

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE MOHAMMED KHEIDER BISKRA

**FACULTE DES SCIENCES EXACTES ET SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE**

MEMOIRE

Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

EN BIOTECHNOLOGIE

Par

TRABSA HAYAT

PROPRIETES ANTIOXYDANTES ET ACTIVITE INHIBITRICE DE LA XANTHINE OXYDASE DES EXTRAITS DE LA PLANTE MEDICINALE *PEGANUM HARMALA L.*

Présenté le 2011 devant le Jury:

Président:	Pr. ARRAR Lekhmici	Pr., Université de Sétif
Rapporteur:	Pr. BAGHIANI Abderrahmane	Pr., Université de Sétif
Examineurs:	Pr. HARZALLAH Daoud	Pr., Université de Sétif
	Pr. KHENNOUF Seddik	Pr., Université de Sétif

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.

A mes sœurs et frères, et à toute la famille.

A tous mes amis et collègues.

A tous ceux que j'aime.

REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Je voudrais remercier Monsieur BAGHIANI Abderrahmane, Professeur au département de Biologie, Université F.A. de Sétif, pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et son équipe et pour ses conseils très importants durant toute la période de cette recherche. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur ARRAR Leħmici, Professeur au département de Biologie, Université F.A. de Sétif, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de présider mon jury de mémoire, pour sa disponibilité cordiale et ses précieux conseils.

Mes sincère remerciements vont au Dr. KĤNNOUF Seddik et Pr. HARZALLAH Daoud pour avoir accepté de jurer ce travail.

Je remercie tous les responsables de la faculté des sciences exactes et science de la nature et de la vie de l'université de MOHAMMED KĤEIDER BISKRA et aussi de département de la biologie de m'avoir aider et diriger pour réaliser ce travail.

Je ne remercierai jamais assez Maryem, Djamila, Salıha et Moufida pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail, qu'ils trouvent ici le temoingnage de mes remerciements les plus amicaux.

J'adresse également mes remerciements à M^{lle}. BOUDIAF Kaouthar, Chargée de cours à l'université de BATNA et Mme. BOUMERFEG Sabah, Chargée de cours au centre universitaire de Bordj-Bou-Arredj, pour ces conseils pratiques, techniques et scientifiques. Elles restent pour moi un exemple à suivre. Merci !

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

RESUME

Dans le présente travail, l'activité antioxydante des différents extraits préparés à partir des graines de *Peganum harmala* et leur effet inhibiteur vis-à-vis la XO ont évalué. La XO a été purifiée du lait bovin, le PFR est de 5.15, et avec une bande majeure d'environ 150 KDa, en SDS-PAGE, et une activité spécifique de 2055.05 nmol / min / mg protéine. L'analyse des extraits méthanolique (EBr), chloroformique (ECh) et acétate d'éthyle (EAc) a montré que l'ECh représente la fraction la plus riche en polyphénols et flavonoides (66.29 ± 1.57 mg EAG / g d'extrait sec et 13.88 ± 0.13 mg EQ / g d'extrait sec), respectivement, suivi par l'EAc (58.1 ± 1.57 mg EAG / g d'extrait sec et 12.18 ± 0.08 mg EQ / g d'extrait sec), et enfin l'EBr, avec la plus faible teneur (27.91 ± 0.98 mg EAG / g d'extrait sec et 7.39 ± 0.68 mg EQ / g d'extrait sec). L'ECh présente l'inhibition la plus puissante de la XO ($IC_{50} = 0.055 \pm 0.0053$ mg / ml) et la réduction du Cyt c ($IC_{50} = 0.037 \pm 0.0008$ mg / ml), suivi par l'EAc avec des IC_{50} de 0.0057 ± 0.0141 et 0.053 ± 0.0141 mg / ml, respectivement. Enfin, l'EBr possède un faible effet ($IC_{50} = 0.252 \pm 0.0051$ mg / ml et 0.14 ± 0.0051 mg / ml, respectivement). L'EBr possède l'effet scavenger sur le radical DPPH le plus élevé ($IC_{50} = 0,100 \pm 0.0069$ mg / ml), suivi par l'EAc et l'ECh avec des IC_{50} de $0,711 \pm 0,0298$ et $0,744 \pm 0,0198$ mg / ml, respectivement. Dans le test de β -carotène / acide linoléique, les extraits des graines ont une activité antioxydante très importante. Les résultats ont montré que l'activité antioxydante la plus élevée était celle de l'EAc (94.21 ± 0.003 %), suivi par l'EBr et l'ECh avec $86.24 \pm 0.027\%$ et 77.35 ± 0.032 %, respectivement. Le test de la capacité chélatrice des ions ferreux a montré que les extraits EBr, EAc et ECh sont de bons chélateurs avec des IC_{50} de 0.088 ± 0.0008 , 2.256 ± 0.0398 et 5.286 ± 0.0053 mg/ml, respectivement.

Les résultats obtenus suggèrent que ces produits naturels peuvent être utilisés pour traiter les maladies qui nécessitent l'inhibition de la XO, le piégeage des radicaux libres et / ou l'inhibition de la peroxydation lipidique.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقدير التأثير التثبيطي لمستخلصات البذور لنبته الحرمل *Peganum harmala* ، المستعملة كثيرا في الطب الشعبي في الجزائر، على نشاطية الإنزيم المؤكسد ، للكرانثين و خصائصها المضادة للأكسدة. تمت تنقية الإنزيم المؤكسد للكرانثين (XO) من حليب البقر. وقدرت نسبة البروتين إلى الفلافين بـ 5.15، كما أظهرت الهجرة الكهربائية SDS-PAGE شريطا رئيسيا واحدا في حدود 150 كيلودالتن. و قد قدرت نشاطية الإنزيم المنقى بـ 2055.05 نانومول / دقيقة / مغ بروتين. أظهر تحليل المستخلصات (الميثانول الخام، الكلوروفورم و إيثيل الأسيتات) لـ *P.harmala* أن مستخلص الكلوروفورم يحوي أكبر كمية من عديدات الفنول و الفلافونويدات (1.57 ± 66.29 مغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من المستخلص الجاف / 0.13 ± 13.88 مغ مكافئ لـ Quercétine / غ من المستخلص الجاف)، يليه مستخلص إيثيل الأسيتات 1.57 ± 58.1 مغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من المستخلص الجاف/ 0.08 ± 12.18 مغ مكافئ لـ Quercétine / غ من المستخلص الجاف ثم المستخلص الخام (0.98 ± 27.91 مغ مكافئ لحمض الغاليك / غ من المستخلص الجاف / ± 7.39 مغ مكافئ لـ Quercétine / غ من المستخلص الجاف). أبدى مستخلص الكلوروفورم أكبر فعالية على تثبيط كل من إنزيم XO ($IC_{50} = 0.00053 \pm 0.055$ مغ / مل) و إرجاع Cytochrome c ($IC_{50} = 0.037 \pm 0.0008$ مغ / مل)، متبوع بمستخلص إيثيل الأسيتات حيث قدرت IC_{50} بـ 0.0141 ± 0.0057 و 0.0141 ± 0.053 مغ / مل، على الترتيب. أما المستخلص الخام، الذي أبدى تأثيرا ضعيفا ($IC_{50} = 0.252 \pm 0.0051$ مغ / مل 0.14 ± 0.0051 مغ / مل، على الترتيب). أما الفعالية المضادة للأكسدة فقد تم التأكد منها باستعمال طرق غير انزيمية. حيث أبدى المستخلص الخام أحسن تأثير إزاحي لجذر DPPH ($IC_{50} = 0.100 \pm 0.0069$ مغ / مل)، متبوع بكل من مستخلص إيثيل الأسيتات و مستخلص الكلوروفورم حيث كانت قيم IC_{50} لهما هي 0.0298 ± 0.711 و 0.0198 ± 0.744 مغ / مل، على الترتيب. أظهر اختبار بيتا-كاروتين / حمض اللينولييك أن لمستخلصات *P. harmala* نشاطية مضادة للأكسدة جد معتبرة. حيث لوحظ من خلال النتائج أن أعلى نشاطية مضادة للأكسدة سجلت لدى مستخلص إيثيل الأسيتات (94.21 ± 0.003 %) ، متبوع بالمستخلصين الخام و الكلوروفورم بنشاطية تقدر بـ 86.24 ± 0.027 % 77.35 ± 0.032 % ، على الترتيب. بينت طريقة التقاط ايونات الحديد الثنائي بأن المستخلصات الميثانول الخام، إيثيل الأسيتات و الكلوروفورم هي ملتقطات جيدة حيث أعطت القيم التالية على الترتيب 0.008 ± 0.088 ، ± 2.256 و 0.0398 ± 5.286 .

إن النتائج المتحصل عليها تنبئ بإمكانية استعمال هذه المركبات الطبيعية في علاج الأمراض التي تتطلب تثبيط الإنزيم المؤكسد المرجع للكرانثين ، إزاحة الجذور الحرة و / أو تثبيط فوق أكسدة الليبيدات.

ABSTRACT

In this work, we tried to estimate the antioxidant activities and the inhibitory effect on XO activity of various extracts prepared from *Peganum harmala* seeds. XO was purified from fresh bovine milk with yields of 23.21 mg / L, protein / flavine ratio of 5.15 and a single major band, on SDS-PAGE, of approximately 150 KDa. The specific activity of the purified enzyme was of 2055.05 nmol / min / mg protein. The analysis of methanol (CrE), chloroform (ChE) and ethyl acetate (EaE) extracts, showed that the ChE contains the highest amount of polyphenols and flavonoids (66.29 ± 1.57 mg EGA / g dry extract and 13.88 ± 0.13 mg EQ / g dry extract), followed by EaE (58.1 ± 1.57 mg EGA / g dry extract and 12.18 ± 0.08 mg EQ / g dry extract respectively), and CrE with 27.91 ± 0.98 mg EGA / g dry extract and 7.39 ± 0.68 mg EQ / g dry extract. The ChE showed the highest inhibitory properties on the XO activity ($IC_{50} = 0.055 \pm 0.0053$ mg / ml) and on the Cyt c reduction ($IC_{50} = 0.037 \pm 0.0008$ mg / ml), followed by EaE with IC_{50} of XO inhibitory activity and an IC_{50} of the inhibition of Cyt c reduction of 0.0057 ± 0.0141 and 0.053 ± 0.0141 mg / ml, respectively. Finally, CrE had the lowest inhibitory effect on XO activity and on Cyt c reduction with 0.252 ± 0.0051 and 0.14 ± 0.0051 mg / ml, respectively. High DPPH radical scavenging activity was observed with CrE ($IC_{50} = 0,100 \pm 0.0069$ mg / ml), followed by EcE and ChE with IC_{50} of $0,711 \pm 0,0298$ and $0,744 \pm 0,0198$ mg / ml, respectively. The β -carotene / linoleic acid bleaching assay revealed that the extracts have a very important antioxidant activity. EcE has the highest antioxidant activity (94.21 ± 0.003 %), followed by CrE and ChE with 86.24 ± 0.027 % and 77.35 ± 0.032 %, respectively. Ferrous ion chelating capacity assay showed that CrE, EcE and ChE are the most active with IC_{50} of 0.088 ± 0.0008 , 2.256 ± 0.0398 and 5.286 ± 0.0053 mg/ml, respectively. These results suggest that these natural products could be used to treat diseases, where inhibition of XO, free radical scavenging activity and / or inhibition of lipid peroxidation are warranted.

LISTE DES FIGURES

Figure 01. Schéma des différentes formes des radicaux libres.....	04
Figure 02. Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.....	06
Figure 03. A. Structure secondaire de la XOR	13
Figure 03. B. Structure cristalline de l'homodimère de la XOR bovine.....	13
Figure 04. Réactions catalysées par la XOR.....	13
Figure 05. Cheminement des 2 électrons e ⁻ vers l'accepteur final A	16
Figure 06. Le diagramme schématique montrant l'oxydation de xanthine et l'hypoxanthine catalysé par la XOR au site de Mo.....	16
Figure 07. La génération de NO et peroxydrite catalysée par la XOR.....	18
Figure 08. Mécanisme de génération de ROS dans IR.....	20
Figure 09. Mécanisme d'inhibition de la XO par l'allopurinol	21
Figure 10. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.....	23
Figure 11. Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.....	25
Figure 12. Structure de base des flavonoïdes.....	28
Figure 13. La biosynthèse des flavonoïdes.....	31
Figure 14. Réaction des flavonoïdes avec les ROS.....	32
Figure 15. Sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me ⁿ⁺).....	33
Figure 16. Similarités structurales entre la xanthine et les flavonoïdes.....	34
Figure 17. Quelques photos de <i>Peganum harmala</i> et ces graines.....	35
Figure 18. Deux types d'alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i>	37
Figure 19. Etapes de l'extraction des flavonoïdes des graines de <i>Peganum harmala</i> par la méthode de Markham (1982).....	43
Figure 20. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	44
Figure 21. Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine.....	45
Figure 22. Spectre d'absorption UV-Vis (A) et électrophorèse (SDS-PAGE) (B).....	51
Figure 23. Effet inhibiteur des extraits des graines de <i>Peganum harmala</i> sur l'activité de la XO.....	55
Figure 24. Les concentrations des extraits Des graines de <i>Peganum harmala</i> et de l'allopurinol qui inhibent 50 % de l'activité de la XO.....	56
Figure 25. Effet inhibiteur de la réduction du cyt c par l'O ₂ ^{°-} produit par la XO des extraits des graines de <i>Peganum harmala</i>	58
Figure 26. Les concentrations des extraits des graines de <i>Peganum harmala</i> qui inhibent 50 % de l'activité de la XO en comparaison avec celles qui inhibent la réduction de 50 % du Cyt c par l'O ₂ ^{°-} produit par cette enzyme.....	59

Figure 27. La réduction du DPPH par un antioxydant.....	60
Figure 28. Effet scavenger des extraits des graines de <i>Peganum harmala</i> sur le radical DPPH.....	61
Figure 29. IC ₅₀ du radical DPPH des différents extraits des graines de <i>Peganum harmala</i> et des composés phénoliques (Rutine, Quercétine, Acide gallique) avec un standard (BHT).....	62
Figure 30. Activité antioxydante des extraits de <i>Peganum harùala</i> par rapport au BHT, MOH et H ₂ O par le test de β-carotène / acide linoléique.....	64
Figure 31. Activité antioxydante des l'extrait des graines de <i>Peganum harmala</i> et du BHT, MOH et H ₂ O (à 24 h), par le test de β-carotène / acide linoléique.....	65
Figure 32. Activité chélatrice des extraits des graines de <i>Peganum harmala</i>	66
Figure 33. IC ₅₀ d'activité chélatrice des différents extraits des graines de <i>Peganum harmala</i> avec un standard (EDTA).....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les principaux rôles physiologiques des radicaux libres.....	09
Tableau 2: Les principales maladies liées à la production des radicaux libres.....	12
Tableau 3: Classification et structure des flavonoïdes.....	29
Tableau 4: L'activité totale et oxydase de la XOR purifiée à partir du lait bovin frais.....	52
Tableau 5: Le rendement des extraits des graines de <i>Peganum harmala</i> et ses teneurs en polyphénols totaux et en flavonides.....	53
Tableau 6: Les concentrations des extraits des graines de <i>Peganum harmala</i> qui inhibent la réduction de 50 % du Cyt c par l' $O_2^{\circ-}$ produit par la XO.....	59

LISTE DES ABREVIATIONS

AA %	antioxidant activity Percentage
AqE	Aqueous extract
BHT	Butylated hydroxytoluene
BMXO	Bovine milk xanthine oxidase
CAT	Catalase
CBB	Coomassie brillant blue
ChE	Chloroform extract
CrE	Crud extract
Cyt c	cytochrome c
Da	Dalton
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
EAc	Ethyl acetate extract
EaE	Ethyl acetate extract
EAq	Aqueous extract
EBr	Crud extract
ECh	Chloroform extract
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EHx	Hexane extract
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion reductase
HxE	Hexane extract
I %	Inhibition percentage
IL	Interleukine
KDa	Kilodalton
LDL	Low density lipoprotein
LOO[°]	Lipid peroxide radical
MDA	Malondialdehyde
Mo	Molybdene
MOH	Methanol
NOS	Nitric oxide synthase
ONOO⁻	Peroxynitrit
PFR	Protein to flavine ratio
RNS	Reactive nitrogene species

ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotations per minute
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamid gel electrophoresis
SEM	Standard error of the mean
SOD	Superoxyde dismutase
TEMED	N,N,N'N' Tetramethylenediamine
TNF	Tumour necrosis factor
UI	International unit
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
XDH	Xanthine deshydrogenase
XO	Xanthine oxidase
XOR	Xanthine oxidoreductase

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Le stress oxydatif	03
1.1. Les radicaux libres.....	03
1.2. Types des radicaux libres	03
1.3. Sources des radicaux libres	05
1.4. Rôles physiologiques des radicaux libres.....	08
1.5. Principales cibles des radicaux libres.....	09
1.6. Les maladies liées au stress oxydant.....	11
2. La xanthine oxydoréductase	12
2.1. Distribution de la XOR.....	14
2.2. Les formes de la XOR.....	14
2.3. Propriétés de XOR purifiée.....	15
2.4. Rôles physiologiques de la XOR.....	17
2.5. Rôles pathologiques de la XOR.....	18
2.5.1. Rôle de la XOR dans l'inflammation.....	18
2.5.2. Rôle de la XOR dans l'ischémie / réperfusion.....	19
2.6. Les inhibiteurs de la XOR.....	20
2.6.1. Les inhibiteurs analogues de substrats.....	21
2.6.2. Autres inhibiteurs de la XOR.....	21
3. Les antioxydants	22
3.1. Antioxydants enzymatiques.....	23
3.1.1. Le Superoxyde dismutase (SOD).....	23
3.1.2. La Catalase (CAT).....	24
3.1.3. La Glutathion peroxydase (GPx) et la Glutathion réductase (GR).....	24
3.2. Antioxydants non enzymatiques.....	25
3.2.1. La vitamine C (acide ascorbique).....	25
3.2.2. La vitamine E (α -tocophérol)	25
3.2.3. Les caroténoïdes.....	26
3.2.4. Les polyphénols.....	26

4. Les polyphénols	26
4.1. Les acides phénoliques.....	27
4.2. Les tannins.....	27
4.3. Les flavonoïdes.....	27
4.3.1. Structure chimique et biosynthèse des flavonoïdes.....	28
4.3.2. Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes	30
5. Flavonoïdes et radicaux libres	32
5.1. L'activité antioxydante des flavonoïdes	32
5.2. Chélation des ions métalliques	33
5.3. Inhibition de la xanthine oxydase	34
6. La plante médicinale <i>Peganum harmala</i> L.	35
6.1. Description de la plante.....	35
6.2. Nomenclature de la plante.....	35
6.3. Distribution géographique	36
6.4. Constituants chimique de la plante.....	36
6.5. Utilisation traditionnelle de la plante	37

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel	38
1.1. Matériel biologique.....	38
1.2. Réactifs chimiques et matériel instrumental.....	38
2. Méthodes	38
2.1. Purification de la xanthine oxydase.....	38
2.2. Contrôle de pureté de la XO.....	40
2.3. Estimation de l'activité enzymatique de la XO.....	41
2.4. Extraction des flavonoïdes des graines de <i>Peganum harmala</i>	41
2.5. Dosage des polyphénols totaux.....	44
2.6. Dosage des flavonoïdes.....	45
2.7. Inhibition de l'activité de la xanthine oxydase par les extraits de <i>P. harmala</i>	45
2.8. Effet scavenger des extraits de <i>P. harmala</i> sur le superoxyde produit par la XO.....	46
2.9. Propriétés antioxydantes des extraits des graines de <i>P. harmala</i>	48

2.9.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits des graines de <i>P. harmala</i> par la méthode de DPPH (effet scavenger).....	47
2.9.2. Test de β -carotène / acide linoléique.....	48
2.9.2. Test de Chélation du fer ferreux	48
2.10. Analyse statistique.....	49

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Purification, contrôle de pureté et estimation de l'activité de la xanthine oxydase.....	50
2. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	52
3. Inhibition de la xanthine oxydase par les extraits de <i>P. harmala</i>	54
4. Effet scavenger des extraits de <i>P. harmala</i> sur l' $O_2^{\circ-}$ produit par la XO.....	56
5. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits de <i>P. harmala</i> par la méthode de DPPH (effet scavenger).....	60
6. Test de β -carotène / acide linoléique.....	63
7. Test de Chélation du fer ferreux	65

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....69

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....72

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances à activités biologiques et pharmacologiques très variées. En effet l'organisation mondiale de la santé estime que plus de vingt milles espèces végétales à travers le monde sont utilisées comme produits médicinaux pour faire face à plusieurs mécanismes destructeurs essentiellement le stress oxydant.

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre dans la balance pro-oxydants / antioxydants, que se soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux libres. Ces derniers sont impliqués dans plusieurs pathologies humaines allant de l'inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardio-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde, et le diabète. En plus de leur action directe en réagissant avec la plupart des macromolécules, en particulier les espèces oxygénées réactives (réactive oxygen species ; ROS) réagissent, comme seconds messagers dans l'expression génétique et la signalisation moléculaire. Les ROS sont bien connus pour leur rôle double comme espèces bénéfiques et destructives. La cellule tente de se défendre contre les ROS par les systèmes enzymatiques et par les piègeurs de radicaux libres. Avec la NADPH oxydase des neutrophiles polynucléaires et la xanthine oxydoréductase (XOR) représentent les deux sources majeures endogènes génératrices des ROS.

Les risques et les effets néfastes potentiels des antioxydants synthétiques, utilisés comme additifs alimentaires, ont été soulevées au cours des dernières années et la nécessité de les substituer par des additifs naturels est apparente.

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ces composés bioactifs ont montré des activités antioxydantes où ils agissent comme des inhibiteurs des enzymes, des piègeurs des ROS, des inhibiteurs de la peroxydation lipidique, des chélateurs des traces métalliques responsables de la production

des ROS et rentre dans des mécanismes de la protection des systèmes de défense antioxydants. Les flavonoïdes sont donc à l'origine des effets thérapeutiques des plantes. L'extraction de ces molécules à partir des plantes et l'étude de leurs effets biologiques ont occupé beaucoup d'intérêt de plusieurs chercheurs dans le monde.

Peganum harmala, connue sous le nom commun Harmel, est largement utilisée dans les régions semi arides et particulièrement dans l'Est Algérien. Malgré son utilisation très vaste dans la médecine traditionnelle, *Peganum harmala* reste très peu étudiée et spécialement dans la lutte contre le stress oxydant.

L'objectif de ce présent travail consiste à extraire les différents composés actifs de *Peganum harmala* L., leurs dosages et l'étude de leurs effets antioxydants. Pour montrer l'activité antioxydante de notre plante, on a choisi de tester sa capacité d'inhiber la xanthine oxydase (XO) comme une source génératrice des radicaux libres, son effet scavenger sur le superoxyde d'oxygène généré par cette enzyme et d'autres radicaux.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Stress oxydant

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes (Sorg, 2004).

1. 1. Les radicaux libres

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire l'énergie en oxydant la matière organique. Mais les cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques: les radicaux libres (Favier, 2003). Un radical libre est une espèce chimique possédant, sur sa couche externe, un ou plusieurs électrons célibataires (Zweier and Hassan Talukder, 2006). La présence de cet électron lui confère une certaine instabilité et haute réactivité (demi-vie courte) (Afanas'ev, 2009). Ces radicaux peuvent être dérivés de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) ou d'autres atomes comme l'azote (Reactive Nitrogen Species : RNS) (Favier, 2003). Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rapatrier leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). L'espèce agressée devient à son tour radicalaire initiant de cette façon un processus de réaction en chaîne qui se caractérise par trois étapes ; **(i)** initiation, **(ii)** propagation et **(iii)** terminaison provoquant enfin une perturbation de la cellule vivante (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

1. 2. Différentes formes de radicaux libres et leurs dérivées

Les radicaux libres sont regroupés en deux catégories l'une est dite radicaux primaires qui joue un rôle particulier en physiologie et l'autre dite radicaux secondaires qui se forme par

réaction des radicaux primaires avec des composés biochimiques de la cellule (Favier, 2003), et d'autre classification basé sur le type de radical en donnant deux groupes principales ;

1. 2. 1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Plusieurs réactions biologiques impliquent l'oxydation de substrats où l'accepteur d'électrons est l'oxygène moléculaire (O_2). Ces types de réactions sont catalysés par un groupe d'enzymes métalloprotéiques appelées "oxydases". Plus de 90%, de l'oxygène consommé par les cellules est catalytiquement réduit par quatre électrons pour produire deux molécules d'eau. Cependant, l' O_2 peut être réduit par moins de quatre électrons, par certaines oxydases, donnant ainsi naissance à des espèces oxygénées partiellement réduites et hautement réactives appelées espèces réactives de l'oxygène ou reactive oxygen species (ROS) (Taniyama *et al.*, 2003). Comme la figure 1 montre, les espèces réactives de l'oxygène regroupent : (i) Les radicaux libres de l'oxygène comme le superoxyde d'oxygène ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). (ii) Les dérivés oxygénés non radicalaires qui peuvent être des précurseurs de radicaux tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulier (1O_2) (Garait, 2006).

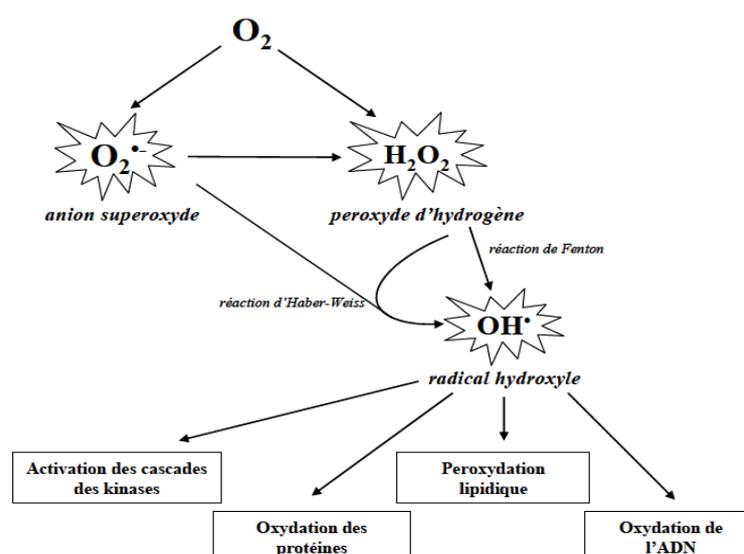


Figure 1: Schéma des différentes formes des radicaux libres (Garait, 2006).

1. 2. 2. Les espèces réactives de l'Azote (RNS)

Le radical de monoxyde d'azote (NO^\bullet) se forme par l'oxydation de L-arginine sous l'action de l'enzyme nitric oxide synthase (NOS), ce radical peut se convertir en d'autres RNS tel que le cation nitrosonium (NO^+), anion nitrosonium (NO^-) et le peroxyneutre (ONOO^-) (Dröge, 2002).

La génération spontanée de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de radical NO^\bullet favorise la formation de peroxyneutre qui est un produit très toxique (Beckman *et al.*, 1998).



L' ONOO^- se transforme en radical nitrosyle (ONOOH), ce dernier se décompose en OH^\bullet et en dioxyde d'azote (NO_2^\bullet) (Lum and Roebuck, 2001).

1.3. Sources des radicaux libres

1. 3. 1. Sources endogènes

La chaîne respiratoire mitochondriale constitue une source majeure des ROS dans les systèmes biologiques (Takimoto *et al.*, 2007). Elle produirait en effet 90 % des ROS cellulaires. Il existe deux sites de production de ROS (**Figure 2**) : les complexes I et III (Balaban *et al.*, 2005). Le complexe NADH-ubiquinone oxydoréductase et l'ubiquinone-cytochrome c réductase sont alors d'importants complexes membranaires mitochondriaux qui peuvent générer de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de H_2O_2 (Zhang and Gutterman, 2007).

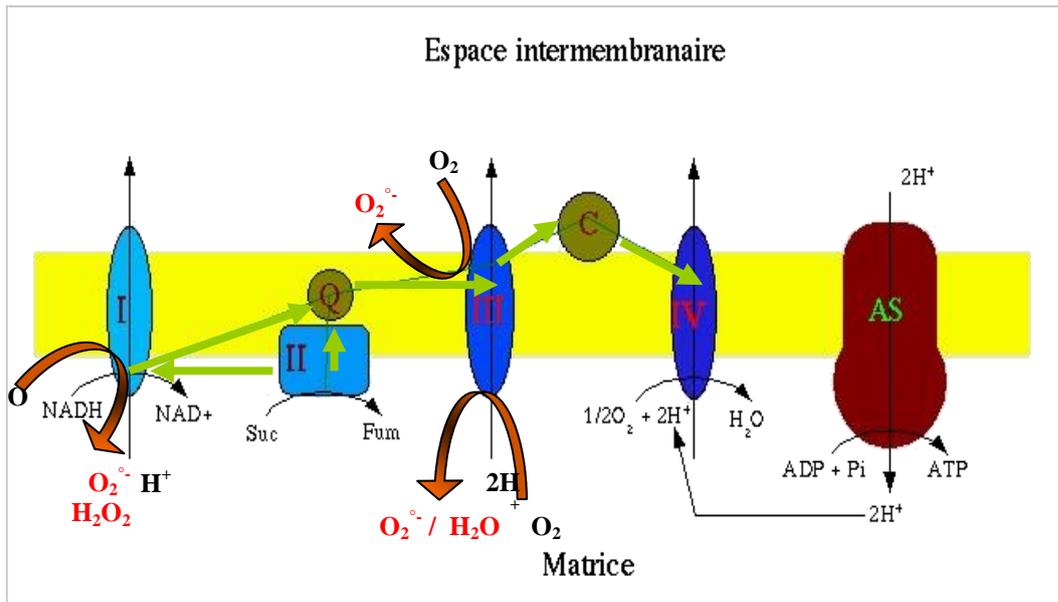


Figure 2: Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Cadenas and Davies, 2000).

Le peroxysome contient de nombreuses enzymes générant du H_2O_2 , ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale pour réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats, qui sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein (Belviranli and Gökbel, 2006).



La xanthine oxydase (XO) est une enzyme qui utilise l'oxygène moléculaire comme un accepteur d'électrons en produisant l'anion superoxyde au cours de la réaction d'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Harrison, 2002).

Xanthine oxydase

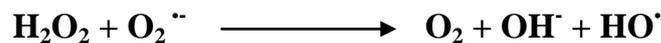


NADPH oxydase (NADPHO) est une hémoprotéine joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire. Elle se trouve dans différents types cellulaires; les cellules phagocytaires, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules de muscles lisses

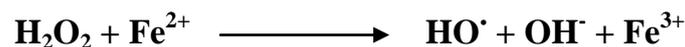
(Dröge, 2002). Lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d'une grande quantité de l' $O_2^{\cdot-}$ et ses dérivés (Krause, 2004). La NADPH oxydase des cellules non phagocytaires, produise aussi des radicaux libres en quantité plus faible, (1/3 des ROS phagocytaires), comme des régulateurs des cascades de signalisation intracellulaires (Cai, 2005).



La dismutation de $O_2^{\cdot-}$ spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeure de H_2O_2 . De plus, le H_2O_2 est aussi produit *in vivo* par différentes oxydases, incluant les aminoacides oxydases est la xanthine oxydase. Le H_2O_2 n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs (Afanas'ev, 2009). Le H_2O_2 peut être réduit suivant la réaction d'Haber-Weiss engendrant alors un ion OH^- inoffensif et un radical hydroxyle HO^{\cdot} plus agressif :



Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. En revanche, la réaction de Fenton, qui nécessite l'intervention d'ions Fe^{2+} , se produit *in vivo* (Afanas'ev, 2009). Elle met en jeu la capacité du peroxyde d'hydrogène à oxyder des composés aromatiques en présence de fer:



Le radical hydroxyle a une demi-vie extrêmement courte et une capacité à diffuser restreinte. Il peut réagir avec un certain nombre de molécules comme les lipides organiques en enlevant ou en ajoutant une molécule d'hydrogène sur les liaisons insaturées (Favier, 2003).

Les lipooxygénases présentent aussi une source importante de production de ROS dans les parois vasculaires, ces enzymes catalysent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) ou des acides gras estérifiés comme les esters de cholestérol et celles trouvées dans les phospholipides pour donner des dérivés d'acides gras hydroperoxydes toxiques pour la cellule (Madamanchi, 2005).

Nitric Oxide Synthase (NOS) générateur important du radical monoxyde d'azote (NO[•]), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Le NO[•] permet la production des autres RNS tel que le peroxyde ONOO (Favier, 2003).

1. 3. 2. Sources exogènes

Les organismes vivants sont exposés à une large variété de ROS de sources non métaboliques exogènes. Les rayonnements, qu'ils soient X ou γ , peuvent par différents mécanismes faire apparaître des radicaux libres en scindant la molécule d'eau en deux radicaux. Les rayonnements ultraviolets sont capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet (Beani, 1995).

Les polluants de l'air, comme la fumée des cigarettes et les contaminants industriels, constituent une source importante de ROS, ils attaquent et causent des dommages dans l'organisme que ce soit par interaction directe avec la peau ou après inhalation dans les poumons (Afanas'ev, 2009).

Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides, etc...) et médicaments (antibiotiques, anticancéreux, etc...) peuvent contribuer à la production des ROS qui se forment comme un des produits de leur métabolisme *in vivo* (Martínez-Cayuela, 1995).

1. 4. Rôles physiologiques des radicaux libres

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

Tableau 1: Les principaux rôles physiologiques des radicaux libres.

Espèce	Quelques rôles physiologiques
NO [•]	<ul style="list-style-type: none">- Relaxation des muscles lisses ;- Autres fonctions GMPc dépendantes (modulation des fonctions des protéines kinases, phosphodiésterases, et des canaux ioniques) ;- Activation des MAPK des cellules endothéliales et monocytes ;- Protection contre l'apoptose par inhibition de certaines caspases.
O ₂ ^{•-} et dérivés	<ul style="list-style-type: none">- Transduction du signal ;- Relaxation du muscle lisse ;- Activation du NF-κB responsable de l'expression du gène de l'IL-2 ;- Activation de la protéine kinase C ;- Amélioration des fonctions immunologiques par amplification du signal intracellulaire dans les lymphocytes T ;- Induction de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales ;- Induction et exécution du phénomène d'apoptose ;- Induction de l'expression de la p21 ; inhibiteur du cycle cellulaire.
¹ O ₂	<ul style="list-style-type: none">- Amélioration des fonctions immunologiques des lymphocytes.

1. 5. Principales cibles des ROS

Le stress oxydatif conduit à des dommages cellulaires et tissulaires souvent irréversible, les cibles biologiques susceptibles aux attaques radicalaires sont les lipides, les protéines et les acides désoxyribonucléiques (Finkel and Holbrook, 2000).

Les lipides, principalement leurs acides gras polyinsaturés, sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, c'est la peroxydation lipidique. Le radical formé (R[•]) subit un réarrangement interne dû au déplacement de la double liaison la plus proche de l'électron célibataire. La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés

fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète. La peroxydation lipidique aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques. Parmi ces dérivés, le MDA (malondialdéhyde) qui a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et qui diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et est lui-même mutagène (Favier, 2003).

Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires dont le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, et la cystéine soient particulièrement les plus sensibles aux ROS (Dröge, 2002). Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) (Stocker and Keaney, 2004), dont le site actif contient le groupement Fe-S sont également très sensibles à l'inactivation par l' $O_2^{\cdot-}$ (Beckman and Ames, 1998), les modifications structurales des protéines et/ou l'altération de la fonction sont les conséquences majeures (Beckman and Ames, 1998). Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuscines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Schnackenberg, 2002).

Les ADNs nucléaires et mitochondriaux sont très sensibles à l'attaque des ROS (Favier, 2003), les bases composant l'ADN, particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation par les radicaux libres (Cuzzocrea, 2001). L'attaque radicalaire se manifeste soit directement en entraînant l'oxydation des bases et engendrant un grand nombre de bases modifiées, soit elle cible la liaison entre la base et le désoxyribose créant un site abasique, soit cible le sucre lui-même créant une coupure de simple brin (Beckman and Ames, 1998). Le radical NO^{\cdot} et leur dérivés tels que $NO_2^{\cdot-}$, $ONOO^{\cdot-}$, N_2O_3 et HNO_2 sont des agents mutagènes et ont la capacité d'introduire plusieurs modifications sur les bases d'ADN par des réactions de nitration, nitrosation, et désamination (Cuzzocrea, 2001). [Les dommages](#) d'ADN ont comme

conséquence une transcription réduite d'ARNm et, en conséquence, une perte de fonction des biomolécules protéiques (Madamanchi, 2005).

1. 6. Les maladies liées au stress oxydant

En raison de leur réactivité élevée, les radicaux libres interagissent avec toute une série de substrats biologiques conduisant à l'altération de l'homéostasie cellulaire de l'organisme. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine de phénomènes du stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution est maintenant largement démontré (Favier, 2003). En fait, de nombreuses études, tant épidémiologiques que cliniques, indiquent que le stress oxydant est potentiellement impliqué dans le développement de plus d'une centaine de pathologies humaines différentes (Pincemail *et al.*, 2002) allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (**Tableau 2**). Le rôle du stress oxydant a été également évoqué même dans des processus physiologiques tel que le vieillissement (Sorg, 2004 ; Valko *et al.*, 2007).

La multiplicité des conséquences médicales de ce stress n'a rien de surprenant car, selon les maladies, celui-ci se localisera à un tissu et à des types cellulaires particuliers, mettra en jeu des espèces radicalaires différentes et sera associé à d'autres facteurs variables et à des anomalies génétiques spécifiques à chaque individu. De plus, La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (Valko *et al.*, 2007).

Tableau 2: Les principales maladies liées à la production des radicaux libres.

<i>Pathologie</i>	<i>Référence</i>
Arthrite rhumatoïde	(Ahsan <i>et al.</i> , 2003)
Athérosclérose	(Harrison et al, 2003)
Cancer	(Hussain <i>et al.</i> , 2003)
Diabète	(Faure and Bonnefont-Rousselot, 2005)
Hypertension	(Touyz, 2004)
Inflammation	(Yoshikawa and Naito, 2000)
Lésions de reperfusion post-ischémique	(Zweier and Talukder, 2006)
Maladies auto-immunes	(Halliwell and Gutteridge, 1999)
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg, 2004)
Vieillesse	(Ferrari, 2001)

2. La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdo-flavo-protéique, qui a été identifié pour la première fois dans le lait bovin (Harrison 2004). La forme active de cette enzyme se produit comme un homo dimère approximativement du 290 kDa (Pacher *et al.*, 2006). Chaque sous unité contient quatre centres redox, le domaine N-terminale présente deux sites Fe_2S_2 (29KDa), le domaine intermédiaire contient une FAD (40KDa) et le domaine C-terminale contient le cofacteur de molybdène (Mo-Co) (85KDa) (Harrison, 2002). Chacune des sous unités contient son propre site actif mais les monomères ne sont pas indépendamment actifs (Parks and Granger, 1986). La figure 3 représente la structure secondaire de la XOR, obtenue par étude protéolytique, et cristalline obtenue par diffraction aux rayons X.

La XOR se synthétise sous forme appelée la Xanthine déshydrogénase (XDH) qui peut convertir en Xanthine oxydase (XO), ces deux forme ayant le même gène et les mêmes principaux domaines avec un changement structural (Pacher *et al.*, 2006).

Le gène codant pour la XOR humain est de 60 kb, il comporte 36 exons, et il est situé sur le bras court du chromosome 2 dans la bande p22. L'ARNm contient une armature ouverte de lecture de 3999 Pb codant pour 1333 acides aminés (Berry *et al.*, 2004).

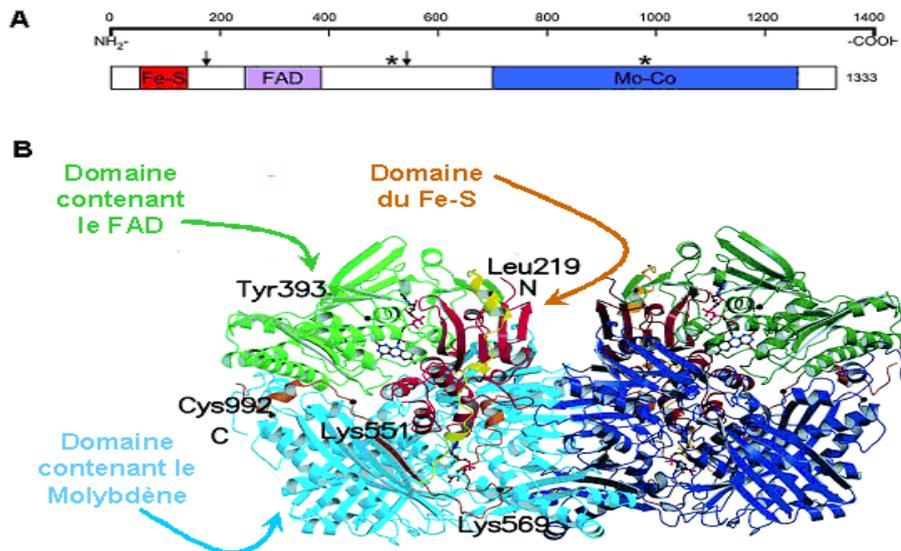


Figure 3: **A.** Structure secondaire de la XOR ; les flèches indiquent les sites de protéolyse par la trypsine et les étoiles indiquent les résidus cystéines modifiés lors de la conversion réversible de la XOR (Cys535, Cys992) (Berry and Hare, 2004). **B.** Structure cristalline de l'homodimère de la XOR bovine ; les domaines identiques des deux sous unités sont représentés par les mêmes couleurs (claires pour le monomère à gauche, et plus foncées pour celui à droite) : en rouge le domaine du Fe-S (résidus 3-165), en vert le domaine contenant le FAD (résidus 226-531) et en bleu le domaine contenant le molybdène (résidus 590-1331) (Pacher *et al.*, 2006).

Les XOR catalysent la dégradation des bases puriques, Il s'agit d'oxydations par l'oxygène fourni par H₂O (**Figure 4**), au cours desquelles deux électrons sont transférés vers un accepteur qui peut être: le NADP⁺ (cas normal) ou l'oxygène moléculaire O₂: il se forme alors de l'anion superoxyde (Vorbachl *et al.*, 2003).

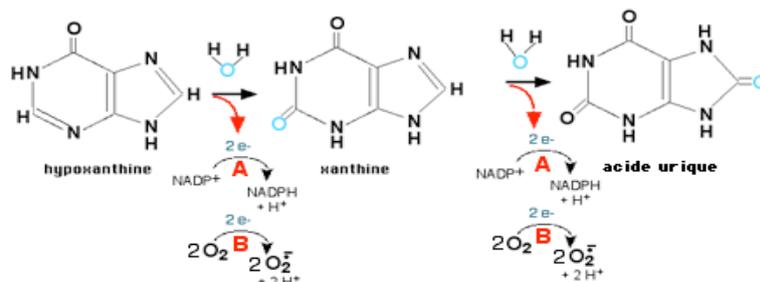


Figure 4: Réactions catalysées par la XOR (Kuwabara *et al.*, 2003).

2. 1. Distribution

L'activité du XOR a été détectée dans toutes les espèces examinées, y compris les bactéries. Dans les tissus des mammifères, l'activité de cette enzyme est largement distribuée, avec les niveaux les plus élevés étant trouvés dans le foie et l'intestin (Pacher *et al.*, 2006). Chez l'homme, mis à part le foie et l'intestin, la plupart des tissus montrent peu d'activité de XOR (Harrison, 2004). L'enzyme est un élément protéique important de la membrane de globule gras du lait (MFGM) (Harrison, 2002). La distribution cellulaire de XOR est légèrement spécialisée, avec des concentrations relativement élevées étant trouvées en cellules épithéliales et endothéliales (Harrison, 2004). La XOR a été détecté principalement dans les hépatocytes et des cellules de Kupfer du foie, dans les anthérocytes et des cellules de gobelet de jejunum, et dans la glande mammaire (Meneshion *et al.*, 2002). Hellsten Westing a détecté la XOR dans les macrophages humains (DeJong *et al.*, 2000). Le plus intéressant, c'est les cellules épithéliales ont été fortement marquées, en particulier vers la région apicale, donc ces cellules impliquant la sécrétion de XOR dans la bile (Martin *et al.*, 2004).

2. 2. Les formes de XOR

La XOR se trouve sous deux formes ; active et inactive. Il y a deux formes actives interchangeableables pourtant fonctionnellement distinctes : la xanthine déshydrogénase (XDH, EC 1.1.1.204), qui prédomine *in vivo* ; et la xanthine oxydase (XO, EC 1.1.3.22) qui résulte après des modifications post traductionnel, qui est vue aux concentrations élevées dans certaines conditions physiologiques et pathophysiologiques. Ces formes peuvent être inter converser réversiblement par des réactifs de sulfure par exemple le DTT (dithiothreitol; Cleland's reagent) qui fait la réduction de groupement thiol ou irréversiblement (XDH à XO) par la protéolyse (Nishino *et al.*, 2005). La XDH réduit préférentiellement le NAD⁺ et l'oxygène, tandis que la XO ne peut pas réduire le NAD⁺, préférant l'oxygène moléculaire.

Donc la XDH, utilise NADP⁺ comme accepteur des 2 électrons provenant de la purine oxydée, tandis que la XO transfère ces 2 e⁻ à 2 molécules O₂. La réduction de l'oxygène moléculaire par l'une ou l'autre forme d'enzymes donne le super oxyde et le peroxyde d'hydrogène. La XDH est la forme qui prédomine dans le catabolisme de purine ayant pour résultat la synthèse de l'acide urique (antioxydant) (Ginger *et al.*, 2004).

Pas moins de 60% de XOR de lait de bovin sont inactif pour les substrats réducteurs conventionnels tels que la xanthine. Cette enzyme "inactive" se compose de deux formes. Démolybdo -XOR manque de Mo (probablement aussi Molybdopterin) et constitue généralement environ 40% de l'enzyme totale, alors qu'environ 30–40% de l'enzyme restante contient le Mo sont un désulfo-XOR, dans lequel le groupe Mo=S, essentiel pour l'activité catalytique, est remplacé par Mo=O. En comparaison avec les centres redox du XOR le Mo-Co et Fe-S, le manque naturel en FAD (déflavo c'est aussi une forme inactive) n'a pas été décrit jusqu'ici (Harrison, 2004).

2. 3. Propriétés de XOR purifiée

La forme la mieux caractérisée de XOR est celle purifiée du lait bovin. La XOR a été également purifiée du foie du rat, du poulet, et des glandes mammaires des souris. Tandis que ces dernières sont moins caractérisées que cela du lait de bovin, mais leurs propriétés sont généralement semblables. Les xanthine oxydoréductases sont des associations protéiques complexes comprenant :

1. Le site actif, ou molybdoptérine, où un atome de molybdène est fixé par deux atomes de soufre. Le molybdène coordonne une molécule d'eau dont l'oxygène, par réaction nucléophile, se fixe sur le site approprié de l'hypoxanthine ou de la xanthine. Le molybdène enlève deux électrons au système purine / eau qui se détache alors du site actif (Kuwabara *et al.*, 2003).



Pour continuer sa fonction catalytique, le molybdène perd deux électrons qui vont être repris par la chaîne de transport et acheminés vers l'accepteur final (McManaman *et al.*, 2002).

2. La chaîne de transport d'électrons : est assurée par deux protéines à fer et à soufre, puis par une molécule de FAD, selon le schéma de la figure 5 (Ginger *et al.*, 2004).

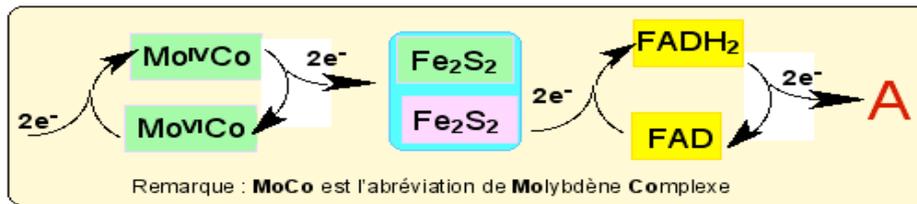


Figure 5: Cheminement des 2 électrons e- vers l'accepteur final A. Celui-ci peut-être soit NADP+, soit O2 (Ginger *et al.*, 2004).

En plus d'hypo xanthine et de xanthine, la XOR catalyse l'hydroxylation des substrats N-hétérocycliques et aldéhydiques. Il peut également agir comme une oxydase de NADH. Comme la figure 6 montre, la plupart des substrats réduits agissent au site Mo bien que, uniquement, le NADH donne ses électrons aux FAD. Après une rapide équilibration entre les centres redox, les électrons sont habituellement passés de FAD au NAD+ ou à l'oxygène moléculaire (Harrison, 2004).

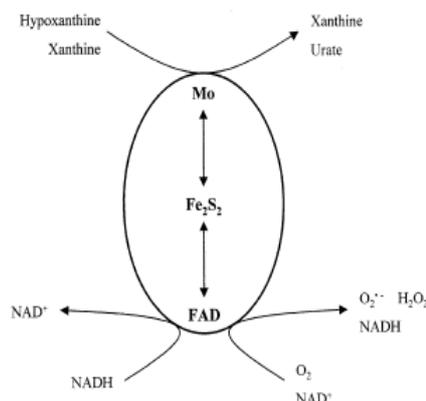


Figure 6: Le diagramme schématisé montrant l'oxydation de xanthine et l'hypoxanthine (caractérisant la plupart des substrats réducteurs) catalysée par la XOR au site de Mo, et du NADH au site FAD. La réduction de NAD+ ou d'oxygène moléculaire a lieu au centre FAD (Harrison, 2002).

La XOR catalyse la réduction de nitrates et nitrites aux nitrites et l'oxyde nitrique (NO), respectivement. Les nitrites et les nitrates inorganiques acceptent des électrons à partir le site Mo, contrairement aux nitrates organiques sont réduits au centre FAD (Harrison, 2004).

2. 4. Rôles physiologiques de la XOR

La XOR est considérée comme un médiateur d'accouplement entre la gouttelette lipidique et la membrane plasmique apicale servant d'envelopper les globules gras du lait pendant la sécrétion (McManaman *et al.*, 2002). Ce rôle de XOR dépend de sa structure protéique et non de son activité enzymatique (Vorbach1 *et al.*, 2003).

Les réactions métaboliques de XOR donnent une protection cellulaire contre les composants toxiques. Parmi les produits les plus importants se trouve l'acide urique et les radicaux libres via ces substances la XOR peut participer dans l'amplification de réaction inflammatoire. (Varbachl *et al.*, 2003).

L'expression de XOR est généralement haute dans les cellules épithéliales intestinales et la bile, donc cette enzyme est considérée comme une barrière avec un rôle antimicrobienne résultant de la génération du ROS, du superoxyde, et du peroxyde d'hydrogène (Closa and Folch-Puy, 2004). Dans des conditions hypoxiques, la XOR catalyse la réduction de nitrite inorganique à l'oxyde nitrique (NO), une molécule de signalisation avec des propriétés bactéricides. D'ailleurs, si l'oxygène est présent, également il est réduit, formant le superoxyde, lequel réagit rapidement avec le NO pour donner le peroxynitrite (**Figure 7**), un agent bactéricide plus efficace (Martin *et al.*, 2004).

Les ROS générés par la XOR ont été également impliquées dans l'activation du système de complément, et aussi impliqué dans le foie pour la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (Chinnaiyon, 2001), et aussi impliquée dans la phagocytose pour la destruction des microbes pathogènes (Anderson, 2001).

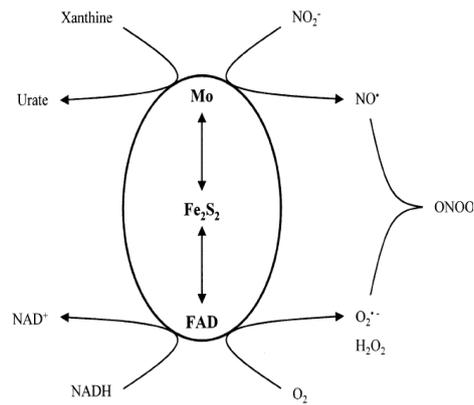


Figure 7: La génération de NO et peroxyinitrite catalysée par la XOR (Harrison, 2002).

L'acide urique agit comme un antioxydant efficace des radicaux libres, et il est nécessaires pour protéger la cellule contre le stress oxydant provoqué par nombreux ROS et RNS naturel, donc il est considéré comme un effecteur anti-inflammatoire et aussi avait des fonctions protectrices dans le corps (Nagler, 2002). La XOR est également impliquée dans la défense antivirale en catalysant la conversion du rétinaldéhyde en acide rétinoïque. Les dérivés de cet acide peuvent inhiber la réplication virale empêchant ainsi la propagation de l'infection (Taibi *et al.*, 2001).

2. 5. Rôles pathologique de la XOR

2. 5. 1. Roles de XOR dans l'inflammation

L'inflammation est une réaction physiologique de défense contre les invasions externes mais elle peut s'amplifier d'une manière incontrôlable conduisant à l'apparition de différents désordres et maladies inflammatoires. Les études montraient que l'allopurinol (inhibiteur de la XOR) contribue au blocage de la réaction inflammatoire pathologique qui suggère que la XOR est contribué à l'inflammation pathologique (Richard *et al.*, 2007).

Les ROS produits par la XOR peuvent également réagir avec les composés de la membrane cellulaire, pour produire des lipides chimioattractants des neutrophiles amplifiant ainsi la réponse inflammatoire (Perez *et al.*, 1990). De même, ces ROS peuvent induire

l'expression des molécules de surface responsables de l'adhésion des leucocytes aux cellules de l'endothélium vasculaire et leur migration trans-endothéliale vers le site de l'inflammation (Conner and Grisham, 1996).

Dans l'arthrite rhumatoïde, la XOR amplifie l'inflammation synoviale conduisant à l'érosion de l'os et la propagation de la maladie ainsi qu'au développement de complications tels que les inflammations vasculaires (Blake *et al.*, 1997), en plus la XOR provoque la lésion myocardique (Harisson, 2002).

2. 5. 2. Rôle de XOR dans l'ischémie réperfusion (IR)

La XOR joue un rôle principal dans des dommages (IRS) d'ischémie réperfusion, pendant l'ischémie, le statut d'énergie de la cellule tombe et les gradients de transmembrane décomposent. Ceci mène à une élévation des niveaux du calcium intracellulaire, qui active une protéase qui convertit la XDH, prédominant *in vivo*, à la XO. Simultanément, des purines sont catabolisées et l'hypoxanthine s'accumule. Pendant la réperfusion, l'oxygène est encore disponible et, en présence du XO et d'hypoxanthine, est réduit au peroxyde d'hydrogène et au superoxyde (Martin *et al.*, 2004), une accumulation profonde du neutrophile se produit dans les tissus post-ischémiques, commençant immédiatement au début de la réperfusion, les ROS produit par la XO pourrait déclencher l'accumulation, l'activation, et la diapédèse des neutrophiles, avec des dommages inflammatoires microvasculaires négociés par neutrophile conséquente, menant finalement au dysfonctionnement parenchymal d'organe (**Figure 8**) (Meneshion *et al.*, 2002).

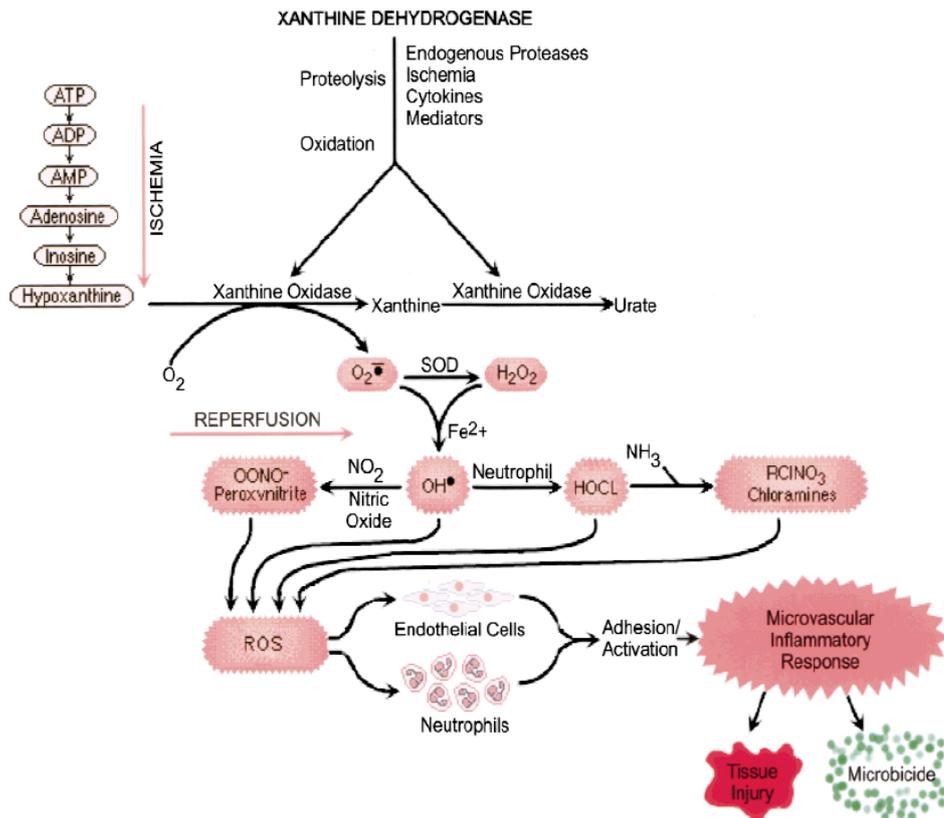


Figure 8: Mécanisme de génération de ROS dans IR (Meneshion *et al.*, 2002).

2. 6. Inhibiteurs de XOR

Depuis la découverte de la XOR, datant de plus de cent ans, les recherches sur sa biochimie et son rôle n'ont cessé de se développer, la recherche de ses inhibiteurs avait une très grande importance pour comprendre sa structure, son mécanisme d'action, et pour pouvoir intervenir dans les désordres pathologiques dans les quels cette enzyme est impliquée. Les inhibiteurs de la XOR sont de natures très variées, leurs mécanismes d'inhibition sont différents et dépendent de la nature de l'inhibiteur. Les inhibiteurs de la XOR sont divisés en deux catégories majeures; **(i)** analogues de substrats puriniques et **(ii)** molécules n'ayant aucune relation structurale avec les substrats biologiques de l'enzyme (Hille and Massey, 1981).

2. 6. 1. Analogues de substrats

Ce groupe renferme les pyrazolo-[3,4-d] pyrimidines (dont le plus important est l'allopurinol), les ptérines (comme le 6-ptéridylaldéhyde) et certains hétérocycles aromatiques (Hille et Massey, 1981). L'inhibiteur le plus important de la XOR est sans doute l'allopurinol (1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-one). L'allopurinol (isoester de l'hypoxanthine) est oxydé par la XOR en oxypurinol (isoester de la xanthine) (**Figure 9**), ce dernier ayant une affinité très élevée à l'enzyme réduite (Mo^{IV}) et forme avec elle un complexe très étroit (Massey *et al.*, 1970). L'allopurinol est utilisé pour le traitement de quelques maladies pour diminué le niveau de l'acide urique (Borges *et al.*, 2002).

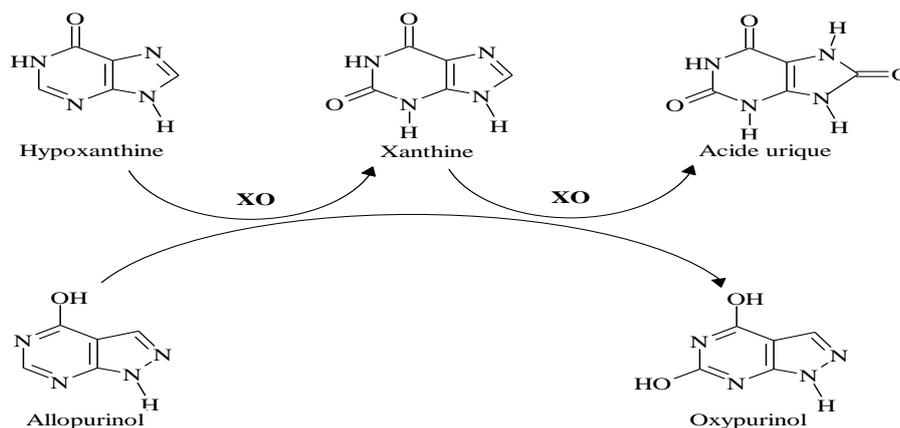


Figure 9: Mécanisme d'inhibition de la XO par l'allopurinol (Borges *et al.*, 2002).

2. 6. 2. Autres inhibiteurs de la XO

L'inhibition de la XOR par le cyanure résulte de la libération du soufre catalytiquement essentiel du centre molybdène sous forme de thiocyanate donnant naissance à la forme desulfo inactive de l'enzyme (Hille and Massey, 1981). Le monoxyde d'azote (NO) présente un model similaire d'inhibition par son interaction avec un soufre essentiel dans le centre Molybdène de l'enzyme réduite produisant également la forme inactive desulfo (Ichimori *et al.*, 1999). L'arsénite, à son tour, inactive la XOR par son interaction avec le molybdène en

bloquant le flux d'électrons du centre molybdène vers les centres Fe/S et FAD (Stewart *et al.*, 1984).

Un autre mécanisme d'inhibition de la XOR est représenté par les ions métalliques (Cu^{2+} , Hg^{2+} et Ag^{2+}) qui inhibent l'enzyme d'une manière non compétitive (Mondal *et al.*, 2000) ; l'interaction de ces ions avec l'enzyme affecte considérablement le potentiel de réduction du centre FAD altérant ainsi la fixation du substrat oxydant.

Le TEI-6720 (acide 2-(3-cyano-4-isobutoxyphenyl)4-méthyl-5-thiazole-carboxylique), un nouvel inhibiteur synthétique de la XOR, exerce une inhibition de type mixte, il se fixe très étroitement aux deux formes active et desulfo inactive de l'enzyme (Okamoto *et al.*, 2003). La structure cristalline du complexe XOR-TEI-6720 montre la molécule inhibitrice liée à un canal étroit conduisant au site Mo actif de l'enzyme. Cet inhibiteur remplit le canal et l'environnement immédiat du cofacteur Mo inhibant très efficacement l'activité de la XOR par une simple obstruction de la fixation du substrat (Okamoto *et al.*, 2003).

Un groupe très important et largement étudié des inhibiteurs de la XOR renferme les composés naturels isolés des plantes, ces inhibiteurs sont très variés et ont un très grand intérêt en thérapeutique, tel que les flavonoïdes et les polyphénols.

3. Les antioxydants

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des ROS est particulièrement fragile. La production des ROS est strictement régulée par notre organisme qui a développé des moyens de défense antioxydants de protection contre les effets potentiellement destructeurs des ROS. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure 10**). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (Goudable and Favier, 1997).

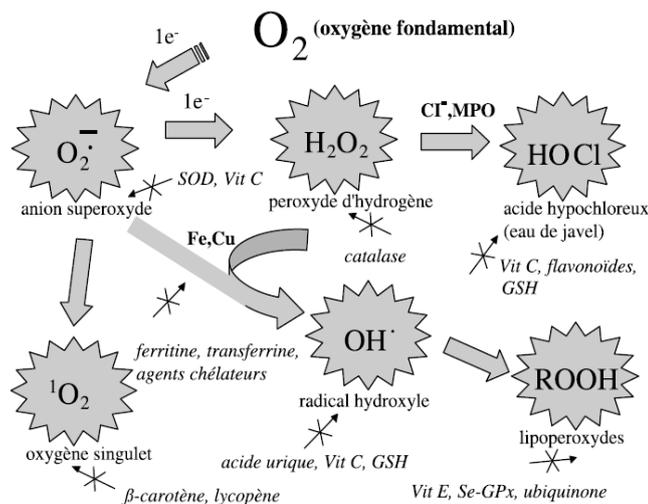


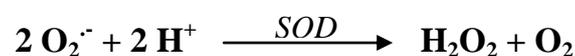
Figure 10: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (D'après Pincemail *et al.*, 2002).

3.1. Antioxydants enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes ; (i) La superoxyde dismutase (SOD), (ii) La catalase (CAT) et (iii) La glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $l'O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

3.1.1. Le Superoxyde dismutase (SOD)

SOD est une enzyme primaire essentielle qui réagit contre les produits toxiques de métabolisme cellulaire, et catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 (Seib *et al.*, 2006).



Cette enzyme existe sous trois formes selon leur localisation et leur cofacteur métallique: une forme cytosolique et nucléaire associées aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) (Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001; Comhair and Erzurum, 2002). La forme Cu/Zn-SOD se trouve aussi dans les peroxysomes et dans l'espace intermembranaire mitochondriales (Warner *et al.*, 2004).

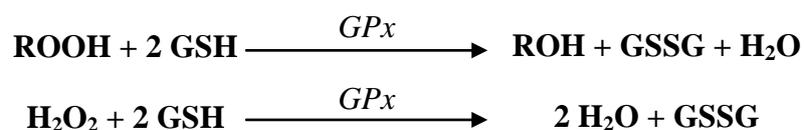
3.1.2. La Catalase (CAT)

La catalase se trouve dans les hématies et dans les peroxysomes de nombreux tissus et cellules, et il avait une grande affinité à son substrat (Kohen and Nyska, 2002), est une enzyme qui catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Stocker and Keaney, 2004).



3.1.3. La Glutathion peroxydase (GPx) et la Glutathion réductase (GR)

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries (Sorg, 2004). La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 et la réduction de divers hydroperoxydes lipidiques. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion disulfure (GSSG) (Ahmad, 1995). Le glutathion disulfure (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) utilisant le NADPH comme donneur d'électron (Ahmad, 1995; Mates *et al.*, 1999).



Au total, le mécanisme réactionnel des enzymes antioxydants peut être résumé dans le schéma suivant:

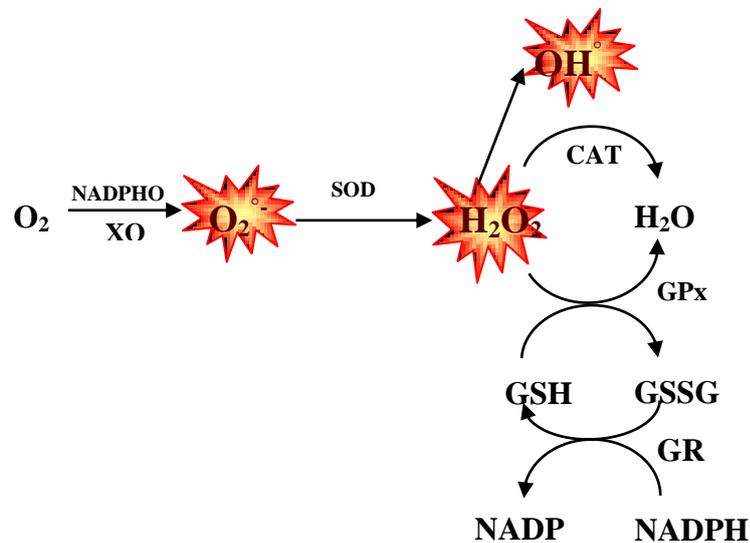


Figure 11: Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (D'après Favier, 2006).

3. 2. Antioxydants non enzymatiques

3. 2. 1. La vitamine C

La Vit C est hydrosoluble et localisé dans le cytosol et le fluide extracellulaire, elle capte directement l' $O_2^{\bullet-}$ et l' OH^{\bullet} (Comhair and Erzurum, 2002). Elle empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase) (Cuzzocrea *et al.*, 2001). Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Evans, 2000).

3. 2. 2. La vitamine E

Les formes naturelles de cette vitamine sont quatre isomères de tocophérol, α , β , γ et δ , avec une activité antioxydante variable (Ricciarelli, 2001). La forme α est la plus active, elle est liposoluble et se fixe à la membrane cellulaire et inhibe la chaîne de réactions de peroxydation des lipides en capturant un radical lipidique peroxyde (LOO^{\bullet}). Elle devient à son

tour un radical moins actif que le LOO° et pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Evans, 2000).

3. 2. 3. Les caroténoïdes

Ce sont des pigments liposolubles jaunes, orangée à rouge, synthétisés par les plantes et les microorganismes. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (Cuzzocrea *et al.*, 2001).

3. 2. 4. Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal, ont des propriétés antioxydantes, et en particulier la classe des flavonoïdes. Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ROS comme la xanthine oxydase (Curtay and Robin, 2000).

4. Les polyphénols

Les « polyphénols » ou « composés phénoliques » constituent un des groupe le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, divisées 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 (OH) (Vermerris and Nicholson, 2006). Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta *et al.* 2005).

3.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont contenus dans certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová *et al.*, 2003). Parmi les acides phénoliques on trouve: l'acide caféique, l'acide protocatechique, l'acide ferulique, l'acide sinapique et l'acide gallique (Hale, 2003). Ils ont plusieurs effets par exemple antioxydants et anti-inflammatoires (Psotová *et al.*, 2003). Il existe des acides phénoliques anticancéreux tel que: l'acide férulique et l'acide caféique qui empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris, et l'acide gallique qui inhibe la formation du cancer oesophagien chez les rats (Hale, 2003).

4. 2. Les tannins

Les tannins sont des polyphénols polaires du poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique (Cowan, 1999). Ils peuvent avoir plusieurs activités biologiques dont l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antifongique, antitumorale, antivirale et antidiarrhéique (Bruneton, 1999). Les tannins sont subdivisés en deux classes différentes, largement distribuées chez les végétaux supérieurs: (i) Tannins hydrolysables qui sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique (acide gallique, dans le cas des tanins galliques, ou acide hexahydroxydiphénique (HHDP), dans le cas des tannins ellagiques). (ii) Tannins condensés qui sont formés par la condensation des unités flavan-3-ols et flavan-3-4-diols (Vermerris and Nicholson, 2006).

4. 3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires, presque toujours hydrosolubles. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux et sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils sont largement abondants dans les légumes, les feuilles (salade, choux, épinards, etc), et aussi dans les téguments externes des fruits (Lawson,

2006). Les flavonoïdes ont plusieurs rôles tels que la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (Hadi, 2004), et aussi un rôle dans la défense des plantes contre les micro-organismes pathogènes (Bovy, 2004).

4. 3. 1. Structure chimique, classification et biosynthèse

Tous les flavonoïdes possèdent un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par une chaîne en C3 (**Figure 12**), et le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone (Vermerris and Nicholson, 2006).

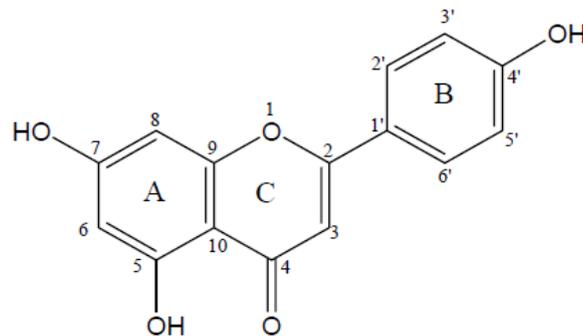


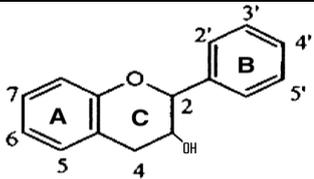
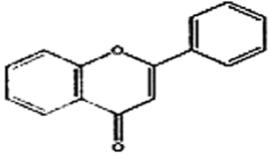
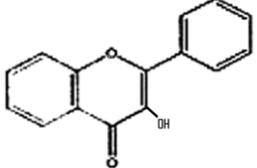
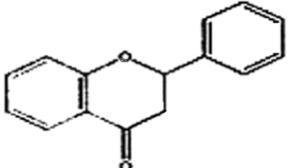
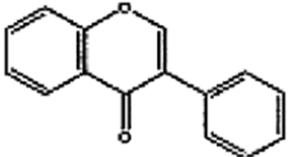
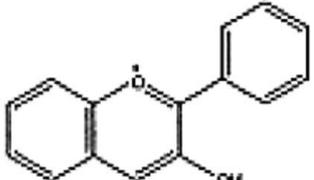
Figure 12: Structure de base des flavonoïdes (Vermerris and Nicholson, 2006).

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés (**Tableau 3**); flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim *et al.*, 2002; Hendrich, 2006).

Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres. . .) sur les deux cycles aromatiques A et B (Heim *et al.*, 2002). Dans les flavonoïdes au sens strict, le deuxième cycle benzène (B) se lie à l'hétérocycle (C) en position 2. Lorsque la liaison s'effectue en position 3, les composés résultants sont appelés isoflavonoïdes. En plus, l'hétérocycle (C) peut être

une pyrone (flavone) ou son dihydrodérivé (flavanone). La fixation d'un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone 3 dans les deux cas précédents constitue respectivement les flavonols et les flavanonols (Birt *et al.*, 2001). À l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone ou génine, l'unité glycosidique la plus commune est le glucose mais par fois elle peut être glucorhamnose, galactose, arabinose ou rhamnose (Heim *et al.*, 2002).

Tableau 3: Classification et structure des flavonoïdes (D'après Heim *et al.*, 2002).

Classe	Structure générale	Flavonoïde	Substituant
Flavanol		catéchine epicatéchine	3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH
Flavone		chrysine apigénine rutine luteoline	5,7-OH 5, 7, 4'-OH 5, 7, 3', 4'-OH, 3- rutinose 5, 7, 3', 4'-OH
Flavonole		kaempferole quercétine myricétine tamarixétine	3, 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH 3, 5, 7, 3'-OH, 4-OMe
Flavanone (dihydroflavone)		naringène naringénine taxifoline	5,4'-OH, 7-rhamnoglucose 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH
Isoflavone		genistéine genisteine daidzéine daidzine	5, 4'-OH, 7-glucose 5, 7, 4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7, 4'-OH
Anthocyanidines		apigénidine cyanidine	5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 4'-OH, 3, 5- OMe

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'tétrahydrochalcone (**Figure 13**). Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1): naringénine. Cette chalcone peut également se cycliser en aurone. La flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase agit ensuite sur la flavanone pour donner la flavone (2): apigénine ou le dihydroflavonol (3): dihydrokaempférol, respectivement. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4): kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5): leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols (6) et anthocyanidols (7). Le pélargonidol (7), sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8): pélargonidol-3-glucoside (Bruneton, 1999).

4. 3. 2. Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce (Vermerris and Nicholson, 2006). Ces molécules sont trouvés dans les fruits, les légumes, les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé et le vin rouge. Ils sont consommés régulièrement avec l'alimentation humaine qui nous apporte environ 75 mg de flavonoïdes par jour. En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes, les flavanols et les flavonols y seraient les plus abondants (Schewe and Sies, 2003).

La majorité des flavonoïdes apportés par l'alimentation sont sous forme glycosylée, ils peuvent occasionnellement y être présents sous forme aglycone (Ishii et *al.*, 2003). La plus part des flavonoïdes aglycones sont hydrophobes et peuvent donc traverser passivement les membranes biologiques. Alors que la liaison d'un groupement glucidique à un composé phénolique diminue son hydrophobicité et limite sévèrement sa diffusion passive (Williamson

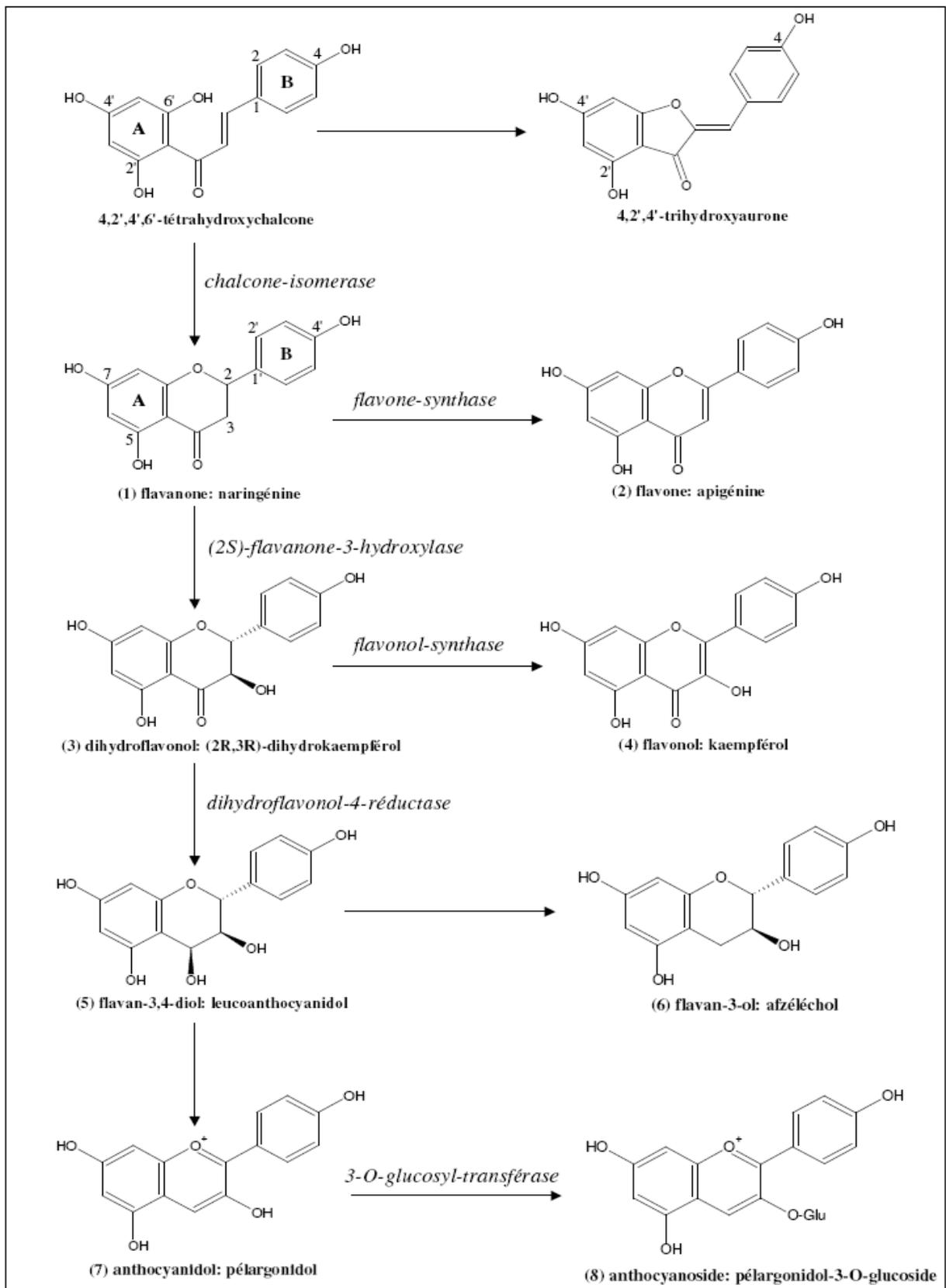


Figure 13: La biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

et *al.*, 2000). Il semblait alors que l'absorption des flavonoïdes glycosylés ne pouvait pas avoir lieu au niveau de l'intestin grêle. Cependant, Hallman et ses collaborateurs (1995 et 1997) ont montré chez l'Homme que l'absorption des formes glycosylées de la quercétine administrées oralement étaient plus importantes (52%) que celle de la quercétine aglycone (24%). Ces auteurs ont alors suggéré que la partie glucidique associée aux flavonoïdes facilite leur passage dans les entérocytes *via* le système de transport des glucides (Hallman *et al.*, 1997).

5. Flavonoïdes et radicaux libres

5. 1. L'activité antioxydante des flavonoïdes

Les flavonoïdes expriment les propriétés antioxydantes par : (i) Le piégeage direct des ROS. (ii) La suppression de la formation des ROS par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques impliqués dans la production des ROS via les réactions de Fenton et Haber Weiss. (iii) La protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (Cotelle, 2001). A cause de leur faible potentiel redox (Javanovic *et al.*, 1994), les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermo-dynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^\bullet) comme le superoxyde, le radical peroxyde, le radical alkoxyde et le radical hydroxyle par transfert d'hydrogène (McCord, 1995): $\text{Flav-OH} + R^\bullet \longrightarrow \text{Flav-O}^\bullet + \text{RH}$

Comme montrer la figure 14 le radical aroxyde résultant (Flav- O $^\bullet$) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (Pietta, 2000).

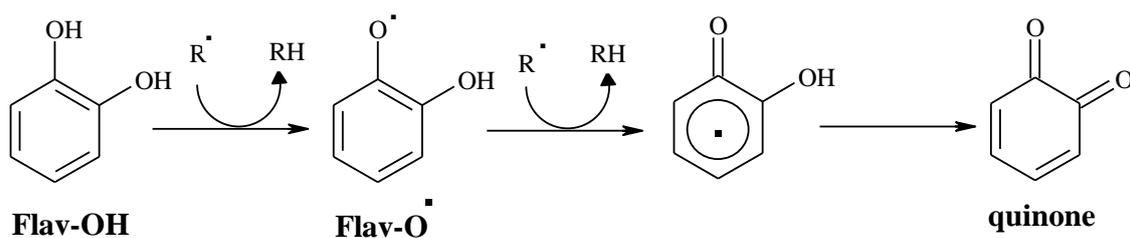


Figure 14: Réaction des flavonoïdes avec les ROS (Pietta, 2000).

Le radical aroxyde peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction qui peut prendre place en présence de taux élevés de métaux de transition, est responsable de l'effet prooxydant indésirable des flavonoïdes (McCord, 1995). La capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend donc, non seulement du potentiel redox du couple Flav- O[•]/Flav-OH, mais aussi de la réactivité du radical aroxyde.

5. 2. Chélation des ions métalliques

Les flavonoïdes sont considérés également comme de bons chélateurs des ions métalliques responsables de la production du radical hydroxyle par la réaction de Fenton et Haber-Weiss (Van Acker *et al.*, 1996). L'effet antioxydant des flavonoïdes par la chélation de plusieurs métaux tels que Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ et Mg²⁺ (Heim *et al.*, 2002). Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont les suivants; un noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles C et A (Moridani *et al.*, 2003) (**Figure 15**).

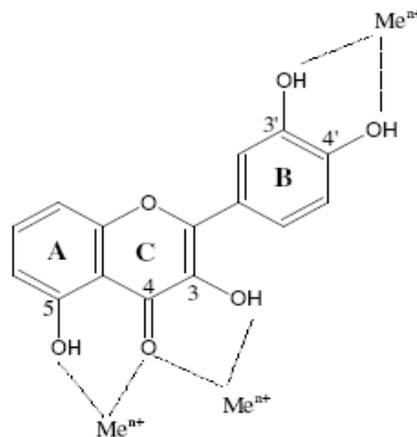


Figure 15: Sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Meⁿ⁺) (Van Acker *et al.*, 1996).

5. 3. Inhibition de la xanthine oxydase

Depuis 1968, quand McCord et Fridovich ont démontré la participation de la XO dans la génération des radicaux libres qui provoquent plusieurs maladies. Depuis l'utilisation de

l'allopurinol dans le traitement de la goutte et de l'hyperuricémie, aucun autre médicament n'a été développé. Les recherches de nouveaux inhibiteurs dépourvus d'effets indésirables sont toujours en cours. Les composés phénoliques d'origine naturelle, comme les flavonoïdes, semblent être des inhibiteurs prometteurs de la xanthine oxydase.

Des études menées sur l'inhibition de la XO par les flavonoïdes ont montré théoriquement l'existence de similarités structurales et électroniques (potentiel électrostatique négatif) entre le cycle A des flavonoïdes et le noyau purinique de l'hypoxanthine, la xanthine et l'acide urique (**Figure 16**) (Lin *et al.*, 2000 ; Rastelli *et al.*, 1997).

Cos et ses collaborateurs (1998) ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production de l'acide urique par la XO. Ils ont ainsi déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la XO. Ces chercheurs ont montré que seuls les flavonols et les flavones ont la capacité d'inactiver l'enzyme, ceci montre l'importance de la double liaison C2-C3 dans l'inhibition de la XO. Ils ont aussi montré que le cycle B n'a que peu d'influence sur cette inhibition pour les flavones, et que les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés (exemple de la quercétine qui est dix fois plus active que la rutine ; son analogue glycosylé en C3).

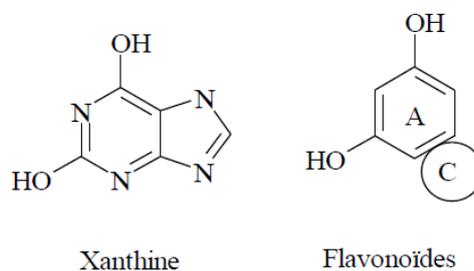


Figure 16: Similarités structurales entre la xanthine et les flavonoïdes (Cotelle, 2001).

6. La plante médicinale *Peganum harmala* L.

6.1. Description de la plante

L'harmel est une plante herbacée, vivace, glabre, buissonnante de 30 à 90 cm de hauteur à rhizome épais, à odeur forte, désagréable qui rappelle celle de la rue. Les tiges dressées, très rameuses disparaissent l'hiver; elles portent des feuilles alternes, découpées en lanières étroites. Les fleurs solitaires, assez grandes (25 à 30 mm), d'un blanc-jaunâtre veinées de vert. Les graines: nombreuses, petites, anguleuses, subtriangulaires, de couleur marron foncé, dont le tégument externe est réticulé, ont une saveur amère; on les récolte en été, le tégument externe de la graine renferme un pigment rouge connu sous le nom de "Turkey red". Cette plante développe surtout dans les zones arides, sur les sols sableux et légèrement nitrés (Iserin, 2001).



Figure 17: Quelques photos de *Peganum harmala* et ces graines.

6.2. Nomenclature de la plante

Peganum harmala appartient à la famille des Zygophyllaceae, genre *Peganum* et l'espèce *harmala*. Les noms commun de *Peganum harmala* : Harmel; Armel; L'Harmel (au Maghreb); Bender tiffin en Tamachek (Touareg); Rue sauvage; Rue verte; Pégane (en France); Harmel Sahari (en Algérie); Bizr el harmel (en Égypte).

6.3. Distribution géographique

Elle est largement distribuée à travers le monde, généralement dans la zone méditerranéenne surtout dans les zones sèche en Europe comme l'Espagne, la Russie, Hongrie, en Afrique (Maroc oriental, Sahara septentrional et hauts plateaux Algériens, Tunisie, steppes de la Lybie, déserts d'Égypte), et en Asie, elle est répandue dans les steppes de l'Iran, du Pakistan, du Turkestan jusqu'au Tibet et en Sibérie (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1980).

6.4. Constituants chimiques de la plante

Parmi les constituants de cette plante ; acides aminés (phénylalanine, valine, proline, thréonine, histidine, acide glutamique), flavonoïdes, coumarines, bases volatiles, tanins, stéroïdes/triterpènes (Al Yahya, 1986).

Des alcaloïdes qui ont un taux beaucoup plus élevé dans la graine (3 à 4 %) que dans la racine, la tige (0,36 %) et la feuille (0,52 %), parmi les alcaloïdes trouvés dans la *Peganum harmala* : Harmane ($C_{12} H_{10} N_2$), Harmaline ($C_{13} H_{14} N_2$), Harmine ($C_{13} H_{12} N_2$) et Harmalol ($C_{12} H_{12} N_2$). La teneur en alcaloïdes s'élève brusquement en été, durant la phase de mûrissement du fruit, au moment de la récolte de la graine. L'harmaline est un méthoxy-harmalol et une dihydroharmine, elle constitue les 2/3 des alcaloïdes totaux de la graine (Tahrouch *et al.*, 2002).

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Matériel biologique

Les graines de *Peganum harmala* (Harmel) ont été récoltées à l'été de 2009 de la région de N'Gaous, Batna. Le lait bovin frais a été obtenu d'une ferme des environs de Batna.

1.2. Réactifs chimiques et matériel instrumental

Plusieurs réactifs chimiques ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , EthyleneDiamine Tetraacetic Acid (EDTA), Dithiothreitol (DTT), NaCl, NaOH, bicine, sulfate d'ammonium, Sodium Dodecyl Sulphate (SDS), gel d'héparine-agarose, xanthine, allopurinol, cytochrome c, quercétine, rutine, acide gallique, AlCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, FeCl_3 , FeCl_2 , Ferrozine, gomme arabique, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[°]), β -carotène, acide linoléique, Butylated HydroxyToluene (BHT) et Tween 40, Bleu de Coomassie Brillant (CBB) G250, Acrylamide, Bis-acrylamide, Bleu brillant R250, glycine, proviennent tous de Sigma-Aldrich, les autres réactifs et solvants (méthanol, n-butanol, n-hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, acide phosphorique et acide acétique) ont été obtenus de Prolabo.

Parmi l'appareillage utilisé: rotavapeur (BÜCHI), centrifugeuse 3-K30 (Sigma), 1601 Shimadzu spectrophotomètre et le spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (Techcomp).

2. Méthodes

2.1. Purification de la xanthine oxydase

La purification de la xanthine oxydase du lait bovin (BMXO) a été réalisée selon la méthode de Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée par Baghiani *et al.* (2003).

Le lait bovin a été centrifugé à 5000 rpm pendant 20 minutes, la crème flottante a été dissoute dans un volume double de phosphate de potassium (K_2HPO_4 , 0.2 M) contenant 1 mM d'EDTA et 5 mM de DTT. Le mélange a été soumis à une agitation douce pendant 2 heures puis centrifugée à 6000 rpm pendant 20min. Le surnageant récupéré a été filtré sur laine de verre et additionné progressivement de 15 % (V/V) du butanol froid (-20 °C) et de sulfate d'ammonium 15 % (P/V), sous agitation douce pendant 1 heure, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 20 min.

Après filtration du surnageant sur laine de verre, la XO a été précipitée par ajout progressif de sulfate d'ammonium 20 % (P/V), sous agitation douce pendant 1 heure et 30 min, puis centrifugation à 11000 rpm pendant 30 min. Le précipité (couche supérieure brunâtre) a été récupéré doucement et resuspendu dans un petit volume de tampon héparine (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 25 mM, contenant 1 mM d'EDTA, pH 6.2), et dialysé contre ce même tampon pendant une nuit sous agitation. Afin d'éliminer les impuretés insolubles, le dialysat a été centrifugé à 18000 rpm pendant 60 min. Après filtration à travers un filtre de 45 µm de diamètre, le produit final constitue l'extrait brut de la XO.

L'extrait brut obtenu a été déposé sur une colonne chromatographique contenant un gel d'héparine-agarose équilibré et lavée par le tampon héparine. La colonne a été ensuite lavée par le même tampon renfermant 0.1 M de NaCl. La XO a été récupérée de la colonne par le tampon héparine contenant 0.2 M de NaCl, et dialysée contre un tampon Bicine 50 mM, pH 8.3, pendant une nuit. Enfin, l'enzyme a été répartie en aliquotes de 0.5 ml et conservée à -20 °C jusqu'à son utilisation. La colonne a été régénérée par lavage avec une solution de NaCl 1 M puis avec le tampon héparine pour une nouvelle utilisation, toutes les étapes ont été effectuées à 4 °C.

2.2. Contrôle de pureté de la XO

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

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970); le gel de séparation (10 % d'acrylamide et 2.74 % de bis-acrylamide) a été préparé dans un tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1 % de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.042 % de N,N,N'N' Tetramethylene diamine (TEMED) (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Le gel de concentration a été préparé dans le même tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1% de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.1% de TEMED (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Les échantillons (XO, environ 1 mg / ml) ainsi que les standards des poids moléculaires (1 mg / ml) ont été préparés dans une solution échantillon constituée d'un tampon Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), 2 % de SDS (P/V), 20 % de glycérol (V/V) et 0.005 % de bleu de bromophénol (P/V). Ensuite, ils ont été chauffés à 100 °C pendant 5 minutes. Les standards des poids moléculaires (Sigma) utilisés sont de 29000 Da à 205000 Da.

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

acétique (V/V), 45 % de méthanol (V/V) dans de l'eau distillée. Le gel a été ensuite décoloré par une solution d'acide acétique 5-10 % (V/V).

2.3. Estimation de l'activité enzymatique de la XO

L'activité totale de la XOR a été estimée en suivant l'augmentation de la production de l'acide urique à 295 nm, en présence de 100 µM de xanthine comme substrat de l'enzyme et 500 µM de NAD⁺ comme accepteur d'électrons dissous dans un tampon Na-Bicine à pH 8.3 (Avis et al., 1956). L'activité de la forme oxydase a été mesurée par la même méthode mais en absence de NAD⁺:

L'activité enzymatique totale = l'activité de la forme O – l'activité de la forme D

L'activité enzymatique a été exprimé en nombre de nano mole d'acide urique produit dans une minute par milligramme de l'enzyme (nmols / min / mg de protéine).

2.4. Extraction des flavonoïdes de *Peganum harmala* L.

Les graines de *Peganum harmala* sont bien nettoyées et séchées à température ambiante et à l'ombre pendant quelques jours, ensuite broyées à l'aide d'un mortier.

L'extraction des polyphénols est effectuée selon la méthode décrite par Markham (1982), en utilisant des solvants organiques à polarité croissante. Le broyat (100g) est additionné au 1 litre méthanol / eau (85% méthanol et 15% eau distillée), le mélange est soumis à une agitation pendant une nuit à 4°C, puis laissé reposer quelques heures. Le mélange est par la suite filtré sur la laine de verre puis sur le verre fritté (entonnoir N°03), le filtrat est conservé à 4°C alors que le précipité est soumis à une deuxième extraction en suivant le même protocole avec un litre de méthanol/eau (V/V). Le deuxième filtrat est mélangé avec le premier. Le mélange a été filtré pour la dernière fois sur papier filtre et soumis à une évaporation rotative à 40 °C dans un rotavapor (BÜCHI) pour éliminer le méthanol du filtrat. L'extrait obtenu est considéré comme étant l'extrait brut (EBr) de notre

plante. Un volume de 50 ml de l'extrait brut qui a été soumis à une évaporation jusqu'à l'élimination de l'eau puis conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

L'extrait brut est initialement mélangé avec l'hexane (1 V/V), le mélange est laissé décanter, et la phase organique supérieure est récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant (hexane) devienne transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (EHx). La phase aqueuse résiduelle est soumise à une autre extraction par le chloroforme, et enfin par l'acétate d'éthyle en suivant les mêmes étapes que la première extraction par l'hexane. La figure 10 résume les étapes suivies dans le fractionnement de l'extrait méthanolique.

Cinq fractions sont obtenues; l'extrait brut ou méthanolique (EBr), la fraction de l'hexane (EHx), la fraction du chloroforme (ECh), la fraction de l'acétate d'éthyle (EAc), et la fraction aqueuse (EAq) résiduelle. Les cinq fractions ont été soumis à une lyophilisation et conservation à -20°C jusqu'à son utilisation.

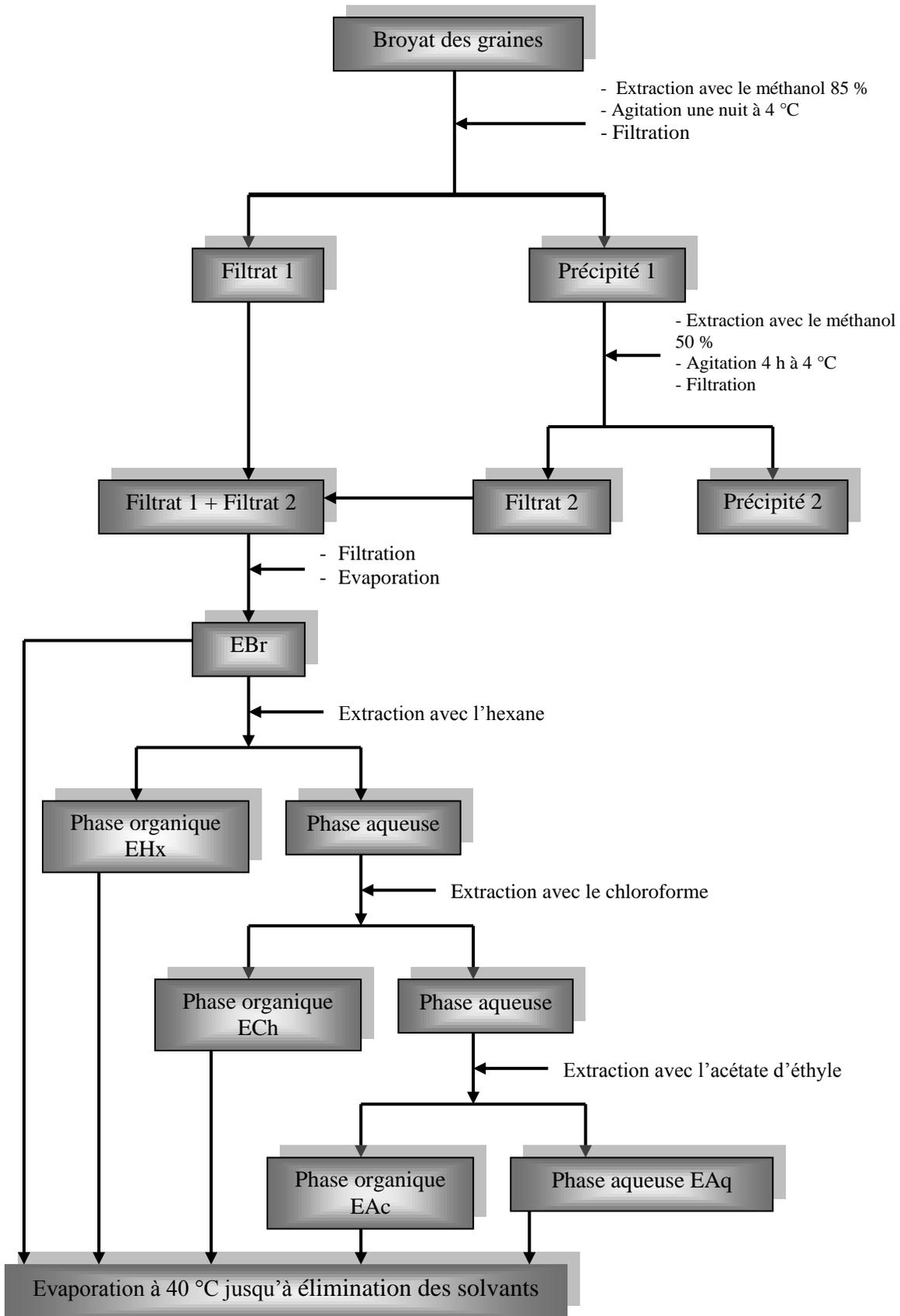


Figure 19: Etapes de l'extraction des flavonoides des graines de *Peganum harmala* par la méthode de Markham (1982).

2.5. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits de *Peganum harmala* a été effectué selon la méthode de bleu de Prusse (Price and Butler, 1977) modifiée par Graham (1992). Cette technique est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanide de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) par les polyphénols pour donner les ions ferreux (Fe^{2+}), ces derniers réagissent avec le chlorure de fer ($FeCl_3$) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de chaque extrait (dilués dans l'eau distillée ou dans le méthanol) a été ajouté à 3 ml de l'eau distillée. Après agitation, 1 ml du $K_3Fe(CN)_6$ (0.016 M) puis 1 ml du $FeCl_3$ (0.02 M, dans le HCl 0.1 N) ont été ajoutés successivement avec un intervalle de temps d'une minute. Après 15 minutes, 5 ml de la solution stabilisante (contenant 30 ml Gomme Arabique 1 %, 30 ml acide phosphorique 85 % et 90 ml de l'eau distillée) ont été ajoutés et l'absorbance a été lue à 700 nm. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**Figure 20**) (0-200 $\mu g / ml$) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait (mg EAG / g E).

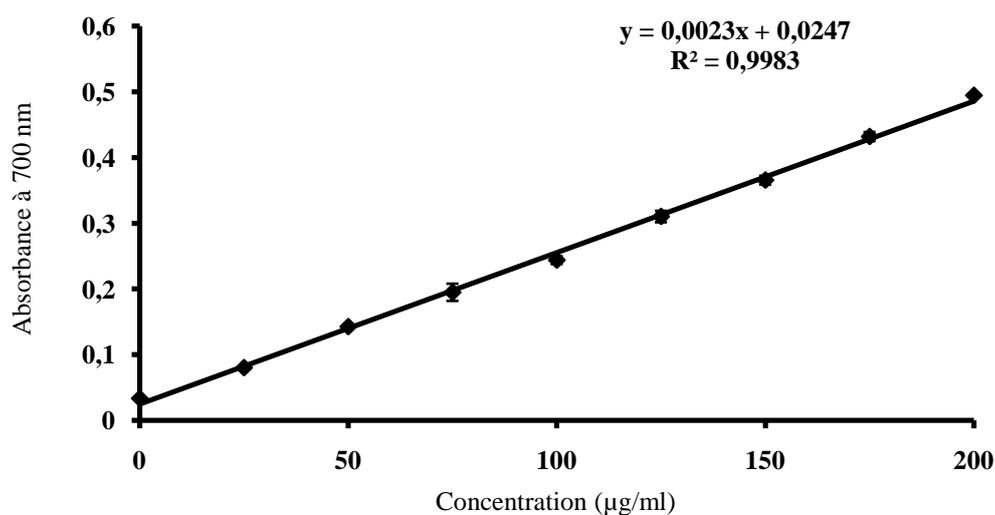


Figure 20: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point de la courbe représente la moyenne \pm SEM (n = 3).

2.6. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes des extraits de *P. harmala* est effectué selon la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Bahorun *et al.*, 1996) ; 1 ml de chaque extrait (préparé dans le méthanol) avec des dilutions convenables, est ajouté à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation et de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine et la rutine (0-40 $\mu\text{g} / \text{ml}$) (**Figure 21**) et exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine ou la rutine par gramme d'extrait (mg EQ / g).

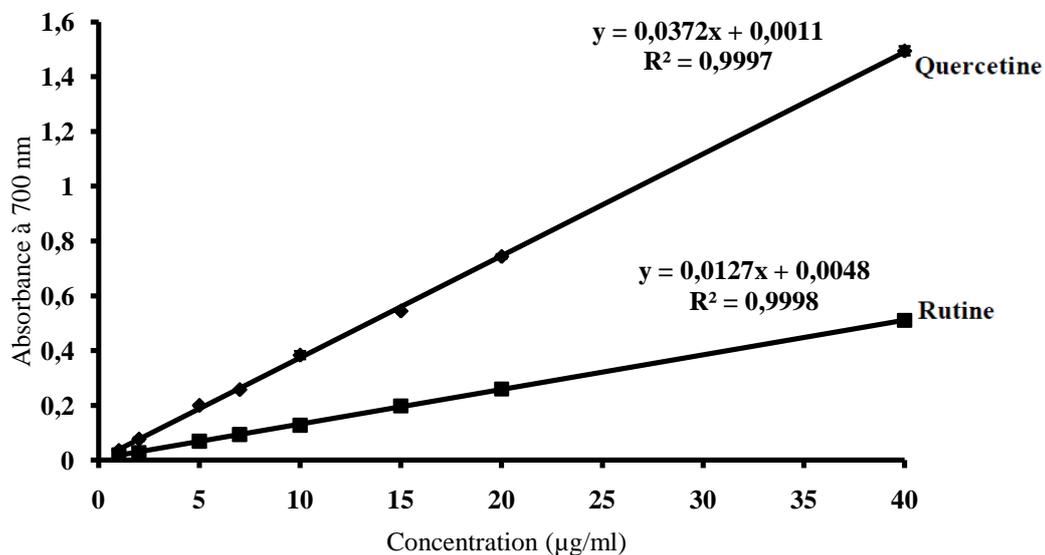


Figure 21: Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine. Chaque point des deux courbes représente la moyenne \pm SEM ($n = 3$).

2.7. Inhibition de l'activité de la xanthine oxydase par les extraits des graines de *Peganum harmala*

L'effet inhibiteur des extraits de *Peganum harmala* sur l'activité de la XO a été étudié spectrophotométriquement en suivant la quantité de l'acide urique produit par oxydation de 100 μM de xanthine dissous dans un tampon phosphate de sodium saturé on air ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$, 50 mM, pH 7.4, contenant 0.1 mM d'EDTA), en présence de plusieurs concentrations de chaque extrait d'*A. iva* (préparées dans le tampon phosphate de sodium ou

dans le méthanol) (Robak and Gryglewski, 1988 ; Boumerfeg *et al.*, 2009). L'absorbance a été lue à 295 nm, et l'activité inhibitrice de ces extraits a été comparée par rapport au standard allopurinol qui est l'inhibiteur spécifique de la XO. Après ajout de la XO, la réaction a été suivie pendant 60 secondes et l'activité inhibitrice des extraits d'*A. iva* a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) calculé ainsi: $I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$

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

A_E : absorbance en présence de l'inhibiteur

L' IC_{50} de chaque extrait (concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique) a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur ($Y = a X + b$). Elle a été exprimée en mg / ml et comparée avec celle de l'allopurinol; $IC_{50} = (50 - b) / a$

2.8. Effet scavenger des extraits des graines de *Peganum harmala* sur le superoxyde produit par la XO

L'effet scavenger des extraits de *Peganum harmala* sur l' $O_2^{\circ-}$ produit par la XO a été déterminé en suivant la réduction du cytochrome c à 550 nm (Robak and Gryglewski, 1988). Le milieu réactionnel a été composé d'un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7.4, 0.1 mM d'EDTA) bien saturé en oxygène aérien, contenant 100 μ M de xanthine et 25 μ M de cytochrome c et en présence de plusieurs concentrations de chacun des extraits d'*A. iva* (préparées dans le méthanol ou dans le tampon phosphate de sodium). La réaction est suivie pendant 60 secondes après ajout de la XO. L'activité inhibitrice de la réduction du cytochrome c par les extraits d'*A. iva* a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) calculé ainsi: $I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$

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

A_E : absorbance en présence de l'extrait

L'IC₅₀ de chaque extrait (concentration inhibitrice de la réduction de 50 % du cytochrome (c) a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait.

2.9. Propriétés antioxydantes des extraits des graines de *Peganum harmala*

2.9.1. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits des graines de *Peganum harmala* par la méthode de DPPH (effet scavenger)

L'activité anti-radicalaire des différents extraits de *Peganum harmala* a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine (Cuendet *et al.*, 1997; Burits and Bucar, 2000). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela, 50 µl de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées. Les résultats obtenus pour chaque extrait testé ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant de référence. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par les extraits d'*A. iva* a été calculé comme suit: $I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$

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

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

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC₅₀) de chaque extrait a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg / ml et comparée avec celle du BHT.

2.9.2. Test de β -carotène / acide linoléique

L'activité antioxydante des extraits des graines de *Peganum harmala* a été étudiée par le test au β -carotène / acide linoléique. Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des hydroperoxydes diene conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique (Barriere *et al.*, 2001; Aslan *et al.*, 2006).

Une solution de β -carotène / acide linoléique a été préparée comme suit: premièrement, 0.5 mg de β -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40 °C dans le rotavapor. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène (100 ml / min / 30 min) ont été ajoutées au mélange avec agitation vigoureuse. Le mélange réactionnel a été par la suite aliquoté (2.5 ml) dans des tubes à essai, et 350 μ l de chacun des extraits préparés d'*A. iva* (2 mg / ml, dans l'eau distillée ou dans le méthanol) ont été ajoutés. La même procédure a été répétée avec le BHT (2 mg/ml) comme un contrôle positif et avec le méthanol et l'eau distillée comme des contrôles négatifs. Les absorbances ont été lues à 490 nm, après 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24h et 48 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité antioxydante (AA %) a été calculé ainsi: $AA \% = (A_E / A_C) \times 100$

A_E : absorbance en présence de l'extrait

A_C : absorbance en présence du contrôle positif BHT

Remarque: les valeurs d'AA % prises pour la comparaison sont ceux calculées à 24 h.

2.9.3. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après incubation des échantillons, à différents concentrations, avec le fer divalent selon la méthode de Decker et Welch (1990). Les solutions d'échantillons (500 μ l) sont initialement mélangées avec 100 μ l FeCl₂ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 μ l

de méthanol. Après 5 min, 100 µl de Ferrozine (5 mM dans le méthanol) sont additionnés au milieu réactionnel, le mélange est bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la formation de complexe avec un couleur violet (Fe (II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Par ailleurs, le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol. L'EDTA est utilisé comme chélateur de référence à un intervalle de concentration de (0-40 µg /ml).

L'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{Chélation} = [1 - (\text{Abs}_{562} \text{ échantillon} - \text{Abs}_{562} \text{ contrôle})] \times 100$$

2.10. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm SD (déviation standard), et en moyenne \pm SEM (erreur standard de la moyenne), (n = 3). Les résultats ont été analysés par le test d'ANOVA univarié (one-way ANOVA) suivie du test de Tukey pour la comparaison des résultats en présence des extraits avec les contrôles négatifs (en absence des extraits), et la comparaison des extraits entre eux. La différence a été considérée statistiquement significative lorsque la valeur de p est < 0.05 .

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Purification, contrôle de pureté et estimation de l'activité de la XO

La purification de la XO a été réalisée par la méthode décrite par Nakamura et Yamazaki (1982) modifiée par Baghiani *et al.*, (2003) à partir du lait bovin frais, par une série de centrifugations puis précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'une chromatographie d'affinité sur colonne de gel d'héparine basée sur l'affinité de la XO aux glycosaminoglycanes sulphatés (Adachi *et al.*, 1993). Le rendement de la purification est de 23.21 mg d'enzyme purifiée par litre du lait bovin frais. Il est similaire à ce qui est trouvé par Baghiani *et al.*, (2002; 2003).

Le spectre d'absorption caractéristique de la XO par un balayage spectrophotométrique (UV-Vis) a présenté trois pics majeurs à 280, 325 et 450 nm (**Figure 22 A**) qui est similaire aux résultats obtenus par les travaux de Abadeh *et al.*, (1992), Sanders et ses collaborateurs (1997), Baghiani et ses collaborateurs (2002; 2003), Benboubetra et ses collaborateurs (2004) et Atmani et ses collaborateurs (2004). Le rapport protéine / flavine PFR a été calculé comme suit: $A_{280\text{nm}} / A_{450\text{nm}}$. La XOR purifiée a donc un degré de pureté élevé présenté par son PFR de 5.15, parce que une valeur proche de 5 est considéré comme critère de pureté (Bray, 1975).

La pureté de l'enzyme a été confirmée par une électrophorèse (SDS-PAGE). Le chemin électrophorétique a présenté une bande majeure d'approximativement 150 KDa (**Figure 22 B**) ce qui est similaire aux résultats des études effectués en 2003 par Baghiani et ses collaborateurs, et en 2004 par Atmani et ses collaborateurs.

L'activité totale et l'activité de la forme oxydase de l'enzyme purifiée a été estimée du lait bovin en présence de xanthine comme un substrat réducteur et de NAD^+ et d' O_2 comme substrat oxydant, et le pourcentage de la forme oxydase a été par la suite calculé. Donc, l'enzyme pure a présenté une activité totale de 2055.05 nmol / min / mg protéine, et le

pourcentage de la forme oxydase (XO) de l'enzyme a été de 91.89 % (**Tableau 4**). Ces résultats sont similaires à ceux de Baghiani *et al.*, (2003), qui indiquent, que l'activité de la XOR du lait des différentes espèces mammifères est liée à la forme inactive démolibdo de l'enzyme.

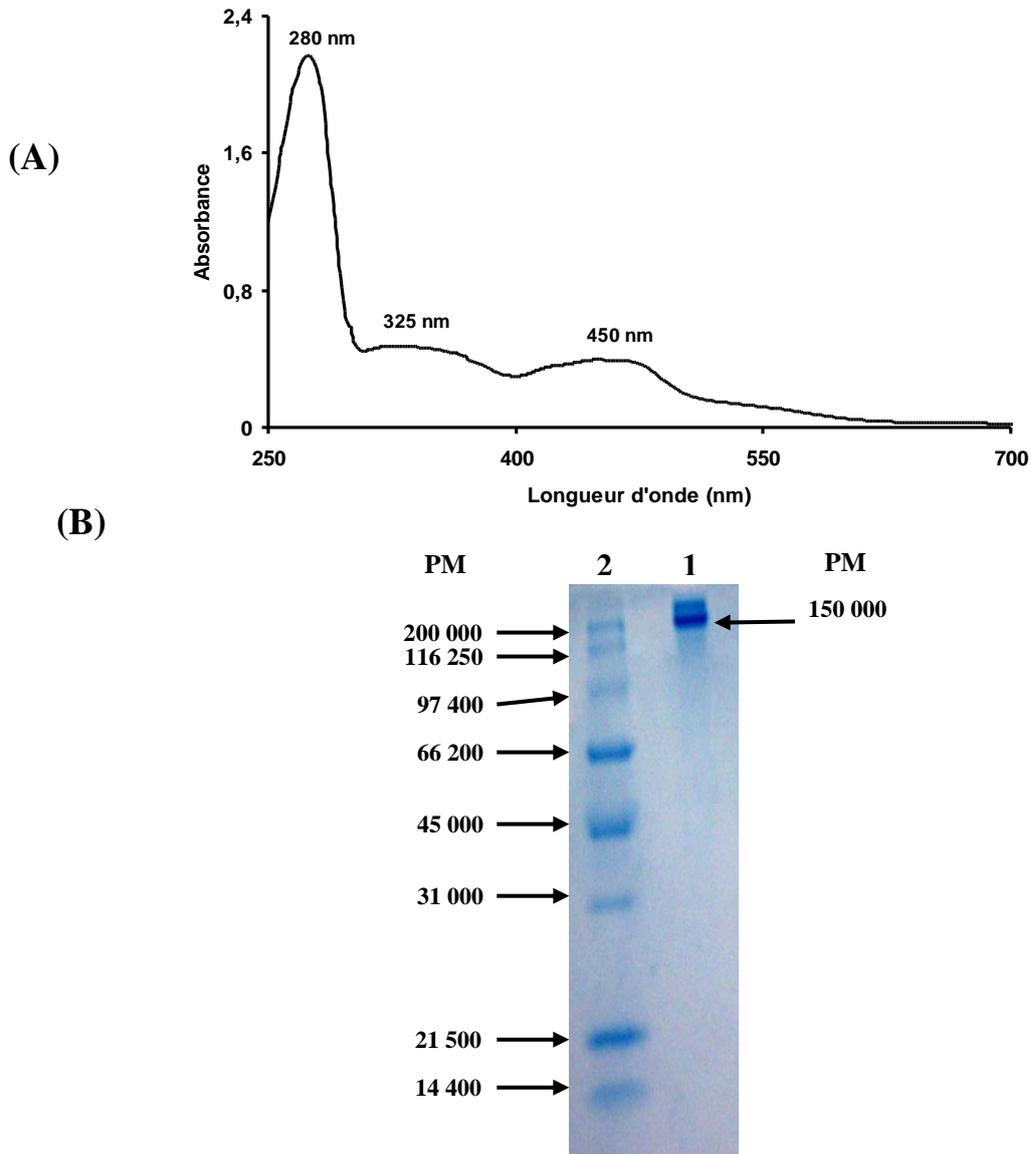


Figure 22: Spectre d'absorption UV-Vis (A) et électrophorèse (SDS-PAGE) (B) de la XO purifiée. **B1:** XO pure (150 000 Da), **B2:** Standards des poids moléculaires (Myosin 200 000; β -galactosidase 116 250; Phosphorylase b 97 400; Serum albumin 66 200; Ovalbumin 45 000; Carbonic anhydrase 31 000, Trypsin inhibitor 21 500 et Lysozyme 14 400 Da).

Tableau 4: L'activité totale et oxydase de la XOR purifiée à partir du lait bovin frais.

Activité (nmol /min / mg protéine) *		Pourcentage de la forme oxydase (XO)	Rapport protéine/flavine (PFR)
Totale	Forme oxydase (XO)		
2055.05	1988.55	91.89	5.15

* L'activité totale et l'activité de la forme oxydase ont été calculées en suivant la production de l'acide urique en présence et en absence de 500 μM de NAD^+ respectivement, et 100 μM de xanthine dans un tampon Na-bicine à pH 8.3.

2. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes de *Peganum harmala* a été effectuée par les solvants organiques à partir d'une poudre végétale. Selon Newman *et al.*, (1974) et Markham *et al.*, (1982) la séparation est basée sur le degré de solubilité des polyphénols dans les solvants organiques. Elle s'effectue en quatre étapes : (i) solubilisation des polyphénols dans le méthanol, (ii) délipidation de l'extrait par l'ajout de l'hexane, (iii) l'ajout du chloroforme pour l'obtention des flavonoïdes aglycones et (iiii) l'ajout de l'acétate d'éthyle pour l'obtention des glucoflavonoïdes. Donc les différents extraits préparés seraient comme suit: l'extrait brut peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins, l'extrait d'hexane qui est en générale constitué de lipides et de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, l'extrait du chloroforme est plus riche en flavonoïdes aglycones, l'extrait d'acétate d'éthyle contient les flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés et l'extrait aqueux peut être constitué des flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tetra-glycosylés).

Le calcul des rendements par rapport au poids de la poudre végétale (**Tableau 5**) a montré que l' EBr ($10.95 \pm 0.27\%$) représente le rendement le plus élevé, suivait par l' EAq ($4.19 \pm 0.19 \%$), ensuite l' EAc avec $2.41 \pm 0.31 \%$, l'ECh a un rendement de $2.19 \pm 0.16 \%$ qui est comparable à celui de l'EAc, et en fin le rendement de l'EHx est le plus faible et presque vingt fois inférieurs à celui de l'EBr.

Un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des trois extraits (EBr, ECh et EAc) des graines de *Peganum harmala* a été effectué où les méthodes au bleu de Prusse (Price and Butler, 1977) modifiée par Graham, (1992) et du trichlorure d'aluminium (AlCl₃) (Bahorun *et al.*, 1996) ont été utilisées respectivement pour le dosage de ces molécules.

D'après les résultats présentés dans le **Tableau 5**, l'ECh est le plus riche en polyphénols (66.29 ± 1.57 mg EAG / g E) suivi par l'EAc (58.1 ± 1.57 mg EAG/g E) et enfin l'EBr qui contient presque la moitié de la quantité de polyphénols trouvée dans l'ECh (27.91 ± 0.98 mg EAG / g E). La détermination des taux des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium révèle que l'ECh représente la fraction la plus riche en flavonoïdes avec une teneur (13.88 ± 0.13 mg EQ / g E) presque double de celle trouvée dans l'EBr (7.39 ± 0.68 mg EQ / g E), ensuite l'EAc avec 12.18 ± 0.08 mg EQ / g E. Si les calculs sont effectués à partir de la courbe d'étalonnage de la rutine, la concentration des flavonoïdes dans ces extraits est doublée parce que la pente de la courbe d'étalonnage de la rutine égale presque à la moitié de celle de la quercétine (**Figure 21**, section matériel et méthodes).

Tableau 5: Le rendement des extraits des graines de *Peganum harmala* et ses teneurs en polyphénols totaux et en flavonides.

Les extraits	Rendement (%)	Polyphénols totaux (mgEAG/g E)	Flavonoïdes	
			mg EQ / g E	mg ER / g E
EBr	10.95 ± 0.27	27.91 ± 0.98	7.39 ± 0.68	21.38 ± 2.01
EHx	0.51 ± 0.17	nd	nd	nd
ECh	2.19 ± 0.16	66.29 ± 1.58	13.88 ± 0.13	40.08 ± 0.39
EAc	2.41 ± 0.31	58.1 ± 2.87	12.18 ± 0.08	35.09 ± 0.24
EAc	4.19 ± 0.19	nd	nd	nd

nd non déterminé. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n = 3).

3. Inhibition de la xanthine oxydase par les extraits des graines de *Peganum harmala*

L'effet inhibiteur des extraits des graines de *Peganum harmala* sur l'activité de la XO du lait bovin a été évaluée spectrophotométriquement à 295 nm. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits inhibent l'activité de la XO très significativement ($p < 0.001$, comparant avec le contrôle), d'une manière dose-dépendante (**Figure 23**). Les valeurs des IC_{50} des différents extraits (**Figure 24**) montrent que les deux extraits; ECh et EAc semblent avoir l'effet inhibiteur le plus puissant, ($p < 0.001$), avec une IC_{50} de 0.055 ± 0.0053 mg / ml et $0.0057 \pm 0,0141$ mg/ml respectivement, et l'EBr qui a une IC_{50} (0.252 ± 0.0051 mg / ml) presque trois fois supérieure à celui de l'ECh. L'ECh et l'EAc ont un effet presque six fois inférieur à l'allopurinol (IC_{50} de 0.0082 ± 0.00015 mg/ml), alors que l'EBr est presque 30 fois plus faible.

De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différentes plantes sur l'activité de la XO (Kong *et al.*, 2000; Sweeney *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2004; Ferraz Filha *et al.*, 2006; Umamaheswari *et al.*, 2007), cette activité inhibitrice est peut être attribuée a la présence de différents composés bioactifs tels que les polyphénols (Costantino *et al.*, 1992; Chiang *et al.*, 1994), les tannins (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1996) et les flavonoïdes (Lin *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004). Il existe des substances qui inhibent la XO en bloquant la fixation du substrat au sites actifs de l'enzyme (Skibo, 1986; Sanders *et al.*, 1997), donc l'inhibition de l'activité de la XO par les extraits des graines de *Peganum harmala* peut être traduit par la présence d'un ou de plusieurs composés agissant sur les sites actifs, Mo et FAD, de l'enzyme.

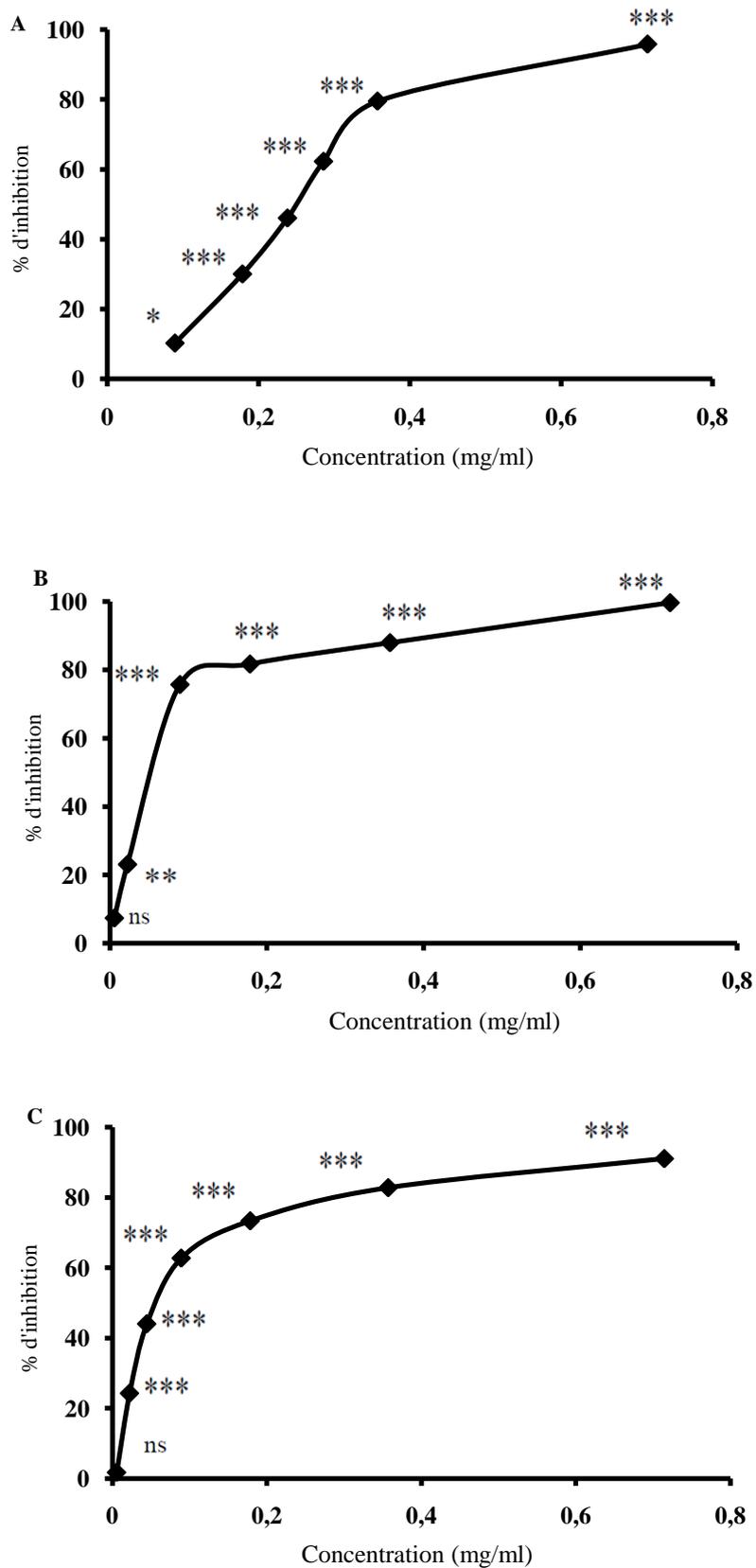


Figure 23: Effet inhibiteur des extraits des graines de *Peganum harmala* sur l'activité de la XO. A (EBr); B (ECh); C (EAc). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3). *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, ns $p > 0.05$, comparant avec le contrôle.

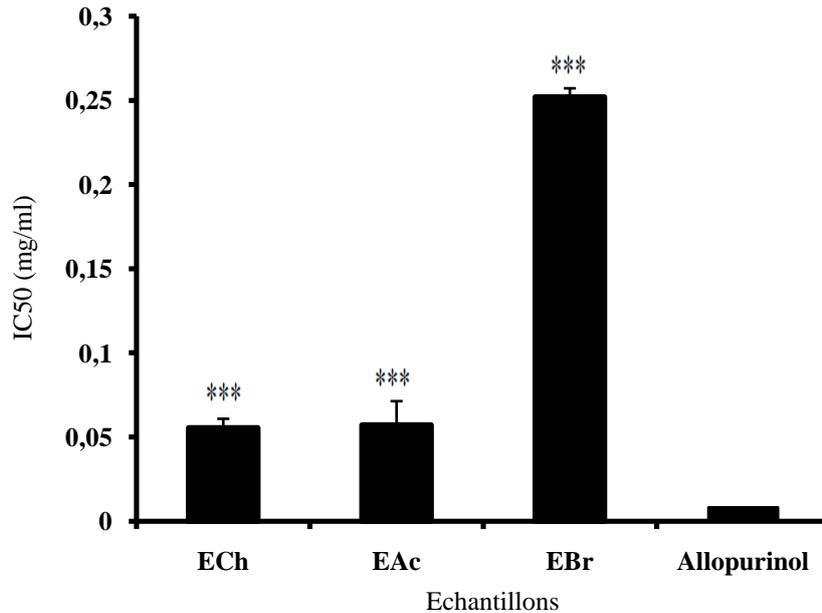


Figure 24: Les concentrations des extraits des graines de *Peganum harmala* et de l'allopurinol qui inhibent 50 % de l'activité de la XO. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3). *** $p < 0.001$, comparant avec l'allopurinol.

Cos et ses collaborateurs (1998) ont déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leurs activités inhibitrices de la XO. Ils ont montré que la présence de la double liaison entre les carbones C₂ et C₃ et l'absence du groupe hydroxyle en C₃ des flavonoïdes augmentent leur activité inhibitrice. La richesse de l'ECh et l'EAc des graines de *Peganum harmala* en flavonoïdes pourrait être à l'origine de leur effet inhibiteur le plus puissant.

4. Effet scavenger des extraits des graines de *Peganum harmala* sur l'O₂^{•-} produit par la XO

La XO en présence de la xanthine, l'hypoxanthine et l'O₂ comme accepteur d'électrons peut réduire le Cyt-c oxydé (Cyt-c⁺³) en Cyt-c réduit (Cyt-c⁺²). L'O₂^{•-} produit par le système xanthine ou hypoxanthine/xanthine oxydase est le responsable de cette réduction (Mc Cord and Fridovich, 1968). Pour déterminer l'effet scavenger (balayeur) de différents extraits de *P. harmala* sur l'O₂^{•-}, une technique décrite par Robak et Gryglewski (1988) est suivie dont l'inhibition de la réduction de Cyt-c⁺³ par le système xanthine/xanthine oxydase a été

déterminé par spectrophotométrie à 550nm. Tous les extraits des graines de *Peganum harmala* inhibent la réduction du Cyt c très significativement ($p < 0.001$, comparant avec le contrôle), d'une manière dose-dépendante (**Figure 25**).

Les différents extraits des graines de *P. harmala* ont aussi un effet inhibiteur sur la XO, ce qui rend difficile de savoir, dans le teste du Cyt-c⁺³, si ces extraits ont un effet scavenger sur l'O⁻² ou un effet inhibiteur sur l'enzyme. Cos et ses collaborateurs (1998) ont montré que si les valeurs d'IC₅₀ pour le scavenger de l'O⁻² sont inférieurs à celles de l'inhibition de la production de l'acide urique, cela indique que les extraits ont un effet inhibiteur sur l'activité XO et piègeur sur l'O⁻².

Les résultats des IC₅₀ de Cyt c des trois extraits des graines de *P. harmala* sont représentés dans le **Tableau 6**. L'effet inhibiteur de la réduction du Cyt c le plus puissant est celui de l'ECh (IC₅₀ = 0.037 ± 0.0008 mg / ml) ($p < 0.001$), suivie par EAc (IC₅₀ = 0.053 ± 0.0141 mg / ml) et l'EBr est le plus faible (IC₅₀ = 0.14 ± 0.0051 mg / ml), qui a un effet presque 4 fois inférieur à celui de l'ECh.

L'inhibition de la réduction du Cyt c est dû à l'effet inhibiteur de la XO et / ou l'effet scavenger sur l'O₂^{°-} produit par cette enzyme (Valentao *et al.*, 2002). Les IC₅₀ des trois extraits des graines de *P. harmala* sont représentés dans la **Figure 26**.

Pour l'EBr, l'IC₅₀ de la production de l'acide urique est presque 2 fois plus faible que celle inhibitrice de la réduction du Cyt c. l'ECh a une IC₅₀ de la réduction Cyt c presque deux tiers de celle inhibitrice de la XO. Alors que l'ECh a une IC₅₀ de la réduction du Cyt c presque la même que celle inhibitrice de la XO (**Figure 26**).

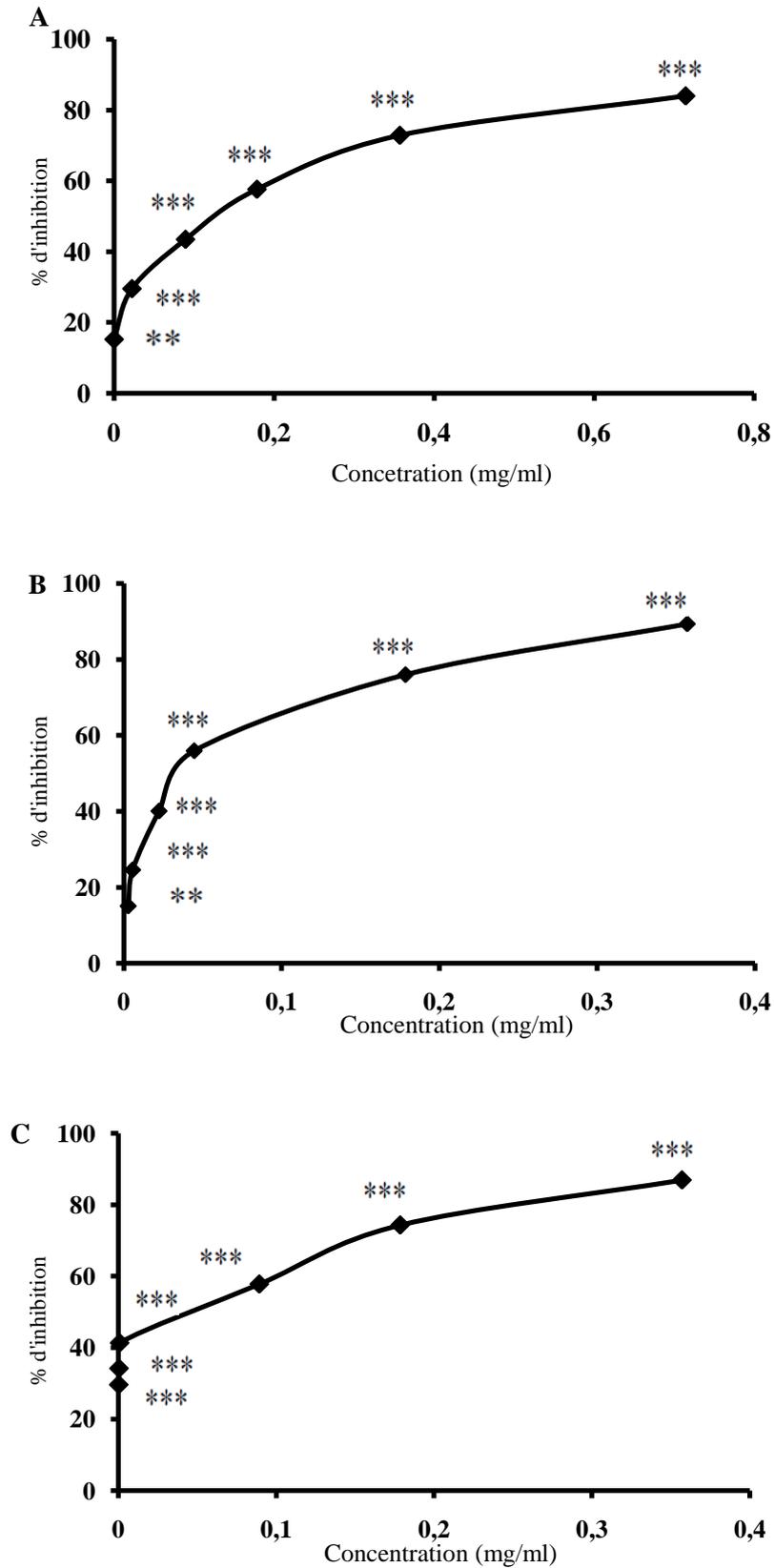


Figure 25: Effet inhibiteur de la réduction du cyt c par l' $O_2^{\bullet-}$ produit par la XO des extraits des graines de *Peganum harmala*. A (EBr); B (ECh); C (EAc). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, comparant avec le contrôle.

Tableau 6: Les concentrations des extraits des graines de *Peganum harmala* qui inhibent la réduction de 50 % du Cyt c par l' $O_2^{\cdot-}$ produit par la XO.

Les extraits	EBr	ECh	EAc
IC ₅₀ (mg / ml)	0,14 ± 0.0051	0.037 ± 0.0008	0,053 ± 0.0141

Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

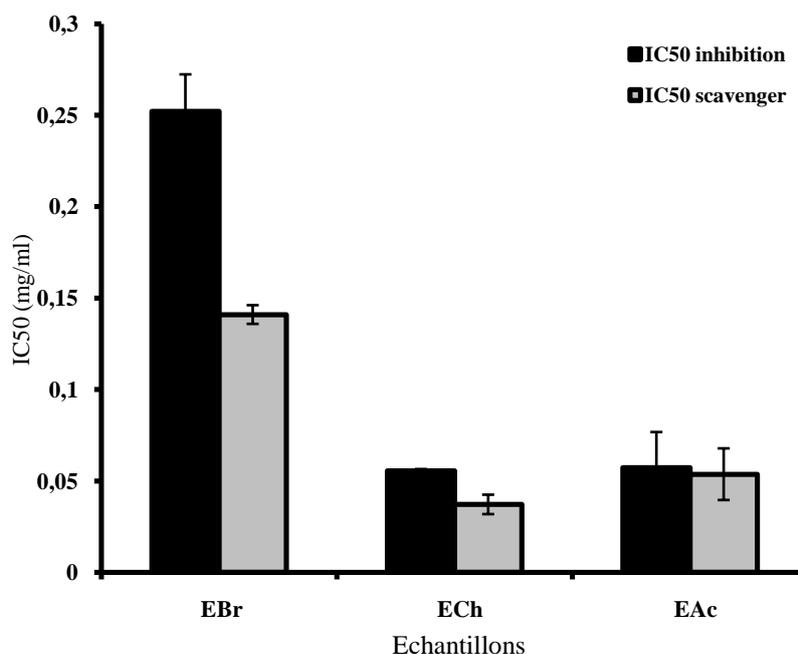


Figure 26: Les concentrations des extraits des graines de *Peganum harmala* qui inhibent 50 % de l'activité de la XO en comparaison avec celles qui inhibent la réduction de 50 % du Cyt phénoliques (Kimura *et al.* c par l' $O_2^{\cdot-}$ produit par cette enzyme. Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

L'effet scavenger des radicaux libres par les différents constituants des plants est peut être dû aux présence des flavonoïdes (Hatono *et al.*, 1989). C'est pour cela on remarque l'efficacité de l'ECh et l'EAc. Montoro et ces collaborateurs, (2005) ont montré qu'il existe une relation entre la structure des flavonoïdes et leurs effets piègeur sur l' $O_2^{\cdot-}$ et inhibiteur sur l'activité XO où la différence structurale entre les flavonols, les flavones, les flavanones, et les dihydroflavonols peut influencer l'effet inhibiteur et piègeur de ces flavonoïdes. La présence de la double liaison entre les carbones C2 et C3 et des groupements hydroxyles sur les carbones C5 et C7 potentialisent l'effet piègeur sur l' $O_2^{\cdot-}$ dont l'insaturation du cycle C et

la suppression de groupement hydroxyle sur le carbone C7 induisent une réduction dans l'effet piègeur des flavonoïdes (Montoro *et al.* , 2005).

5. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits des graines *Peganum harmala* par la méthode de DPPH (effet scavenger)

L'activité antioxydante des différents extraits des graines de *Peganum harmala* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical. Le radical DPPH est souvent utilisé comme un indicateur pour tester la capacité de l'extrait à donner un atome d'hydrogène ou un électron et donc l'activité antioxydante (Dorman *et al.*, 2003; Tepe *et al.*, 2005). Yokozawa *et al.* (1998) ont suggéré que l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, les tannins et les flavonoïdes provoquent la réduction et la décoloration du radical libre diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) en lui donnant un hydrogène pour former le diphénylpicrylhydrazine (**Figure 27**).

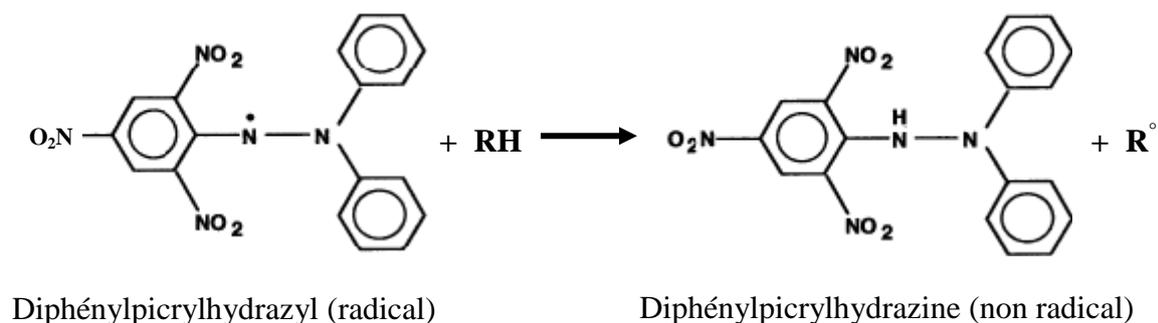


Figure 27: La réduction du DPPH par un antioxydant (Molyneux, 2004).

Dans le test de DPPH, la cinétique de décoloration de ce radical a été suivie à 517 nm après addition de 50 μ l de chacune des concentrations des extraits des graines de *Peganum harmala*. L'effet scavenger des trois extraits sur le radical DPPH est très significatif ($p < 0.001$, comparant avec le contrôle) et d'une manière dose-dépendante (**Figure 28**).

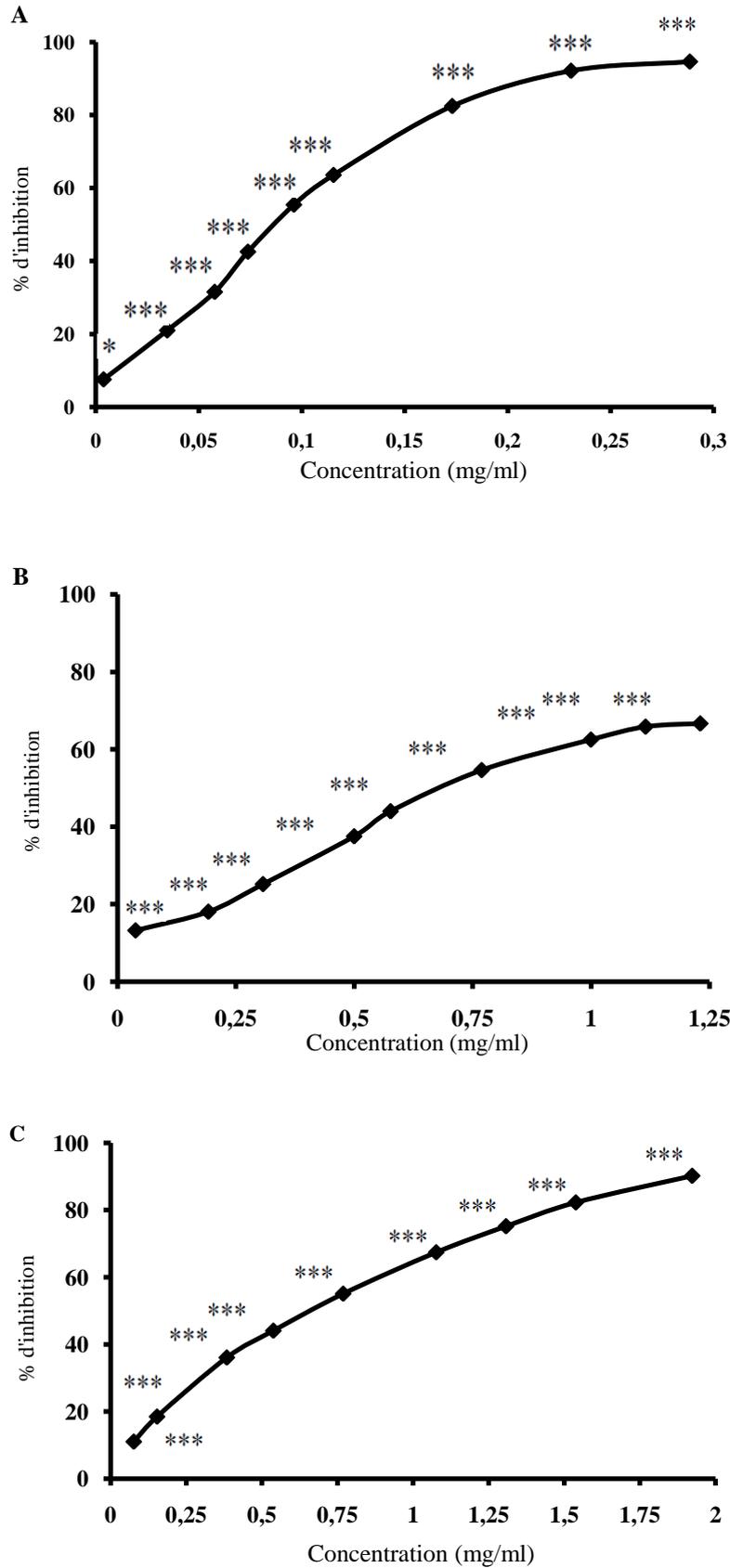


Figure 28: Effet scavenger des extraits des graines de *Peganum harmala* sur le radical DPPH. A (EBr); B (ECh); C (EAc). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3). *** $p < 0.001$, * $p < 0.01$ comparant avec le contrôle.

L'IC₅₀ c'est les concentrations des différents extraits et standards qui piègent 50 % du radical DPPH. C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Brand-Williams *et al.*, 1995; Tsimogiannis and Oreopoulou, 2004; Atoui *et al.*, 2005).

L'EBr possède l'effet scavenger le plus puissant parmi les trois extraits ($p < 0.001$) avec une valeur de IC₅₀ = 0,100 ± 0.0069 mg / ml, suivi par l'EAc (IC₅₀ de 0,711 ± 0,0298 mg / ml), et enfin l'ECh est le plus faible avec une IC₅₀ d'environ 0,744 ± 0,0198 mg / ml. Comparant avec des valeurs d'IC₅₀ de BHT (0,03255 ± 0.01860 mg/ml), rutine (0,0417 ± 8,926*10⁻⁵ mg/ml), quercétine (0,00349 ± 1,276*10⁻⁵ mg/ml) et acide gallique (0.00056 ± 3,456*10⁻⁵ mg/ml) (**Figure 29**).

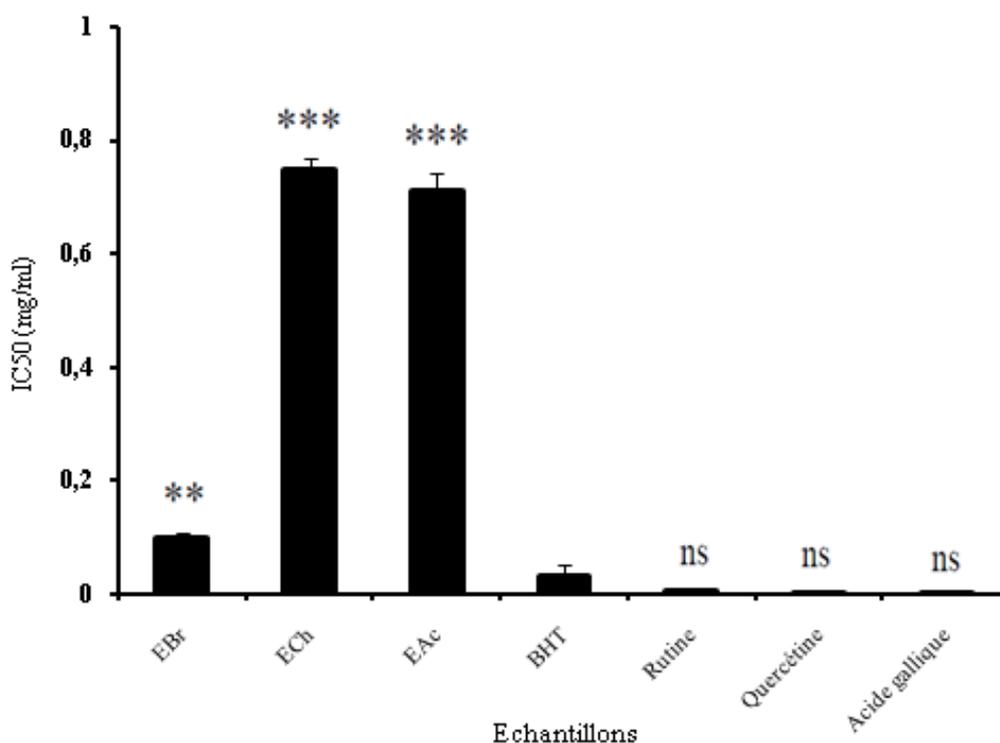


Figure 29: IC₅₀ du radical DPPH des différents extraits des graines de *Peganum harmala* et des composés phénoliques (Rutine, Quercétine, Acide gallique) avec un standard (BHT). Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3). *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, ns $p > 0.05$, en comparant avec BHT.

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant (Molyneux, 2004; Tsimogiannis and Oreopoulou, 2006; Kouri *et al.*, 2007). Quelques composés se réagissent très vite avec le DPPH en réduisant un nombre de molécules de DPPH égal à celui des groupements hydroxyles de l'antioxydant (Bondet *et al.*, 1997). Dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables sur l'effet scavenger vis-à-vis du radical DPPH, plusieurs travaux ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes avec ce radical stable. Amič et collaborateurs (2003) ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones) et leurs capacités de piéger le DPPH. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3',4'-dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C. Ce qui exprime l'effet de l'EBr des graines de *Peganum harmala* par la présence d'autres molécules ont une activité antiradicalaire que les flavonoides (ECh et EAc).

6. Test de β -carotène / acide linoléique

Dans ce test l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge brique, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. La cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence des extraits des graines de *Peganum harmala*, des antioxydants standards et les activités antioxydantes (AA) sont représentés dans la **Figure 30**.

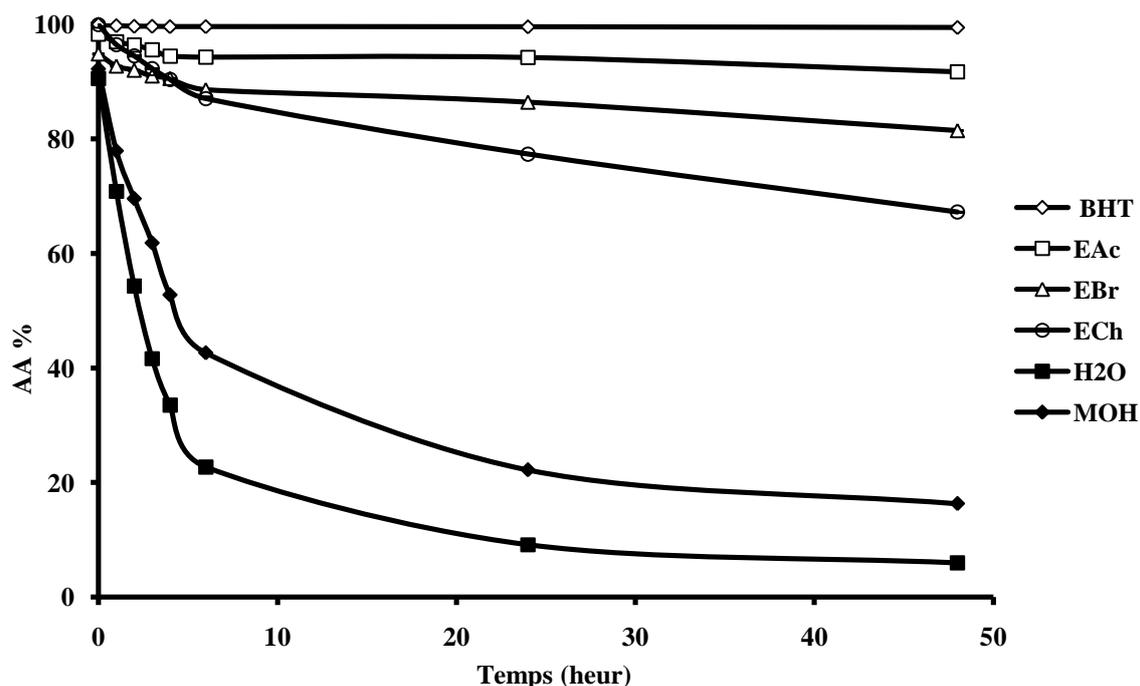


Figure 30: Activité antioxydante des extraits de *Peganum harmala* par rapport au BHT, MOH et H₂O par le test de β -carotène / acide linoléique. Chaque point représente la moyenne \pm SEM (n = 3).

D'après les résultats (**Figure 31**), tous les extraits des graines de *Peganum harmala* inhibent l'oxydation du β -carotène, et d'une façon très importante. Cet effet est dû soit à l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique ou au piégeage des radicaux hydroperoxydes formés durant la peroxydation de l'acide linoléique (effet scavenger) (Tepe *et al.*, 2005; Aslan *et al.*, 2006). La valeur du pourcentage de l'activité antioxydante à 24 h (AA %) la plus élevée parmi les trois extraits est de l'EAc (94.21 ± 0.003 %), il est le meilleur inhibiteur de l'oxydation du β -carotène, suivi par l'EBr qui possède une activité antioxydante élevée (86.24 ± 0.027 %), et enfin l'ECh qui exerce l'effet antioxydant le plus faible parmi les trois extraits de *Peganum harmala* (77.35 ± 0.032 %) avec un contrôle (BHT) de 99.66 ± 0.55 %.

Plusieurs études ont montré que l'effet antioxydant des sources naturels est dû à leurs composés phénoliques (Yang *et al.*, 2002; Nagai *et al.*, 2003). Abdille et ses collaborateurs

(2005) ont déterminé que l'extrait méthanolique, l'extrait de l'acétate d'éthyle et l'extrait aqueux des fruits de *Dillenia indica* ont représenté une activité antioxydante de 80.2 %, 55.5 % et 45.5 %, respectivement, à concentration de 100 µg / ml. D'après ces résultats, l'effet de l'EBr est le plus puissant malgré leur faible teneur en flavonoïdes, ce qui montre l'existence d'autres composants qui inhibe la peroxydation lipidique.

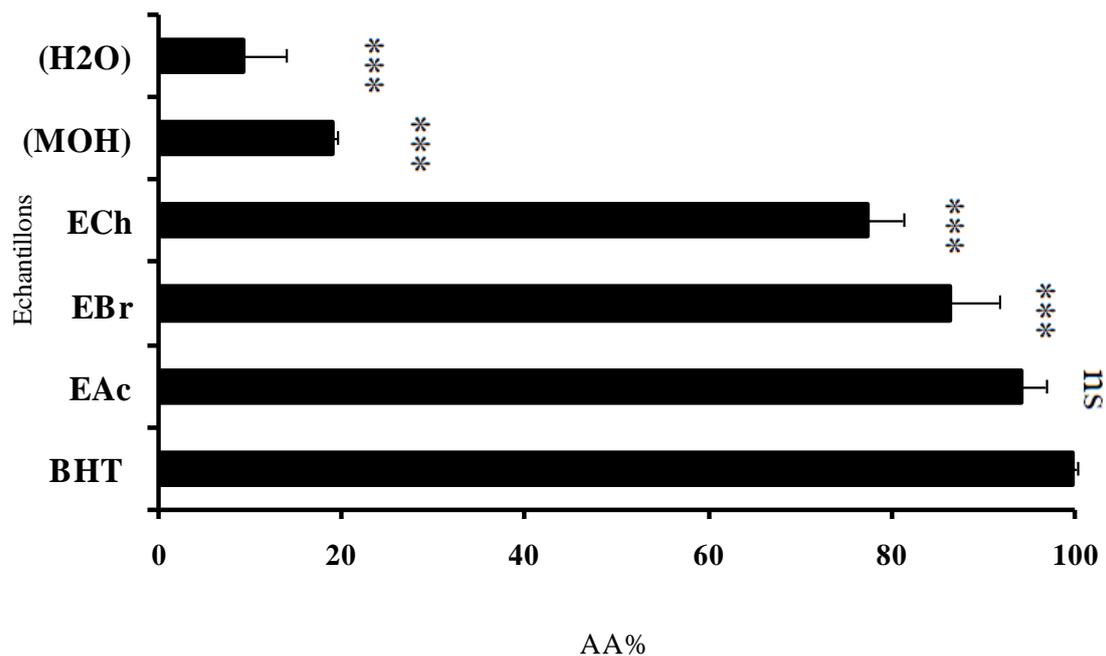


Figure 31: Activité antioxydante des l'extrait des graines de *Peganum harmala* et du BHT, MOH et H₂O (à 24 h), par le test de β-carotène / acide linoléique. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n = 3). *** $p < 0.001$, ns $p > 0.05$ comparant avec le contrôle.

7. Test de chélation du fer ferreux

C'est une méthode basé sur l'inhibition de la formation de complexe Fe-Ferrozine en suivant la décoloration de couleur violet à 562 nm, les résultats obtenus montrent que les différents extraits des graines de *Peganum harmala* ainsi que les standards interfèrent d'une manière dose dépendante avec la formation du complexe (Fe₂₊- Ferrozine), suggérant qu'ils possèdent une activité chélatrice tout en capturant l'ion ferreux avant qu'il soit complexé avec la Ferrozine (**Figure 32**). Les valeurs d'IC₅₀ des différents extraits testés montre une grande

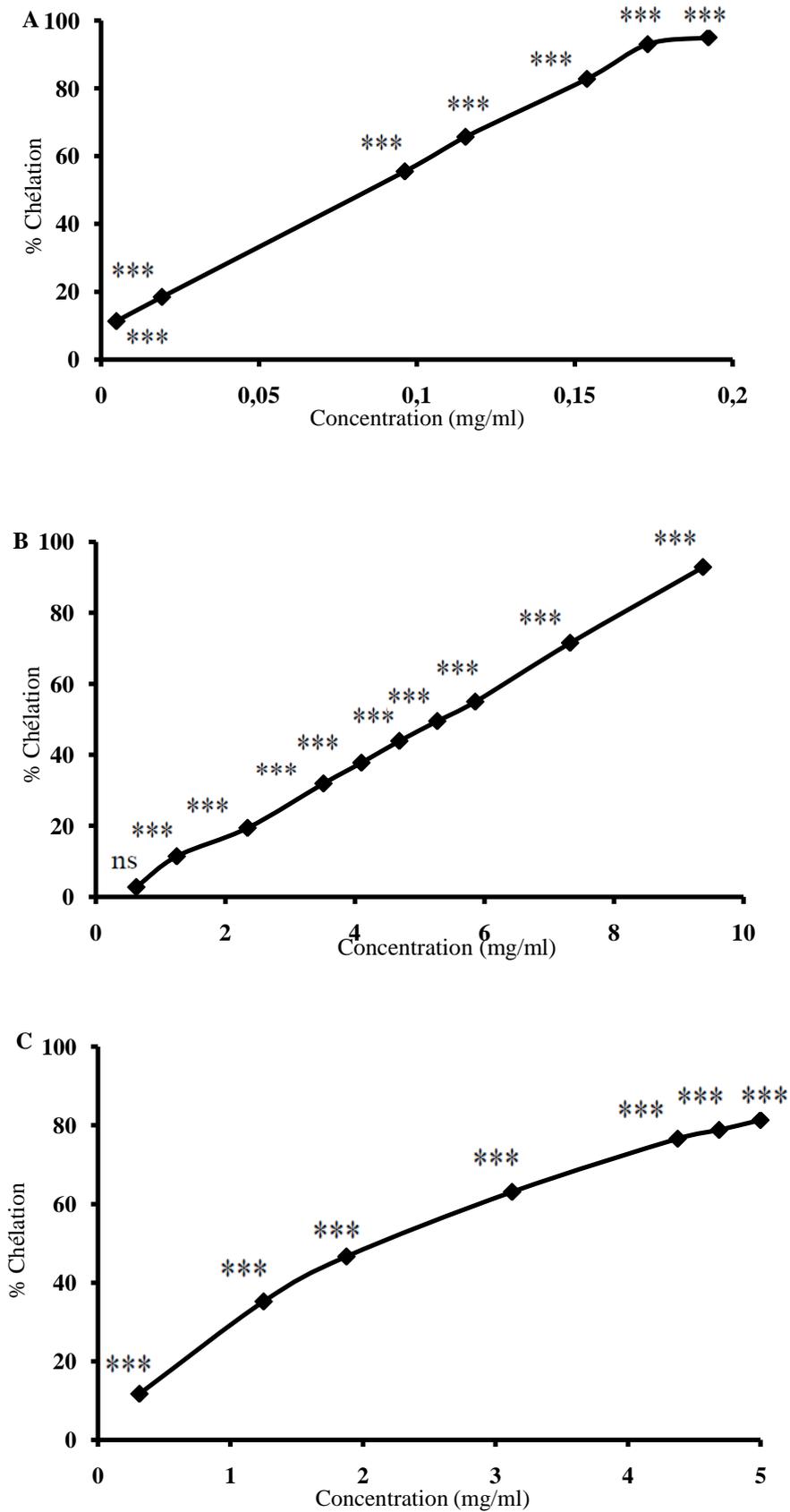


Figure 32: Activité chélatrice des extraits des graines de *Peganum harmala*, A (EBr); B (ECh); C (EAc). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3). *** $p < 0.001$, ns $p < 0.05$ comparant avec le contrôle.

variation; l'EBr exprime l'effet le plus puissant (0.088 ± 0.0008 mg/ml), suivies par l'EAc (2.256 ± 0.0398 mg/ml) et l'ECh présente l'effet le plus faible avec un IC50 qui égale 5.286 ± 0.0053 mg/ml et en fin EDTA présente un IC50 de $0.0058 \pm 8.31 \cdot 10^{-5}$ mg/ml (**Figure 33**).

De nombreuses études ont évalué l'effet chélateur des ions ferreux par les extraits de diverses plantes. L'étude menée par Le et ses collaborateurs (2007) montre que la concentration effectrice de l'extrait éthanolique des fruits de *Lycium barbarum* est de l'ordre de 10 mg/ml, cette valeur est nettement supérieure aux valeurs obtenues avec les différents extraits des graines de *Peganum harmala*, ce qui reflète une importante activité chélatrice des graines de *Peganum harmala*.

La capacité chélatrice est très importante du fait qu'elle réduit la concentration de métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxyles et alcoxyles qui peuvent à leur tour entretenir la réaction en chaîne (Elmastaş *et al*, 2006). Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment une liaison de type σ avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique (Suresh-Kumar *et al*, 2008).

Selon la littérature, les composés phénoliques s'avèrent comme de bons chélateurs des ions métalliques (Morris, 1995; Brown, 1998). Cependant, dans la présente étude une corrélation faible et non significative a été mise en évidence entre le pouvoir chélateur des extraits des graines de *Peganum harmala* et leurs teneurs en composés phénoliques. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres travaux récents, par exemple dans une étude menée sur des extraits de quatorze variétés d'orge, Zhao et collaborateurs (2008) ont mis en évidence l'existence d'une corrélation très faible et non significative entre l'activité chélatrice de ces extraits et leurs teneurs en composés phénoliques.

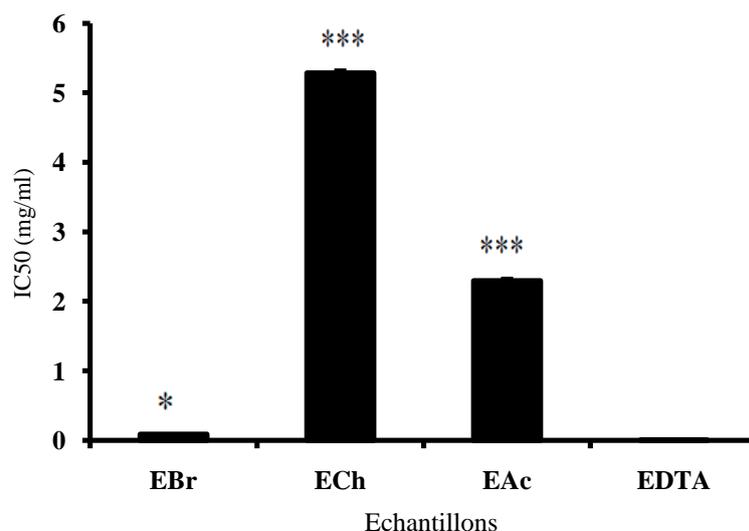


Figure 33: IC₅₀ d'activité chélatrice des différents extraits des graines de *Peganum harmala* avec un standard (EDTA). *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Ces résultats pourraient indiquer que les composés phénoliques ne sont pas les principaux chélateurs présents dans les extraits qui sont en fait un mélange complexe d'acides organiques (acides citrique, malique, tartrique, oxalique, lipoïque et phytique..etc.), d'acides aminés et de sucres qui peuvent contribuer également à la séquestration des métaux de transition (Wong *et al.*, 2006). Les composés contenant le nitrogène sont généralement des chélateurs plus puissants que les composés phénoliques (Chan *et al.*, 2007). De plus, la capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés (Van Acker *et al.*, 1996). Donc un échantillon riche en composés phénoliques ne pourrait pas chélater les métaux de transition si ses polyphénols ne disposent pas des groupements fonctionnels nécessaires pour l'activité chélatrice, de même la conjugaison d'un composé phénolique avec une partie glucidique entraîne la perte de l'activité chélatrice (Wong *et al.*, 2006).

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a occupé une place importante dans la recherche biomédicale. Egalement une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique. La capacité antioxydante des plantes est principalement due à leur richesse en composés phénoliques, capables à donner des atomes d'hydrogènes pour inhiber la peroxydation lipidique (Amić *et al.*, 2003). La présence et le nombre de groupements OH libres sont des facteurs déterminants de l'activité antioxydante des polyphénols (Sharififar *et al.*, 2008).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressé aux effets anti-oxydants des graines de *Peganum harmal* est largement exploitées dans la médecine traditionnelle en Algérie, Quatre aspects ont été étudiés; (i) effet inhibiteur de la xanthine oxydase (XO) génératrice de ROS (action indirecte), (ii) action directe sur l'espèce radicalaire (effet piègeur du O_2^- , ou autre radical tel que le DPPH), (iii) l'étude de l'effet sur la peroxydation lipidique et (iiii) effet chélateur vis-à-vis des ions métalliques. Dans les tests réalisés dans cette étude, quelques activités montrent une corrélation significative entre la teneur en flavonoïdes et l'activité antioxydante des extraits, mais ceci n'exclue en aucun cas la contribution d'autres composés dans cette activité, d'autre activités montre une corrélation faible ou non significative, ce qui prouvé l'existence d'autre composés actives que les flavonoïdes.

Les extrais des graines de *Peganum harmala* inhibent la XO et possèdent un effet scavenger sur le radical superoxyde, ce qui est en accord avec les résultats de Fridovich (1970). l'EAc possède un effet scavenger proche de celui de l'inhibition de la XO, alors que les deux extraits (EBr et ECh) ont un effet scavenger plus élevé que leur effet inhibiteur. Ces deux testes montrent une corrélation significative entre le teneur en flavonoïdes et l'activité

antioxydante (directe ou indirecte), donc les principales molécules responsables de cette activité sont les flavonoïdes.

Parmi les méthodes non enzymatiques qui peuvent être utilisées pour évaluer l'activité antioxydante; le DPPH, β -carotène / acide linoléique et chélation des ions métalliques. La technique de DPPH montre que l'EBr présente l'effet scavenger le plus puissant, suivi par l'EAc et l'ECh. Cependant l'ECh, qui a l'effet scavenger le plus puissant sur le radical superoxyde, exerce l'effet scavenger faible sur le radical DPPH, et en revanche l'EBr qui exerce un effet scavenger fort sur le radical DPPH, présente un faible effet scavenger sur le radical superoxyde.

Dans le test de β -carotène / acide linoléique, l'oxydation du β -carotène a été effectivement inhibée par les trois extraits des graines de *Peganum harmala*. L'EAc possède l'activité inhibitrice de l'oxydation du β -carotène la plus élevée, suivie par l'EBr et enfin l'ECh.

Le test de l'activité chélatrice a révélé que les trois extraits EBr, EAc et ECh manifestent un pouvoir chélateur des ions ferreux, l'EBr présente l'effet chélateur le plus puissant malgré sa faible teneur en composés phénoliques.

Ces trois activités antioxydantes (scavenger de DPPH, inhibition de l'oxydation du β -carotène et chélation des métaux) présentent une corrélation faible et non significative entre l'activité chélatrice des extraits des graines de *Peganum harmala* et leurs teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes. Cette observation laisse supposer que l'activité chélatrice est probablement attribuée, en totalité ou en partie, à des composés autres que les polyphénols ou les flavonoïdes.

Les résultats obtenus par notre étude permettent de conclure que les extraits des graines de *Peganum harmala* contiennent: des composés phénoliques qui ont la capacité d'inhiber la XO

et d'exercer un effet scavenger sur l'ion superoxyde d'oxygène ($O_2^{\cdot-}$) relativement élevé, et d'autres composés avec une activité scavenger du radicale DPPH, inhibitrice de la peroxydation lipidique et chélatrice très importante des ions de fer. Ce qui explique et confirme les utilisations de cette plante dans la médecine traditionnelle et surtout comme plante anti-inflammatoire et anti-rhumatismale.

Les résultats obtenus dans cette étude sur les activités anti-XOR, anti-radicalaires, anti-peroxydation lipidique et chélatrice des ions métalliques des extraits des graines de *Peganum harmala* restent préliminaires. Des études complémentaires approfondies sont envisagées et se résument dans les points suivants : (i) séparation, identification et caractérisation des composés actifs dans les trois extraits, et évaluation de leur activité antioxydante en utilisant différentes techniques *in vitro*, (ii) étude *in vivo* pour traiter l'arthrite provoquée chez les rats est souhaitable, partant du fait qu'un extrait ou une substance isolée de l'extrait peuvent être très actifs *in vitro* mais perdent cette activité une fois pénétrés dans le corps, et *vice versa*, (iii) étude toxicologique et pharmacologique de la plante et la possibilité de l'utiliser soit comme médicament pour traiter les maladies qui nécessitent l'inhibition de la XO et/ou scavenge des radicaux libres et/ou l'inhibition de la peroxydation lipidique, ou comme additif antioxydant naturel dans les produits alimentaires au lieu d'utiliser les antioxydants synthétiques afin de retarder la peroxydation lipidique dans les aliments, et contourner les effets indésirables de ces produits.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abadeh S., Killacky J., Benboubetra M. and Harrison R. (1992) Purification and partial characterisation of xanthine oxidase from human milk. *Biochem. Biophys.* **1117**, 25-32.
- Adachi T., Fukushima T., Usami Y. and Hirano K. (1993) Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochem. J.* **289**, 523-527.
- Afanas'ev I. B. (2009) Signaling mechanisms of oxygen and nitrogen free radicals, *CPC Press*. pp: 1-71.
- Ahmad S. (1995) Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. 1st Ed. *Chapman & Hall*. New York. pp: 1-457.
- Ahsan H., Ali A. and Ali R. (2003) Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and experimental immunology.* **131**, 398-404.
- Al Yahya M. A. (1986) Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia. *Fitoterapia.* **52 (3)**, 179-182.
- Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. and Trinajstić N. (2003) Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatica Chemica Acta.* **76**, 55-61.
- Anderson R.S. (2001) Reactive oxygen species and antimicrobial defenses of invertebrates: a bivalve model. *Adv Exp Med Biol.* **484**, 131-139.
- Aslan A., Güllüce M., Sökmen M., Adigüzel A., Sahin F. and Özkan H. (2006) Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharm. Biol.* **44**, 247-252.
- Astulla A., Zaima K., Matsuno Y., Hirasawa Y., Ekasari W., Widyawaruyanti A., Zaini N. C. and Morita H. (2008) Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *J Nat Med.* **62**, 470-472
- Atmani D., Benboubetra M. and Harrison H. (2004) Goat's milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum. *J. Dairy Res.* **71**, 7-13.

- Atoui A.K., Mansouri A., Boskou G. and Kefalas P. (2005) Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*. **89**, 27-36.
- Avis P.G., Bergel F. and Bray R.C. (1956) Cellular constituents. The chemistry of xanthine oxidase. Part III. Estimations of the cofactors and the catalytic activities of enzyme fractions from cow's milk. *Journal of the Chemistry Society*. 1219-1226.
- Baghiani A., Arrar L. and Benboubetra M. (2002) Purification and comparative kinetic study of the milk molybdoflavoenzyme, xanthine oxidoreductase, from different species. In "Chapman S., Perham R. Scrutton N. and Weber R. (Eds.), *Flavins and flavoproteins 2002*". Agency for Scientific Publications, Berlin. pp: 837-844.
- Baghiani A., Harrison R. and Benboubetra M. (2003) Purification and partial characterization of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry*. **111**, 407-414.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M. and Gazin M. (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh / Drug Res*. 1-6.
- Balaban R.S., Nemoto S. and Finkel T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. **120**, 483-495.
- Barriere C., Centeno D., Lebert A., Leroy-Setrin S., Berdague J.L. and Talon R. (2001) Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters*. **201**, 181-185.
- Bartosz G. (2003) Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. **9**, 5-21.
- Batelli M. G., Musiani S., Valgimigli M., Gramantieri L., Tomassoni F., Bolondi L., and Stirpe F. (2001) Serum xanthine oxidase in human liver disease. *Am J Gastroenterol*. **96**, 1194-1199.
- Beani J. C. (1995) Actions biologiques du rayonnement solaire sur la peau. *Rev Int Péd*. **259**, 2-7.

- Beckman K.B. and Ames B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547-581.
- Benboubetra M., Baghiani A., Atmani D. and Harrison H. (2004) Physiochemical and kinetic properties of purified sheep's milk xanthine oxidoreductase. *J. Dairy Sci.* **87**, 1580-1584.
- Belviranlı M. and Gökbel H. (2006) Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *Eur. J. Gen. Med.* **3**, 126-131.
- Berger M.M. (2006) Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* **20**, 48-53.
- Berry CE. and Hare JM. (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiology.* **555**, 589-606.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E. and Sapirstein H.D. (2005) Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem.* **82**, 390-393.
- Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. and Trotin F (1980) Plantes médicinales des régions tempérées, *Ed.Maloine, Paris.* pp: 156.
- Blake D. R., Stevens C. R., Sahinoglu T. M., Ellis G., Gaffney K., Edmonds S., Benboubetra M., Harrison R., Jawed S., Kanezler J., Millar T. M., Winyord P. G. and Zhang Z. (1997) Xanthine oxidase; four roles for the enzyme in rheumatoid pathology. *Biochem Soc Trans.* **25**, 812-816.
- Bovy A. (2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry.* **65**, 2631-2648.
- Bondet V., Williams W.B. and Berset C. (1997) Kinetic and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel -Wissenschaft und Technologie.* **30**, 609-615.
- Boukef K. (1982) Pharmacopée tunisienne traditionnelle: Harmel. *Le pharmacien du Maghreb.* **2**, 38-40.

- Boumerfeg S., Baghiani A., Messaoudi D., Seddik K. and Arrar L. (2009) Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effect of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytotherapy Research*. **23**, 283-288.
- Borges F., Fernandes E., and Roleira F. (2002) Progress Towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*. **9**, 195-217.
- Bray R.C. (1975) Molybdenum iron-sulfer flavin hydroxylases and related enzymes. In " Boyer P.D (Eds.), The enzymes" 3rd Ed. *Academic Press*, New York. pp: 299-419.
- Brown J.E., Khodr H., Hider R.C. and Rice-Evans C. (1998) Structural dependence of flavonoïdes interactions with Cu²⁺ ions : implication for their antioxidant properties. *The Biochemical journal*. **330**, 1173-1178.
- Bruneton J. (1999) Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^{ème}Ed Tec & Doc, pp: 1120.
- Burits M. and Bucar F. (2000) Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. **14**, 323-328.
- Cadenas E. and Davies J.A. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222-230.
- Cai H. (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular Research*. **68(1)**, 26-36.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y. and Mohammed, O. (2007) Antioxidant and antibacterial activity of leaves of etlingera species (Zingiberaceae) in peninsular Malaysia. *Food Chemistry*. **104**, 1586-1593.
- Chiang H.C., Lo Y.J. and Lu F.J. (1994) Xanthine oxidase inhibitions from leaves of *Alsophila spinulosa* (Hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibitions*. **8**, 61-71.
- Chinnaiyan A.M. (2001) Molecular signatures of sepsis: multiorgan gene expression profiles of systemic inflammation. *Am J Pathol*. **159**, 1199–1209.
- Closa D., and Folch-Puy E. (2004) Critical Review Oxygen Free Radicals and the Systemic Inflammatory Response. *IUBMB Life*. **56**, 185–191.
- Comhair S.A.A. and Erzurum S.C. (2002) Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol*. **283**, 246-255.

- Conner E. M. and Grisham M. B. (1996) Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*. **12**, 274-277.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J. P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietinck A. V. and Berghe D. K. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod*. **61**, 71-76.
- Costantino L., Albasini A., Rastelli G. and Benvenuti S. (1992) Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Med*. **58**, 342-345.
- Cotelle N. (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem*. **1**, 569-590.
- Cowan M.M. (1999) Plant products as antimicrobiol agents. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**, 564-582.
- Cuendet M., Hostettmann K. and Potterat O. (1997) Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*. **80**, 1144-1152.
- Cuzzocrea S., Riley D.P., Caputi A.P. and Salvemini D. (2001) Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacol. rev.* **53 (1)**, 135-159.
- Da Silva S.L., Da Silva A., Honório K.M., Marangoni S., Toyama M.H. and Da Silva A.B.F. (2004) The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*. **684**, 1-7.
- Decker E. A. and Welch B. (1990) Role of Ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem*. **38**, 674-677.
- DeJong J. W., Schoemaker R., Jonge R., Bernocchi P., Keijzer E., Harrison R., Sharma H. S. and Ceconi C. (2000) Enhanced expression and activity of xanthine oxidoreductase in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol*. **32**, 2083–2089.
- Dorman H.J.D., Peltoketoa A., Hiltunena R. and Tikkanen M.J. (2003) Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry*. **83**, 255-262.

- Dröge W. (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* **82** (1), 47-95.
- Elmastaş M., Gülçin İ., Işildak Ö., Küfrevioğlu Ö.İ., İbaoğlu K. and Aboul-Enein .H.Y. (2006) Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society.* **3**, 258-266.
- Enroth C., Eger B. and Nishino T. (2000) Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *J Bioch.* **97**, 10723–10728.
- Erlund I. (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research.* **24**, 851-874.
- Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. and Jurgens G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* **13**, 341.
- Evans W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 647-652.
- Faure P. and Bonnefont-Rousselot D. (2005) Stress oxydant, diabète sucré et produits de glycation avancée. In “Delattre J, Beaudeau J.L., Bonnefont-Rousselot, D. (Eds.), Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques”. Editions médicales internationales. *Lavoisier édition, TEC & DOC*, Paris. pp: 354-376.
- Favier A. (2003) Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique.* 108-115.
- Ferrari C.K.B. (2001) Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *International Medical Journal.* **8**, 175-184.
- Ferraz Filha Z.S., Vitolo I.F., Fietto L.G., Lombardi J.A. and Saúde-Guimarães D.A. (2006) Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (Arnica). *Journal of Ethnopharmacology.* **107**, 79-82.
- Finkel T. and Holbrook N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* **408**, 239-247.

- Garait B. (2006) Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'université *JOSEPH FOURIER*.
- Ginger L. A., Kosila N., Elkins N. D., Essary B., McManaman J. L. and Repine J. E. (2004) Mononuclear phagocyte xanthine oxidoreductase contributes to cytokine-induced acute lung injury. *Am J Respiratory Cell Molecular Biology*. **30**, 479-490.
- Goel N., Singh N., and Saini R. (2009) Efficient *in vitro* multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala* L.) using 6 benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. *Nature and Science*. **7(7)**, 1545-0740.
- Govindarajan R., Vijayakumar M. and Pushpangadan P. (2005) Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana' herbs of *Ayurveda*. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**, 165-178.
- Goudable J. and Favier A. (1997) Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **11**, 115-20.
- Graham H.D. (1992) Modified Prussian Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **40**, 801-805.
- Hadi M. (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractères prooxydants ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur Domaine : Pharmacochimie. pp : 155.
- Hale A. L. (2003) Screening Potato Genotype for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. *Office of Graduate Studies of Texas A&M University-Genetics*. pp: 260.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. In "Free radicals in biology and medicine". 3rd Ed. *Oxford University Press*. pp: 1-543.
- Hallman P.C.H., Trijp L.M.P., Buysman M.N.C.P., Gaag M.S., Mengelers J.B., De vries J.H.M. and Katan M.B. (1997) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*. **418**, 152-156.
- Harrison R. (2002) Structure and function of Xanthine oxidoreductase : where we now ?. *Free Radic Biol Med*. **33**, 774-797.

- Harrison D., Griendling K.K., Landmesser U., Hornig B. and Drexler H. (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. **91**, 7-11.
- Harrison R. (2004) Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. *Free Radic Biol Med*. **36**, 363-375.
- Hatono T., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Fujita Y., Yasuhara T., *et al.* (1989) Effects of the interaction of tannins with co-existing substances VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **37**, 2016-2021.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R. and Bobilya D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships. *J. Nut. Biochem*. **13**, 572–584.
- Hille R. and Massey V. (1981) Tight-binding inhibitors of xanthine oxidase. *Pharmac Ther*. **14**, 249-263.
- Hussain S. P., Hofseth L. J. and Harris C. C., (2003) Radical causes of cancer. *Nature*. **3**, 276-285.
- Ichimori K., Fukahori M., Nakazawa H., Okamoto K. and Nishino T. (1999) Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form. *J Biol Chem*. **274**, 7763-7768.
- Iserin P. (2001) Encyclopedia of Medicinal Plants. *La Rousse*. (2nd Edition). pp: 244-245.
- Ishii K., Furuta T. and Kasuya Y. (2003) High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*. **749**, 49-56.
- Javanovic S. V., Steenken S., Tomic M., Marjanovic B., Simic M. J. (1994) Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc*. **116**, 4846-4851.
- Kimura Y., Okuda T., Hatono T., Agata I., and Arichi S. (1985) Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. **33**, 2028-2034.

- Koehler-Ramonatxo C. (2006) Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*. **20**, 165-177.
- Kohen R., and Nyska A. (2002) Oxidation of Biological Systems. Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic pathology*. **30(6)**, 620–650.
- Kong L.D, Cai Y., Huang W.W., Cheng C.H. and Tan R.X. (2000) Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *J. Ethnopharmacol.* **73**, 199-207.
- Kouri G., Tsimogiannis D., Bardouki H. and Oreopoulou V. (2007) Extraction and analysis of antioxidant components from *Origanum dictamnus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **8**, 155-162.
- Krause K.H. (2004) Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, 28-29.
- Kuwabara T., Nishino K., Okamoto T., Matsumura B., Eger T., Pai E. F. and Nishino T. (2003) Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. *J PNAS USA*. **100**, 8170-8175.
- Lawson A.M. (2006) Etude phytochimique d'une fabacée tropicale, *Lonchocarpus Nicou*, évaluation biologique préliminaire. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'université de Limoges.
- Le K., Chiu F. and Ng K. (2007) Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*. **105**, 353-363
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P. and Prost M. (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. **30**, 1076-1081.
- 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. *Biochem. And Biophys. Res. Commun.* **294**, 167-172.

- Lum H. and Roebuck K.A. (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **280** (4), 719-741.
- Madamanchi N.R., Vendrov A. and Runge M.S. (2005) Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* **25**: 29.
- Markham K.R. (1982) Techniques of flavonoid identification. Academic press, London, Chap. 1 and 2: 1-113.
- Marti R., Varela E., Pascual C. and Segura R. M. (2001) Determination of xanthine oxidoreductase forms: influence of reaction conditions. *Clin Chim Acta.* **303**, 117–125.
- Martin H. M., John T., Hancock V.S., and Harrison R. (2004) Role of Xanthine Oxidoreductase as an Antimicrobial Agent. *J Microbiology.* **72**, 4933–4939.
- Martínez-Cayuela M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* **77**, 147-161.
- Mates J.M., Perez-Gomez C. and Nunez de Castro I. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32**, 595-603.
- Mauro S. (2006). The role of antioxidants in disease prevention. *Nutrition and coexisting disease.* **12**, 533-535.
- Mc Cord J. M. and Fridovich I. (1968) The Reduction of Cytochrome c by Milk Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.* **243** (21), 5753-5760.
- Mc Cord J. M. (1995) Superoxide Radical: Controversies, Contradictions and Paradoxes. *Proc Soc Exp Biol Med.* **202**, 112-117.
- McManaman J. L. and Bain D. L. (2002) Structural and conformational analysis of the oxidase to dehydrogenase conversion of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem.* **277**, 212-618.
- Meneshian A. and Gregorgy B. (2002) The Physiology of Endothelial Xanthine Oxidase: From Urate Catabolism to Reperfusion Injury to Inflammatory Signal Transduction. *Microcirculation.* **9**, 161–175.
- Mondal S. M., Sau A. K. and Mitra S. (2000) Mechanism of the inhibition of milk xanthine activity by metal ions: A transient kinetic study. *Biochem Biophys Acta.* **1480**, 302-310.

- Monsif H. R., Ghobadi A. and Iranshahi M. (2004) Antinociceptive effects of Peganum harmala L. alkaloid extract on mouse formalin test. *J Pharm Pharmaceu Sci.* **7(1)**, 65-69.
- Montoro P., Braca A., Pizza, C. and De Tommasi N. (2005) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food. Chem.* **92(2)**, 349–355.
- Molyneux P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **26**, 211-219.
- Moridani M.Y., Pourahmad J., Bui H., Siraki A. and O'Brien P.J. (2003) Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic. Boil. Med.* **34**, 243-253.
- Morris C.J., Earl J.R., Trenam C.W. and Blake D.R. (1995) Reactive oxygen species and iron- a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology.* **27**, 109-122.
- Nagai T., Reiji I., Hachiro I. and Nobutaka S. (2003) Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry.* **80**, 29-33.
- Nagler R.M. (2002) Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med.* **32**, 268–277.
- Nakamura M. and Yamazaki I. (1982). Preparation of bovine milk xanthine oxidase as dehydrogenase form. *The Journal of Biochemistry.* **92**, 1279-1286.
- Newman P.R., Timmerman B.N. and Marby T.J. (1974) Laboratory manual for the systematic identification of flavonoids.
- Nishino T. (1997) The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J Biol Chem.* **272**, 29859-29864.
- Nishino T., Okamoto K., Yuko K., Hiroyuki H., Matsumura T., Bryan T. E. and Emil F. P. (2005) Mechanism of the Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Xanthine Oxidase. *J Biol Chem.* **280**, 24888–24894.

- Okado-Matsumoto A. and Fridovich I. (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 38388-38393.
- Okamoto K., Eger B. T., Nishino T., Kondo S., Pai E. F. and Nishino T. (2003) An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem.* **278**, 1848-1855.
- Pacher P., Nivorozhkin A. and Szabo C. (2006) Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev.* **58**, 87–114.
- Parks, D. A. and Granger, D. N. (1986) Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand.* **548**, 87-99.
- Peluso M.R. (2006) Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp. Biol. Med.* **231**, 1287-1299.
- Perez H. D., Weksler B. B. and Goldstein I. M. (1990) Generation of chemotactic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxide generation system. *Inflammation.* **4**, 313-328.
- Pietta P. G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* **63**, 1035-1042.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. and Defraigne J.O. (2002) Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* **16**, 233-239.
- Price M.P. and Butler L.G. (1977) Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **25**, 1268-1273.
- Psotová J., Lasovsky J. and Vicar J. (2003) Metal-Chelating Properties, Electrochemical Behavior, Scavenging And Cytoprotective Activities Of Six Natural Phenolics. *Biomed. Papers.* **147(2)**, 147 -153.
- Ricciarelli R., Zingg J.M. and Azizi A. (2001) Vitamin E: protective role of a Janus molecule. *FASEB. Jl.* **15**, 2314-2325.

- Richard M. and John E. (2007) Methods of Modulating Inflammatory Reactions By Modulating Xanthine Oxidoreductase Activity. *Am j Respir Cell Mol Biol.* **60**, 505-522.
- Robak J. and Gryglewski R.J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 837-841.
- Sanders S., Eisenthal R.S. and Harrison R. (1997) NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase – reneration of superoxyde anion. *Eur. J. Biochem.* **245**, 541-548.
- Schewe T. and Sies H. (2003) Flavonoids as protectants against prooxidant enzymes. *Biologie médicale.* **34**, 243-253.
- Schmeda-Hirschmann G., Zuniga J., Dutra-Behrens M. and Habermehl G. (1996) Xanthine oxidase inhibitory activity of flavonoids and tannins from *Hexachlamys edulis* (Myrtaceae). *Phytotherapy Research.* **10**, 260-262.
- Schnackenberg C.G. (2002) Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **282** (2), 335-342.
- Seib K.L., Wu H.J., Kidd S.P., Apicella M.A., Jennings M.P. and McEwan A.G. (2006) Defenses against Oxidative Stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a System Tailored for a Challenging Environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70** (2), 344-361.
- Shamma'a M. H., Nasrallah S. and Al-Khalidi M. (2000) Serum xanthine oxidase An experience with patients. *Dig Dis.* **18**, 15–22.
- Sharififar F., Dehghan-Nudeh G. and Mirtajaldini M. (2008) Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry.* 1-19.
- Skibo E.B. (1986) Non competitive and irreversible inhibition of xanthine oxidase by benzimidazole analogues acting at functional flavin adenine dinucleotide cofactor. *Biochemistry.* **25**, 4189-4194.
- Sorg O. (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies.* **327**, 649-662.
- Stewart R. C., Hille R. and Massey V. (1984) Characterization of arsenite-complexed xanthine oxidase at room temperature. Spectral properties and pH-dependant redox behaviour of the molybdenum-arsenite center. *J Biol Chem.* **259**, 14426-14436.

- Stocker R.S. and Keaney J.F.Jr. (2004) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **84**, 1381-1478.
- Suresh Kumar K., Ganesan K. and Subba Rao P.V. (2008) Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - an edible seaweed. *Food Chemistry.* **107**, 289-295.
- Sweeney A.P., Wyllie S.G., Shalliker R.A. and Markhan J.L. (2001) Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. *Journal of Ethnopharmacology* **75**, 273-277.
- Takimoto E. and Kass D.A. (2007) Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. *Hypertension.* **49**, 241.
- Tahrouch S., Rapior; S., Mondolot-Cosson L., Idrissi-Hassani L. A.; Bessière J. M. et Andary C. (2002) *Peganum harmala*: source combinée d'aromes et de colorants. *Rev. Biol. Biotech.* **2**. 33-37
- Taniyama Y. and Griendling K.K. (2003) Reactive Oxygen Species in the Vasculature Molecular and Cellular Mechanisms, *Hypertension.* **42**, 1075.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. and Polissiou M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry.* **90**, 333-340.
- Touyz R. M. (2004) Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension What Is the Clinical Significance?. *Hypertension.* **44**, 248-252.
- Tremellen, K. (2008) Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Human Reproduction Update.* **14(3)**, 243-258.
- Tsimogiannis D.I. and Oreopoulou V. (2004) Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5,7,3',4'-hydroxy-substituted flavonoids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* **5**, 523-528.
- Umamaheswari M., Asok-Kumar K., Somasundaram A., Sivashanmugam T., Subhadradevi V. and Ravi T.K. (2007) Xanthine oxidase inhibitory activity of some Indian medical plants. *Journal of Ethnopharmacology.* **109**, 547-551.

- Valentao P., Fernandes E., Canvalho E., Andrade P.B., Seabra R.M. and Bastos M.L. (2002) Antioxidant activity of *Hypericum androsaenum* infusion scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **25**, 1324-1327.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M. and Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*. **39**, 44-84.
- Van Acker S.A.B.E., Van Den Berg D.J., Tromp M.N.L., Griffioen D.H., Bennenkom W.P.V., Van Der Vijgh W.J.F. and Bast A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical biology & medicine*. **20**, 331-342.
- Van Acker S.A.B.E., Van Balen G.P., Van den Berg D.J., Bast A. and Van der Vijgh W.J.F. (1998) Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*. **56**, 935-943.
- Vermerris W., Nicholson R. (2006) Phenolic compound biochemistry. *Springer*. PP: 69-149.
- Vorbach C., Harrison R. and Mario R. (2003) Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *J Immunology*. **24**, 512-517.
- Warner D. S., Sheng H. and Batinić-Haberle I. (2004) Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J. Exp. Biol.* **207**, 3221-3231.
- Wassmann S., Wassmann K. and Nickenig G. (2004) Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension*. **44**, 381.
- Williamson G., Day A.J., Plumb G.W. and Couteau D. (2000) Human metabolic pathways dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions*. **28**, 16-22.
- Wong S.P., Leong L.P. and William Koh J.H. (2006) Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*. **99**, 775-783.
- Yang J.H., Lin H.C. and Mau J.L. (2002) Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*. **77**, 229-235.
- Yokozawa T., Chen C.P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G.I. and Nishioka I. (1998) Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical Pharmacology*. **56**, 213-222.

- Yoshikawa T. and Naito Y. (2000) The role of neutrophils and inflammation in gastric mucosal injury. *Free Radical Researc.* **33**, 785-794.
- Zhao H., Fan W., Dong J., Lu J., Chen J., Shan L., Lin Y. and Kong W. (2008) Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties. *Food Chemistry.* **107**, 296-304.
- Zhang D. X. and Gutterman D. D. (2007) Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **292**, 2023-2031.
- Zhu J.X., Wang Y., Kong L.D., Yang C. and Zhang X. (2004) Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology.* **93**, 133-140.
- Zweier J.L. and Hassan Talukder M.A. (2006) The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovas. Res.* **70(2)**, 181-190.