biol. Med* : 184-196.
- Bravo, L. (1998). Polyphénols : chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, **56** (11) : 317-330.
- Bruneton J. (1993). Composés phénoliques, acétates et chikimates in *Elément de phytochimie et de pharmacognosie. Technique et Documentation -Lavoisier (Paris)* ; Chap 2 : 174-181
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed :Technique et documentation Lavoisier.(Paris) .1120p.
- Buonocore, G. and Groenendaal, F. (2007) Anti-oxidant strategies: *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* **12** : 287-295.
- Calis, I.; Hosny, M. and Lahloub, M. F. (1993). secoiridoids from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry* ; **33** (6): 1453-1456.
- Calis, I.; Hosny, M. and Lahloub, M. F. (1996). A secoiridoid glucoside from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry*; **41** (6) : 1557.-1562
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American journal of clinical nutrition*; **8** : 223-228.
- Chang, Y-C.; Lee, F-W.; Chen, C-S.; Huang, S-T.; Tsai S-H. ; Huang S-H and ; Lin C-M. (2007). Structure-activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Free Radical Biology & Medicine* **43** : 1541–1551
- Chen, Q.; Zhao, J. and Lin, H. (2009) Study on discrimination of Roast green tea (*Camellia sinensis* L.) according to geographical origin by FT-NIR spectroscopy and supervised pattern recognition. *Spectrochimica Acta Part A* ; **72** : 845–850.
- Chiang, H.C; Lo, Y.J and Lu, F.J (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophia spinulosa*. *Journal of enzyme inhibition*. **8** (1) : 61-71.
- Choi , C. W.; Kim, S. C.; Hwang, S. S. ; Choi, B. K.; Ahn, H. J.; Lee, M.Y. ; Park, S.H. and Kim, S. K. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*; **163** : 1161-1168.
- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimangma, K.; Poel, B.V. ; Pieters, L.; Vlietinck, A. J. et Berghe, D.V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxyde scavengers. *Journal of National Product*, **61**:71-76.
- Chu Y-H, Cang C-L et Hsu H-F (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxydant activity. *Journal of the science on food and agriculture*, **80** : 561-566.

- Dasgupta, N. and De, B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study *Food Chemistry* **101** : 471–474.
- Devaraj, S. and Traber, M. G. (2003). γ -Tocopherol, the new vitamin E. *The American Journal of Clinical Nutrition*; **77** : 530–1.
- Dedy-Dupont, G.; Deby, C et Lany, M. (2002). Données actuelles sur la toxicité de l’oxygène. *Editions Scientifiques et Médicinales Alservieras*, **11** :28-39.
- Derbel, S.; et Ghedira, K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie* ; **1** : 28-34.
- Djeridane, A. ; Yousfi, M. ; Nadjemi, B. ; Boutassouna, D.; Stocker, P. and Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*. **97** : 654–660.
- Dong, C.-H. and Yao, Y.-J. (2008). In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *LWT*; **4** : 669-677.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological of cell function. *Physiology Reviews*, **82**: 47-95.
- Enroth, C.; Eger, B. T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Nishino, T. and Pai, E. F. (2005). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. *PNAS* **97** (20) : 10723–10728
- Eloff, J. N.; Famakin, J. O.; and Katerere, D. R. P. (2005). *Combretum woodii* (Combretaceae) leaf extracts have high activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *African Journal of Biotechnology* ; **4** (10) : 1161-1166.
- Eschwège, P. (2005). Quelles sont les informations fournies par la transplantation rénale sur la protection rénale ? *Annales Françaises d’Anesthésie et de Réanimation* ; **24** : 182–193.
- Escribano-Bailóno M. T. et Santos-Buegla C. (2003). Polyphenol extraction from foods In “Method in polyphenol analysis” Edition. Royal society of chemistry. pp: 1-16.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L’actualité chimique* ; 108-115.
- Ferraz Filha, Z.S.; Vitolo, I.F.; Fietto, L.G.; Lombardi, J.A. and Saude-Guimaraes, D.A. (2006). Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (“Arnica”). *Journal of Ethnopharmacology* ; **107** : 79–82.
- Fogliani B.. Raharivelomanana P.. Bianchini J-P; Bourai S. and Hnawia E. (2005) Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia *Phytochemistry*. **66**: 241–247.
- Fontaine, E. ; Barnoud, D. ; Schwebel, C. and Leverve X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation* ; **11** : 411-20.

- Freinbichler, W. ; Bianchi, L. ; Colivicchi, M. A. ; Ballini, C. ; Tipton, K. F. ; Linert, W. and Corte L. D. (2008). The detection of hydroxyl radicals in vivo. *Journal of Inorganic Biochemistry* ; 1-5.
- Friguet, B. (2003). Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. *L'actualité chimique*. 103-107.
- Fukagawa, N.K. (1999). Aging: is oxidative stress a marker or is it a causal?. *Society for experimental biology and medicine*, 222: 293-298.
- Fukunari, A. ; Okamoto, K. Nishino, T. ; Eger, B. T. ; Pai, E. F. ; Kamezawa, M. ; Yamada, I. and Kato, N. (2004). Y-700 [1-[3-Cyano-4-(2,2-dimethylpropoxy)phenyl]-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid]: A Potent Xanthine Oxidoreductase Inhibitor with Hepatic Excretion
- Galbusera, C. ; Orth, P. ; Fedida, D. and Spector, T. (2006). Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase. *Biochemical pharmacology*; **71** : 1747– 752.
- Gardès-Albert, M.; Bonnefont-Rousselot, D.; Abedinzadeh, Z. et Jore.D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène: comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *L'actualité chimique* ; 91-95.
- Gausson, H. ; Leroy, J-F. and Ozenda P. (1982) dicotylédones in Précis de botanique : végétaux supérieurs paris
- Ghedira K., (2005). Les flavonoides : structures, propriétés biologiques, rôle prophylactique, et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* ; **4** :162-169.
- Girotti, A. W. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research* ; **39** : 1529-542.
- Godber, B. L. J. ; Doel, J. J. ; Goult, T.A. ; Eisenthal R. and Harrison R. (2001). Suicide inactivation of xanthine oxidoreductase during reduction of inorganic nitrite to nitric oxide. *Biochem. J.* ; **358** : 325-333.
- Goudable, J. and Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Métabol.* **11** :1 15-20.
- Griendling, K. K.; FitzGerald G.A., MD. (2003). Oxidative Stress and Cardiovascular Injury: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. *Clinical Cardiology: New Frontiers*; **108** : 1912-1916.
- Gu, H-F.; Li, C-M.; Xu, Y-J.; Hu, W-F. Chen, M-h. and Wan Q. (2008). Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International* ; **41** : 208-217.
- Guignard J-L. (1979). Les composés aromatiques. In: Abrégé de biochimie végétale. Ed : Masson. Paris. pp : 173-197.
- Guignard, J-L. (1996). Les composés phénoliques. Biochimie végétale. Edition Masson, Paris pp : 167-231.
- Gülçin, I.; Sat, İ. G.; Beydemir, S.; Elmastas., M. and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2004) Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry* **87** : 393–400.

- Hagerman A.E. and Butler L.G. (1978). Protéins precipitation method for quantitative determination of tannins. *J. Agric. Food chem.* **26** : 809- 812.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* ; **219** : 1-14.
- Hanaaea, J.; Rashidi, M-R.; Delazar, A. and Piroozpanah, S. (2004). Onion, a Potent Inhibitor of Xantine Oxidase. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*; **4**: 243-247.
- Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase : Where Are We Now? *Free Radical Biology & Medicine*, **33** (6) : 774–797.
- Hatano, T.; Yashara, T.; Agata, I.; Noro, T. and Okuda, T. (1990). Effects of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins a related polyphenols on xanthine oxidase. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **38**:1224-1229.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids *Pharmacology & Therapeutics* ; **96** : 67– 202.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of nutritional Biochemistr* ; **13**: 572-584.
- Hennebelle, T. ; Sahpaz, S. ; Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* ; **1**: 3-6.
- Hsieh, J-F.; Wu, S-H.; Yang, Y-L. ; Choonga K-F. and Chen, S-T. (2007) The screening and characterization of 6-aminopurine-based xanthine oxidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* ; **15** : 3450–3456.
- Huang, M.T. and Ferraro, T. (1991). Phenolic compound in food and cancer prevention. Phenolic compounds in food and their effects on health. **3** : 1-83.
- Jardine, D.; Antolovich, M. ; Prenzler, P-D. And Robards K. (2002). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) Investigation of the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Reaction *J. Agric. Food Chem.* **50** : 1720-1724.
- Jork ; Funk ; Fischer ; Wimmer. (1994). Vanillin-sulfuric acid reagent in Thin-layer chromatography : Reagents and detection methods. Volume 1b. Eition VCH. pp : 446-451.
- Jung, J. M.; Heo, S-I and Wang, M-H. (2008). Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. *Food Chemistry* ; **108** : 482–487.
- Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S. and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **47**: 3954-3962.
- Kirkham, P. ; Rahman, I. (2006). Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics*; **111** (2) : 476-494.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **20** :165-177.

- Kostova, I.; and Iossifova, T. (2007). Chemical components of Fraxinus species. *Fitoterapia*, 78: 85–106.
- Kong, L. D.; Cai, Y.; Huang, W.W.; Cheng, C. H. K. and Tan, R.X. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of Ethnopharmacology*; **73**: 199-207.
- Kontush, A.; Finckh, B.; Karten, B. Kohlschutter, A. And Beisiegel, U. (2008). Antioxidant and prooxidant activity of α -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research* ; **37** : 1436-1448.
- Krenitsky, T.A. (2007). Ribonucleosides of allopurinol and oxoallopurinol : isolation from human urine, enzymatic synthesis, and characterization. *The journal of Biological Chemistry* **242** (10) : 2675-2682.
- Ksouri, R. ; Megdiche, W.; Falleh, H.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Smaoui, A.; and Chedly Abdely Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biologies* ; **331** : 865–873
- Kuwabara, Y. et al. (2003). Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *PNAS* ; **100** (14) : 8170–8175.
- Laguerre, M. ;Lecomte, J. and Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* ; **46** : 244–282.
- Landmesser, U. et al. (2007) Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Patients With Chronic Heart Failure: Role of Xanthine-Oxidase and Extracellular Superoxide Dismutase. *Journal of American Heart Association* ; **106**: 3073-3078.
- Lee, Y-L. ; Yen, M-T. ; Mau, J-L. (2007). Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. *Food Chemistry*; **104** : 1–9.
- Lefèvre, G. ; Beljean-Leymarie, M. ; Beyerle, F. ; Bonnefont-Rousselot, D. ; Cristol, J.-P ; Théron, P. and Torrelles, J. (1998), Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales de Biologie Clinique* ; **56** (3) : 305-324.
- Leonard, S.S.; Harris, G. K. and Shi, X. (2004). Oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine* ; 37 (12) : 1921–1942.
- Lepoittevin, C. (2004). Disparition de l'Orme en France : Causes et Solutions. *Camille DAA Ingénierie des Productions Végétales* ; 1-43.
- Lin C.M, Chen C.S, Chen C.T, Liang Y.C and Lin J.K (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* ; **294** : 167–172.
- Linder, N. (2005). Expression and regulation of human xanthine oxidoreductase. University of Helsinki Finland. 1-47.
- Leiris, J. (2003). Biochemistry of free radicals. *Heart Metab.* **19** : 40–44

- Macheix, J.J.; Fleuriet, A.; et Jay- Allemand, C.H. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*, p : 1 – 31.
- Malencic, D.; Maksimovic, Z. ; Popovic, M. and Miladinovic, J. (2008). Polyphenol content and antioxidant activity of soybeanseed extracts. *Bioresource Technology*. **99** : 6688-6691.
- Mauhin F. (2005). Les ormes (ulmus). *Le petit sourcier* ; **1** : 15-27.
- Margaill, I.; Plotkine, M. and Lerouet, D. (2005), Antioxidant strategies in the treatment of strokei. *Free Radical Biology & Medicine* ; **39** : 429– 443
- Maksimovié, Z.; Malencié, N.D. and Kovacevié, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology* ; **96** (8): 873-877.
- Mc Manaman, J.L and Bain, DL. (2002) Structural and conformational analysis of the oxidase to dehydrogenase conversion of xanthine oxidoreductase. *The journal of Biological Chemistry* ; **227** (24): 21261-21268.
- Mc Mannus, J.P. et al. (1981). The association of protéins with polyphénols. *J Chem Chem Co* ; 309-311.
- Miguel, G.; Simoes, M.; Figueiredo, A.C. ; Barroso, J.G.; Pedro, L.G. and Carvalho, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry*; **86** : 183–188.
- Milane H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat*, Université Louis Pasteur Strasbourg. 1-268.
- Miller N. J.; Sampson J.; Candeias, L.P.; Bramley, P.M.; Rice-Ivans, C.A. (1996). Antioxydant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*; **384**: 240-242.
- Mink, R. and Johnston, J. (2007). The effect of infusing hypoxanthine or xanthine on hypoxic–ischemic brain injury in rabbits. *Brain Research*; **1147** : 256–264.
- Misirli, A.; and Ozeker, E. (2001). Characterization of some *Pistacia* spp. through phenolic content, *LWT*, 39: 164–169.
- Mompon B. et al. (1998). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. in polyphénols. *INRA* (Paris) ; (**87**) : 31-43.
- Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;; originally published online Oct
- Mueller, C.F.H.; Laude, K ; McNally J. S. and Harrison D. G. (2005). Redox Mechanisms in Blood Vessels. **25** : 274-278.
- Nedeljkovic, Z S.; Gokce, N. and J Loscalzo. (2003). Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J.* **79**:195–200.
- Nishino T., Ken Okamoto and Pai E. (2003). High-Resolution Structure of Bovine Milk Xanthine Oxidoreductase and Inhibitor Complexes. *Life science.* 11-13.

- Nishino, T. Okamoto, K.; Kawaguchi, Y. Hori, H. Matsumura, T. ; Eger, B. T. ; Pai E. F. and Nishino, T.. (2005). Mechanism of conversion of xanthine dehydrogénase to xanthine oxidase: identification of the two cysteine disulfide bonds and crystal structure of a non-convertible rat liver xanthine dehydrogénase mutant. *Journal of biological chemistry* **280** (26): 24888-24894.
- Nakagawa, T. and Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology*; **40** (12) : 1745-1750.
- Okamoto, K. ; Eger, B. T. ; Nishino T. and Pai E. F. (2002). An Extremely Potent Inhibitor of Xanthine Oxidoreductase: Crystal Structure of the Enzyme-Inhibitor Complex and Mechanism of Inhibition. *Journal of biological chemistry* .1-39.
- Okamoto, K. ; Matsumoto, K. ; Hille, R. ; Eger, B. T. ; Pai E. F. and Nishino T. (2004). The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: Implications for reaction mechanism and enzyme inhibition. *Journal of biological chemistry*. **101** (21) : 7931–7936
- Owen, P.I. and Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory of northeastern North American plants remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*. **64** : 149-160.
- Oyaizu, M . (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* , **44**:307-315.
- Pacher, P.; Nivorozhkin, A. and Szabo, C.. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors : Renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev*; **58** (1) :87–114.
- Paiva, S.A.R. and Russell, R.M. (1999). b-Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants *Journal of the American College of Nutrition*; **18** (5) : 426–433.
- Pandey, N. ; Chaurasia, J.K. ; Tiwari, O.P. and Tripathi, Y. B. (2007). Antioxidant properties of different fractions of tubers from *Pueraria tuberosa* Linn. *Food Chemistry* ; **105** : 219–222.
- Pasquier, C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des laboratoires*, **276** : 87-96.
- Pietta P-G. (1999). Flavonoids as antioxidants. *J.Nat Prod* 63 : 1035-1042
- Pincemail J. ; Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer . *Vaisseaux, Coeur, Poumons*. **4** (4) : 1-4.
- Pinnell, S. R.; Durham, M. D.; and Carolina, N. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal American Academic Dermatology*; **48** (1): 1-22.
- Podsdek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables. *LWT*; **40** : 1–11.
- Pohar S. and Murphy G. (2006). Le febuxostat dans la prévention de la crise de goutte. *Ottawa: Agence canadienne des médicaments et des technologies de la santé*; **87** :1-4.
- Poston, L. and Raijmakers, M. T. M. (2004). Trophoblast Oxidative Stress. Antioxidants and Pregnancy Outcome. *Placenta* ; **18** (25):72–78

- Pritsos, C.A. (2000) cellular distribution, métabolism and régulation of xanthine oxidoreductaseenzym system. *Chemico-biological interactions*. **129** : 195-208.
- Rahman, I.; Biswas, S.K.; and Kode, A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*, **533** : 222–239.
- Ramasarma, T. (2006). Free radicals : The friendly ghosts. *SFRR_ India*. **5** : 28-30.
- Ré, D.B. ; Nafia, I. ; Nieoullon, A. ; Kerkerian Le Goff, L. and Had-Aissouni, L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* ; **24** : 502–509.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). Notions générales sur les composés phénoliques. In : Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod* ; pp : 1-27.
- Richter, G. (1993). Les composés phénoliques, métabolisme des végétaux (physiologie et biochimie). *Edition Dunod*. 317-339.
- Sanders, S. A.; Eientthal, R. And Harrison, R. (1997). NADH activity of Human xanthin oxydoreductase, generation of superoxyde anion. *Journal of biochemistry* ; **245** : 541-548.
- Sangetha, S. ;Sasidharan, S. ; Zuraini, Z. and Suryani, S. (2008). Antioxidant Activity of Methanolic Extracts of *Cassia Surattensis*. *Pharmacologyonline*; **2** : 829-838.
- Schafer, F.Q.; Yueqian, S. and Buettner, G. R. (2000). Iron and free radical oxidations in cell membranes. *Cellular and Molecular Biology*; **46** (3): 657-662.
- Schreibelta, G.; Horssena, J. v.; Rossuma, S. v.; Dijkstra, C. D.; Drukarch, B. and Vries, H. E. (2007). Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Research Reviews* ; **56** : 322–330.
- Schuldta, E.Z.; Farias, M.R. ; Ribeiro-do-Valle, R.M. and Ckless, K. (2004) Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. *Phytomedicine*; **11** : 523–529
- Seifried, H. E.; Anderson, D. E.; Fisher, E. I. and Milner, J. A. (2007). Interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*; 1-13.
- Singh, R.; Singh, S.; Kumar, S. and Arora S. (). Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chemistry* : 1-7.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality ? *C. R. Biologies* ; **327** : 649–66.
- Spigno, G. and De Faveri, D-M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* **78** : 793–801.
- Srinivasan, R.; Chandrasekar, M.J.N. ; Nanjan, M.J. and Suresh, B. (2007). Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. *Journal of Ethnopharmacology* ; **113** : 284–291.

- Takano, Y.; Hase-Aoki, K.; Horiuchi, H.; Zhao, L. ; Kasahara, Y., Kondo, S. and Becker M. A. (2005). Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. *Life Sciences* ; **76** : 1835–1847.
- Termentzi, A. ; Kefalas, P. and Kokkalou E. (2006). Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food Chemistry*; **98** : 599–608.
- Thuong, P. T.; Su, N. D.; Ngoc, T. M. ; Hung, T. M. ; Dang, N. H. ; Thuan, N. D.; Bae, K. and Oha, W. K. (2009). Antioxidant activity and principles of Vietnam bitter tea *Ilex kudingcha*. *Food Chemistry*; **113** : 139–145
- Tiwari, O. P. and Tripathi, Y. B. (2007) Antioxidant properties of different fractions of *Vitex negundo* Linn. *Food Chemistry* ; **100** : 1170–1176.
- Tonon, G.; Capuana, M. and Di Marco A. (2001). Plant regeneration of *Fraxinus angustifolia* by in vitro shoot organogenesis *Scientia Horticulturae* **87** : 291-301.
- Toor, R.K.; Savagea, G.P. and Lister, C.E. (2006) Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis* ; **19** : 1–10.
- Traber, M. G. and Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine* ; **43** : 4–15.
- Traber, M. G. and Packer, L. (2008). Vitamin E: beyond antioxidant function. *The American Journal of Clinical Nutrition*; **62** : 1501_ 1509.
- Unno,T.; Sugimoto, A. and Kakuda, T. (2004). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *Journal of Ethnopharmacology* ; **93** : 391–395.
- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M. and Mazur M.(2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* ; **160** : 1–40.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazura, M. and Telser J. (2007), Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* ; **39** : 44–84
- Vamecq, J.; Vallée, L.; Strome, L.; Gelé, P et Bordet, R. (2004).Les acteurs immédiats du stress oxydatif: Key players in oxidative stress.*la Lettre du Pharmacologue* ; **18**:16-23.
- Vergely, C. and Rochette L. (2002). Le point sur les NO synthases au niveau cardiovasculaire périphérique. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, **51** : 109–116.
- Villar, R.; Robleto, J. R. ; Jong Y.; Poorter, H. Differences in construction costs and chemical composition between deciduous and evergreen woody species are small as compared to differences among families. *Plant, Cell and Environment* ; **29** : 1629–1643.
- Vincent, A. M.; Russell, J. W.; Low, P. and Feldman E. L. (2004). Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*; **25** (4):612–628.

Vorbach, C. ; Harrison., R. and Capecchi M. R.(2003) Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *TRENDS in Immunology* **24** (9) : 512-517.

Wassmann, S.; Wassmann, K. and Nickenig, G. (2004), Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* ; **44** (4): 381-386.

Watterson, J.J. and Bulter, L.G. (1983). Occurrence of an unusual leucoanthocyanidin and proanthocyanidins in sorghum leaves. *JAgr Food Chem* ; **31**: 41-45.

Wiseman, H. and Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer. *Journal of Biochemistry*; **313** : 17-29.

Wu, S.-J. and Ng, L. T. (2008), Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT - Food Science and Technology* *LWT* **41** : 323–330.

Wu, W-M.; Lu, L.; Long, Y.; Wang, T.; Liu, L.; Chen, Q. and Rui Wang. (2007). Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes : A structure–activity insight. *Food Chemistry* ; **105** : 107–115.

Zhang, Y.; Marcillat, O.; Giulivi, C.; Ernster, L. and Davies K .J. A. (1990) The Oxidative Inactivation of Mitochondrial Electron Transport Chain Components and ATPase. *The journal of biological chemistry*; **265** (27) : 16330-16336

Zhao, X.; Sun, H.; Hou, A.; Zhao, Q.; Wei, T.; and Xin, W. (2005). Antioxidant properties of two galloannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica Biophysica Acta*, **1725** : 103-110.



Annexe A : Les voies de biosynthèse des composés phénoliques

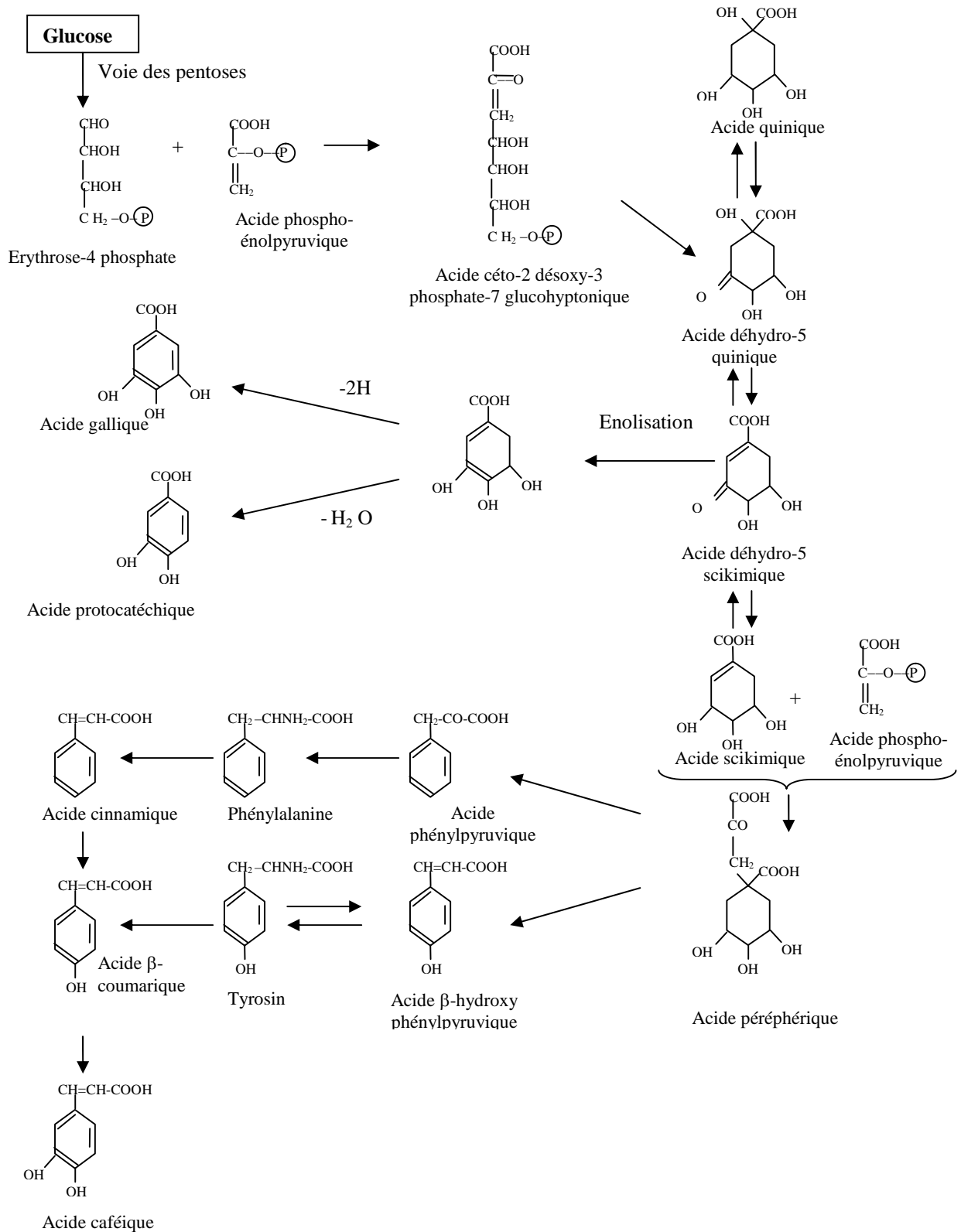


Figure N° 01 : Formation des composés phénoliques à partir des glucides par l'intermédiaire de l'acide shikimique (Ribereau-Gayon, 1968).

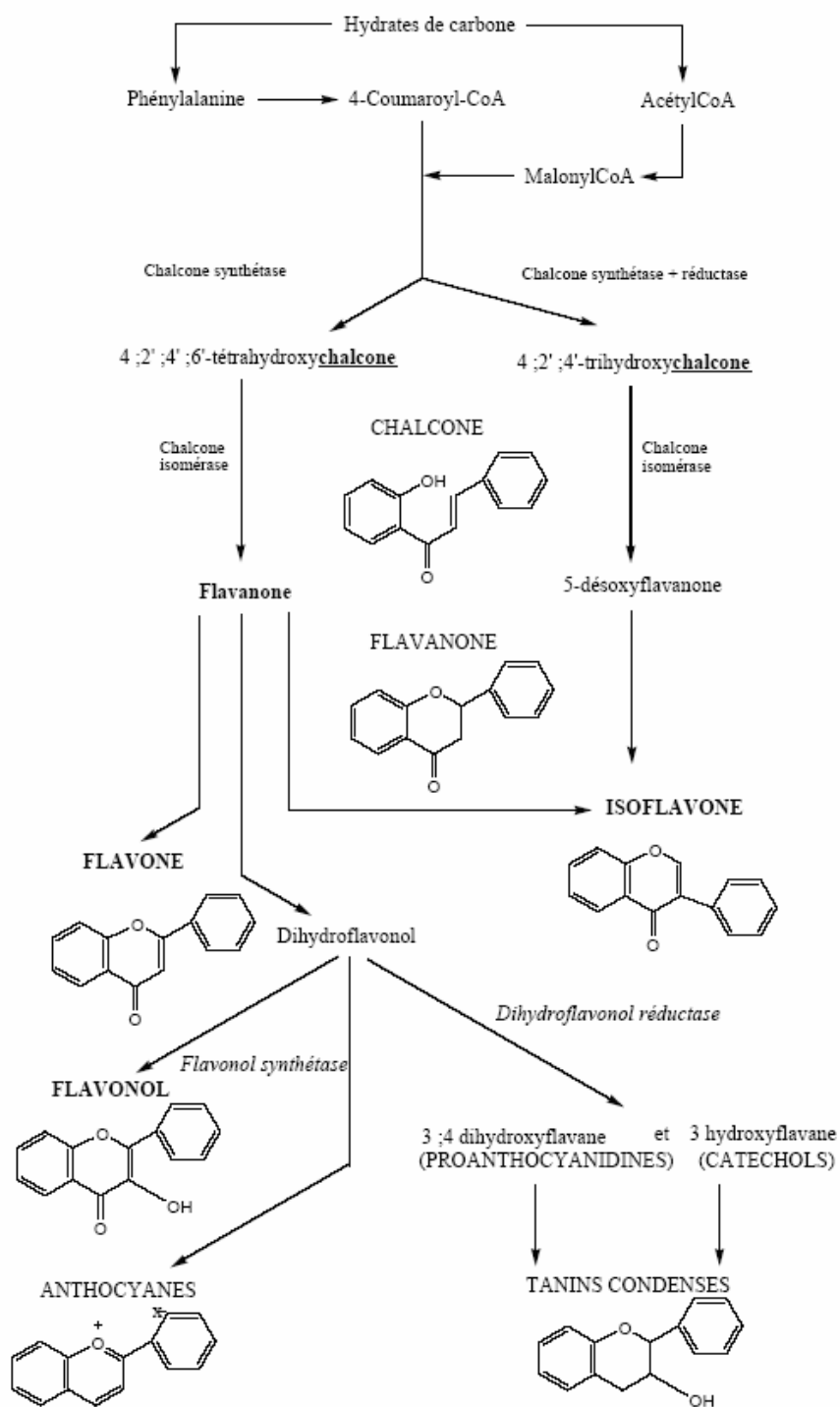


Figure N° 02 : Formation des composés phénoliques à partir de l'acétate (Milane, 2004).

Annexe B : Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des taux de phénols totaux, flavonoïdes et tannins.

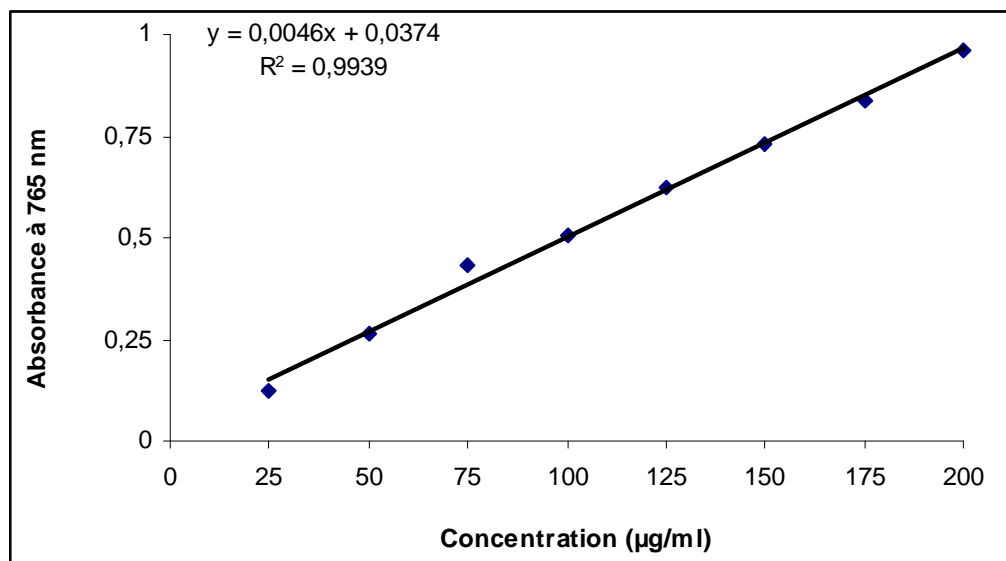


Figure N° 03 : Coube d'etalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

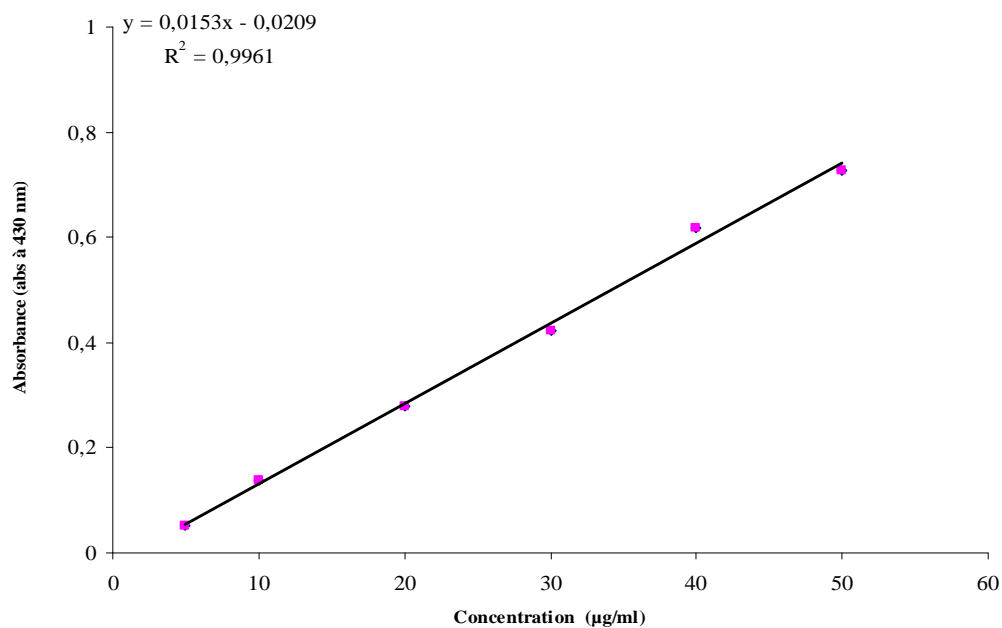


Figure N° 04 : Courge d'étalonnage avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes

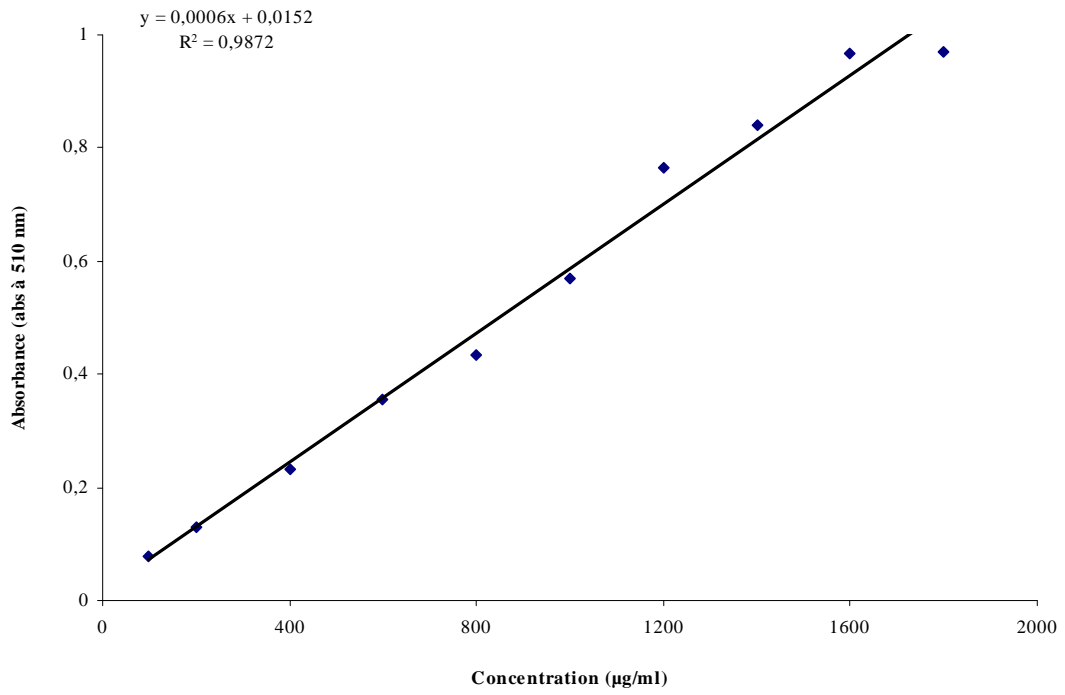


Figure N° 05 : Courbe d'étalonnage avec l'acide tannique pour le dosage des tannins.

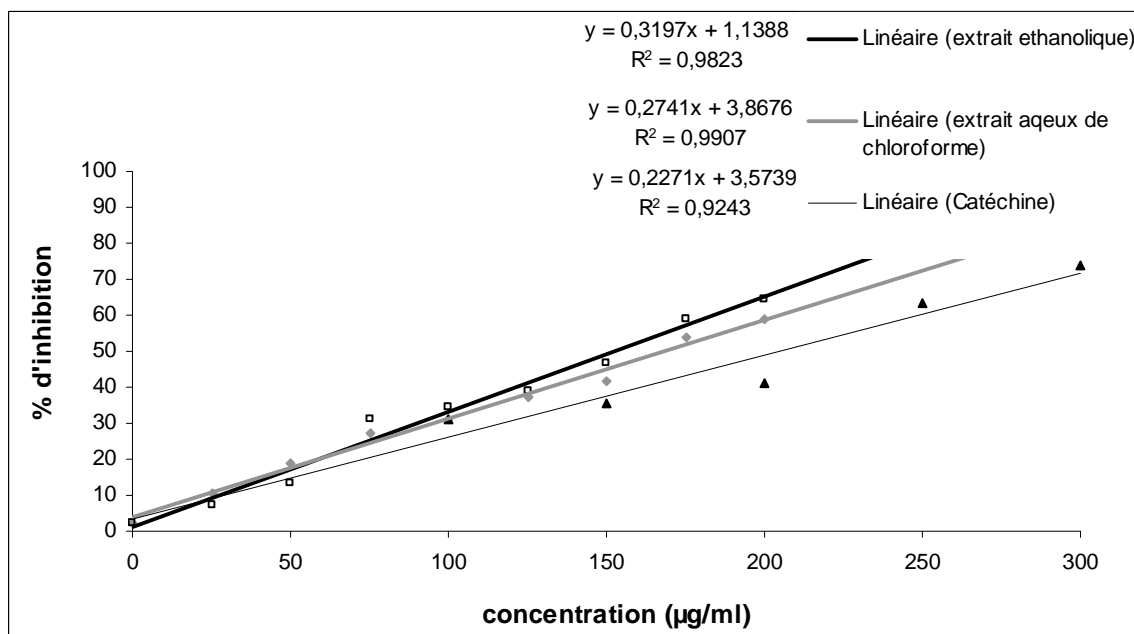
Annexe C : Les courbes de régressions utilisées pour le calcul des IC₅₀

Figure N° 06 : Représentation graphique des droites de régression montrant l'évolution du pourcentage d'inhibition de la formation du radical hydroxyle en fonction de la concentration en catéchine et en extraits éthanolique et aqueux de chloroforme de l'écorce de *U. campestris*.

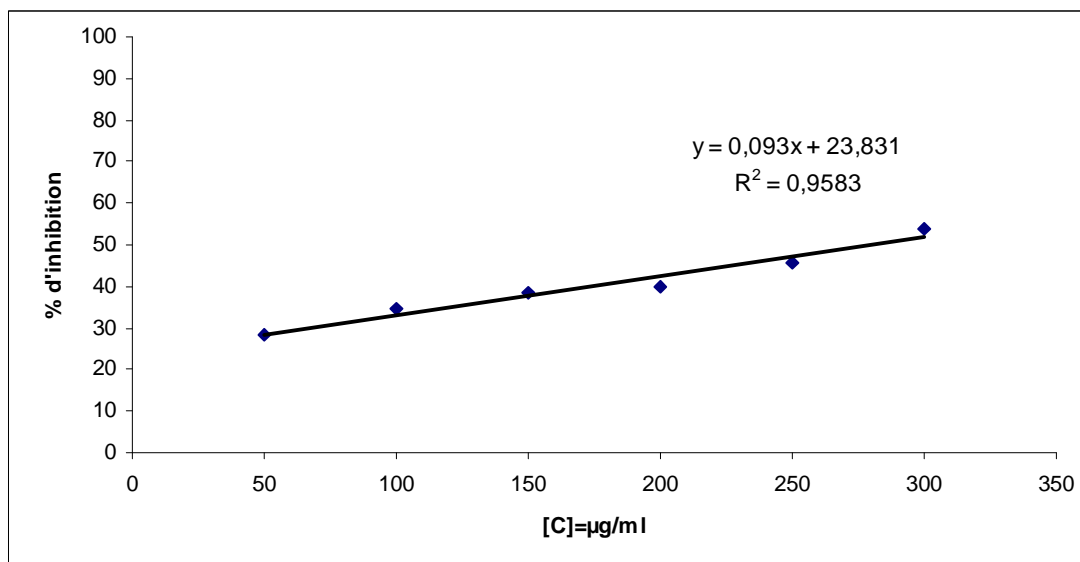


Figure N° 07 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de peroxydation lipidique en fonction de la concentration en extrait d'hexane de l'écorce de *U. campestris*.

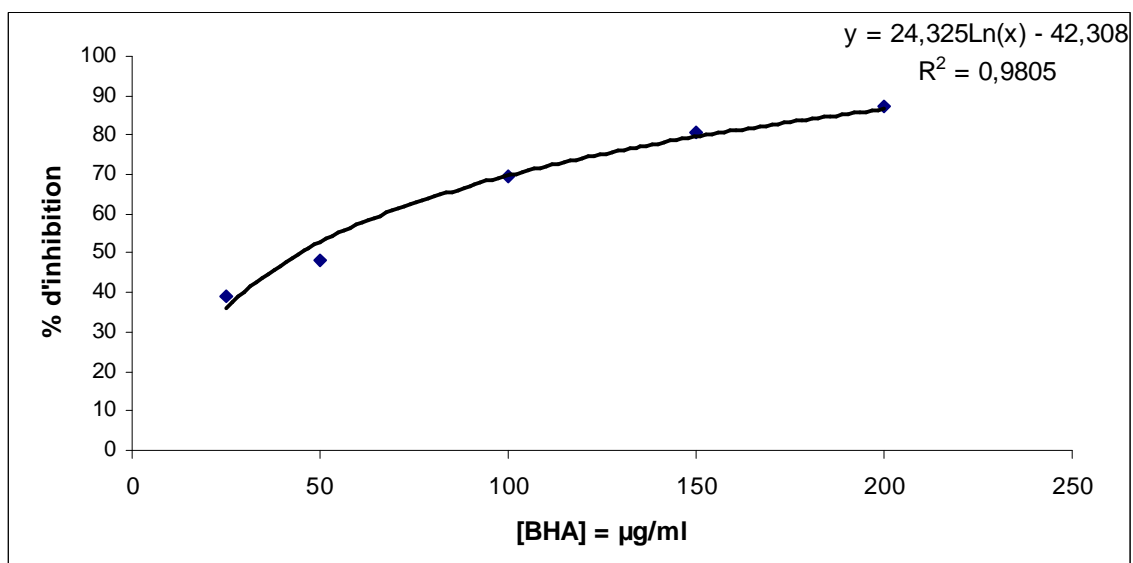


Figure N° 08: Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de peroxydation lipidique en fonction de la concentration en BHA.

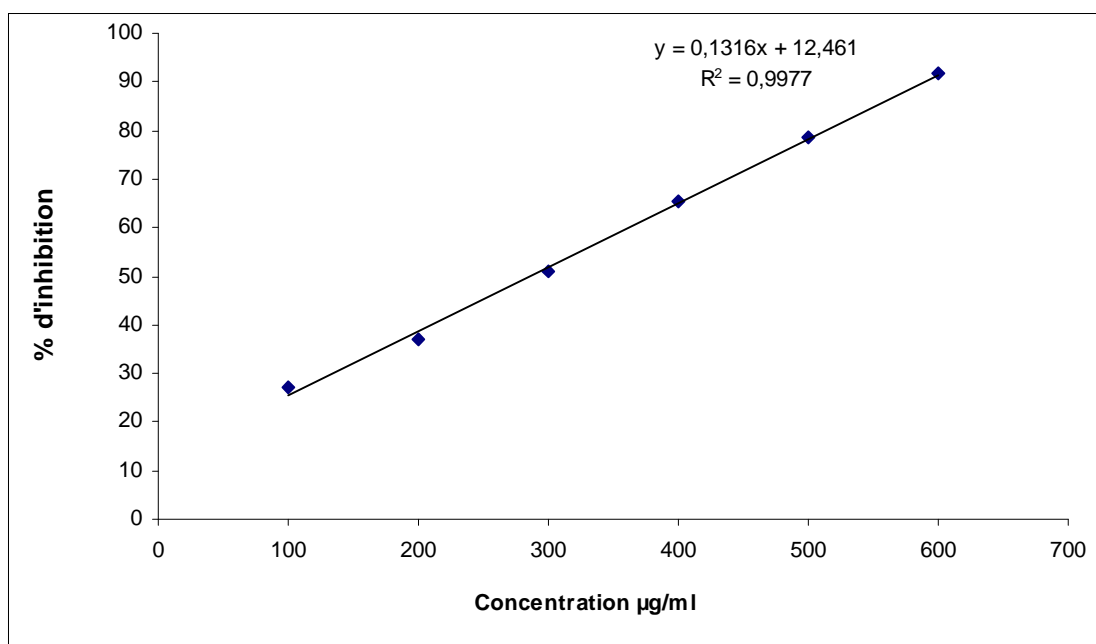


Figure N° 09 : Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition de la XOR en fonction de la concentration en extrait éthanolique de *ulmus campestris*.

Annexe D : Les Spectres de balayage de l'extrait éthanolique et des fractions issues de cet extrait après séparation par chromatographie sur colonne.

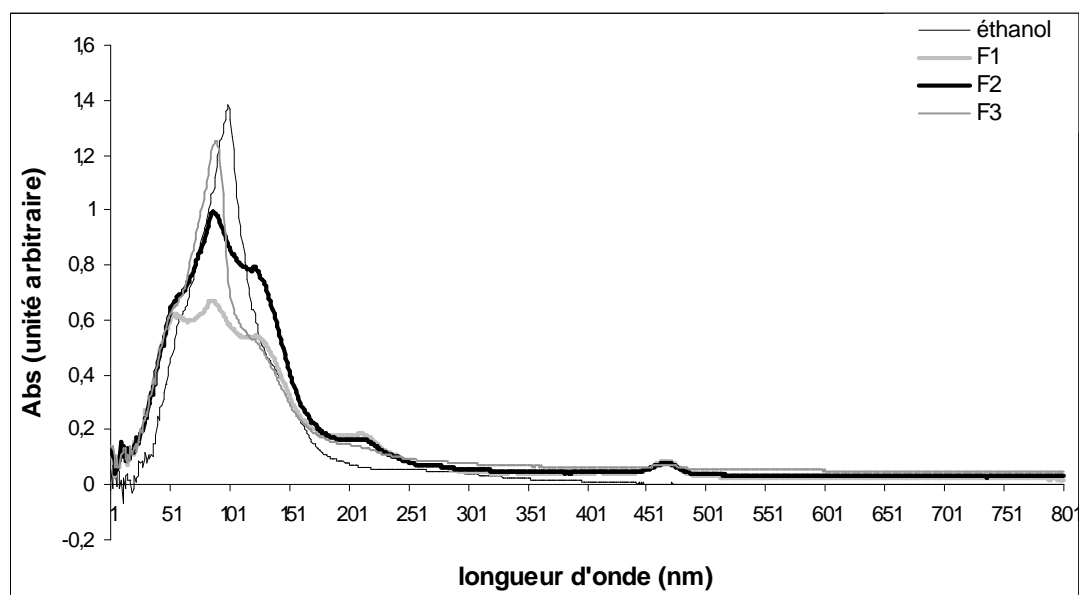


Figure N° 10 : Spectres de balayage de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris* et des fractions chromatographiques F1, F2 et F3.

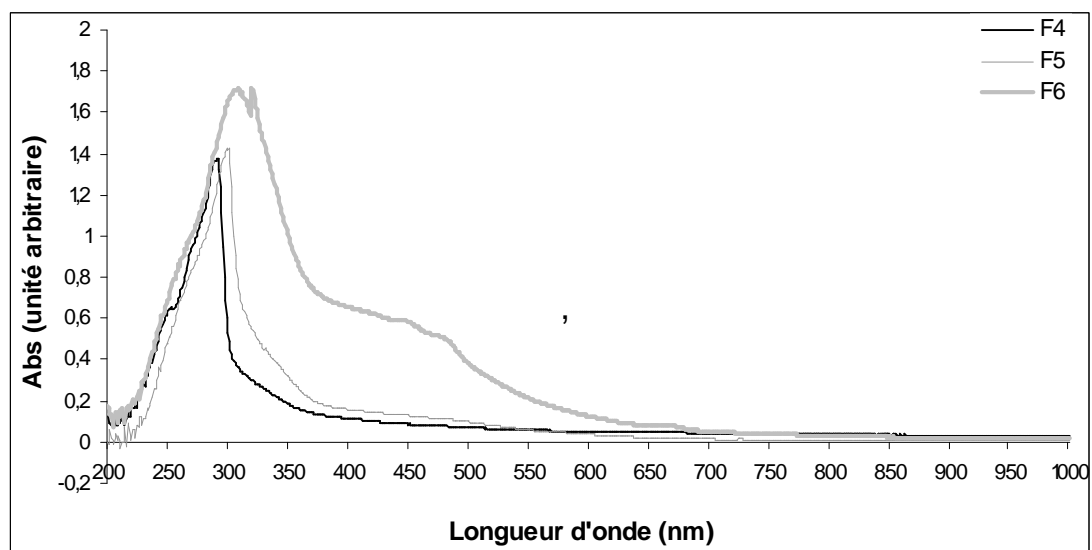


Figure N° 11 : Spectres de balayage des fractions chromatographiques F4, F5 et F6 de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris*.

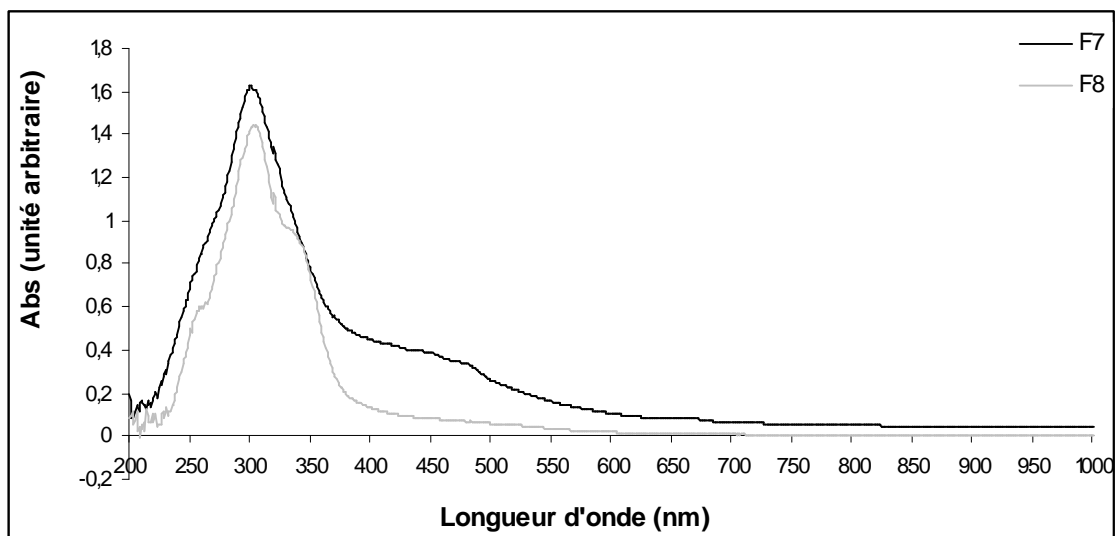


Figure N° 12 : Spectres de balayage des fractions chromatographiques F7 et F8 de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris*.

Résumé

La xanthine oxydase avec d'autres systèmes sont à l'origine de la production de radicaux libres, composés très réactifs dont la surproduction peut être néfaste pour l'organisme. De ce fait, la recherche de molécules naturelles comme les polyphénols capables d'inhiber leurs effets délétères ou de les piéger est devenue un sujet de recherche majeur. Dans la présente étude, les teneurs en polyphénols ainsi que les activités anti-radicalaire et anti-xanthine oxydase de deux plantes médicinales locales, *Ulmus campestris* et *Fraxinus angustifolia*, ont été évaluées. Les résultats montrent que les extraits de *U. campestris* ont exhibé une activité antioxydants supérieure à celle de *F. angustifolia* à 100µg/ml.

La mesure de l'activité antioxydants à différentes concentrations a révélé que les extraits éthanolique et aqueux du chloroforme de *U. campestris* sont doués d'un effet scavenger du radical hydroxyle appréciable, exprimant des IC₅₀ de 152.56 µg/ml et 167.78, respectivement. Quant à l'activité inhibitrice de la peroxydation lipidique, le meilleur effet a été obtenu avec l'extrait d'hexane et son IC₅₀ a été estimée à 281.39 µg/ml.

La caractérisation des extraits des deux plantes par chromatographie sur couche mince nous a révélé leur richesse en composés phénoliques. Ces dernier serait peut être à l'origine des activités anti-radicalaire et anti-xanthine oxydase observées

Mots clés : activité anti-radicalaire, activité anti-xanthine oxydase, antioxydant, *Fraxinus angustifolia*, polyphénols, radicaux libres, *Ulmus campestris*, xanthine oxydase.

Abstract

Xanthine oxydase along with other systems are sources of production of free radicals which are very reactive and can be harmful for the organism. So, the search for natural molecules, such as polyphenols, able to inhibit their noxious effects or to trap them has become a major subject of research. In this study, the polyphenol contents as well as the anti-radical and anti-xanthine oxidase activities of two local medicinal plants, *Ulmus campestris* and *Fraxinus angustifolia*, were evaluated. The results show that *U. campestris* extracts have higher antioxidant activity than that from *F. angustifolia* at 100µg/ml.

The measurement of the antioxidant activity at various concentrations revealed that the ethanolic extract and aqueous extract from chloroform of *U. campestris* are showed an appreciable hydroxyl radical scavenger effect, their IC₅₀ are 152.56 µg/ml and 167.78, respectively. The best inhibitory effect of lipid peroxidation was obtained with hexane extract and its IC₅₀ was estimated at 281.39 µg/ml.

The characterization of *U. campestris* and *F. angustifolia* extracts by thin layer chromatography revealed their wealth in phenolic compounds, which are probably responsible of the anti-ridical and anti-xanthine oxydase activities observed in this study.

Key words: activity anti-ridical, activity anti-xanthine oxidase, antioxidant, *Fraxinus angustifolia*, free radicals, polyphenols, *Ulmus campestris*, xanthine oxydase.

الخلاصة

الكزنتين أوكسيديز (OX) مع نظم أخرى مسؤولة عن إنتاج الجذور الحرة العالية التفاعل والتي قد تكون ضارة للجسم. ولذلك، فإن البحث عن الجزيئات الطبيعية مثل بوليفينول التي يمكن أن تحد من أثارها أصبح من أهم مواضيع البحث حالياً. في هذه الدراسة تم تقييم مستويات بوليفينول و النشاط المضاد للجذور الحرة و الكزنتين أوكسيديز لنبتتين طبييتين، *Ulmus campestris* و *Fraxinus angustifolia*. وأظهرت النتائج أن المستخلص الناتج من *U. campestris* يملك نشاط مضاد للأكسدة عال بالمقارنة مع *F. angustifolia*. قياس النشاط المضاد للأكسدة عند تركيزات مختلفة كشف ان مستخلص الإثانول و المستخلص المائي للكلوروفورم الناتج من *campestris* *U.* يملكان نشاط مضاد لجذر الهيدروكسيل معتبر و قد قدرت IC₅₀ بنحو 152.56 و 167.78 مغ/مل على التوالي، أما بالنسبة للنشاط المضاد لأكسدة اليبيدات، فقد تم الحصول على أفضل النتائج مع مستخلص الهكسين (IC₅₀ = 281.39 مغ/مل). الكروماتوغرافيا كشفت عن تواجد بوليفينول في مستخلصات النبتتين. هذه المركبات قد تكون مسؤولة عن النشاط المضاد للجذور الحرة و الكزنتين أوكسيديز الملاحظ.

الكلمات الرئيسية : الكزنتين أوكسيديز، النشاط المضاد للجذور الحرة، النشاط المضاد للكزنتين أوكسيديز، بوليفينول، مضادات الأكسدة، الجذور الحرة، *Fraxinus angustifolia*، *Ulmus campestris*.