



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية عاوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale.. قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Toxicologie*

Intitulé :

L'effet antioxydant des polyphénols:

Etude in vitro

Présenté et soutenu par :

Le : 17 /09/2020

BOUDJELAL ASMA

KEBAILI OUIAM

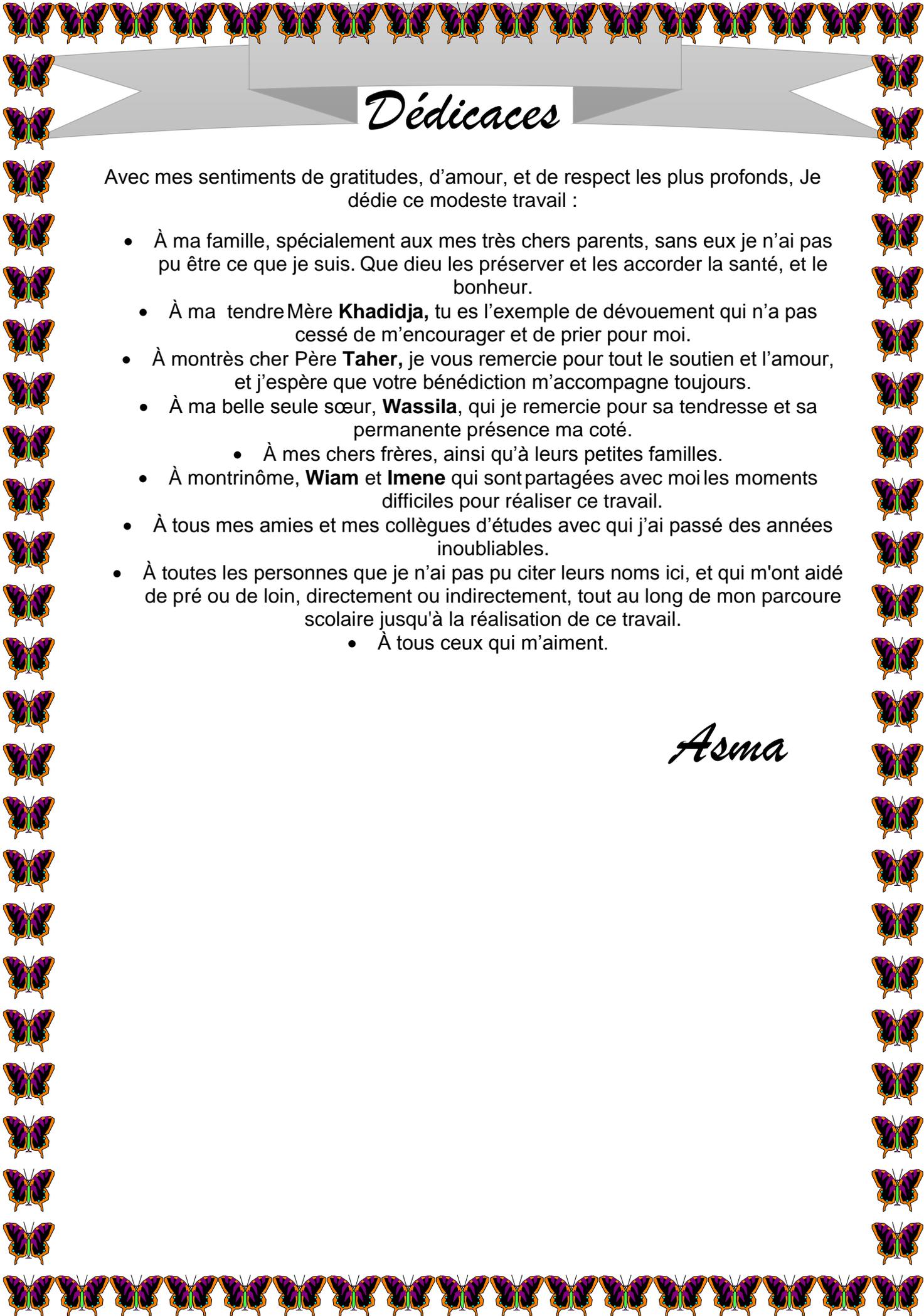
MEZIANI IMENE

Président du jury : BOULDJADJ Redoiane Docteur- UFM Constantine.

Rapporteur : MENAD Ahmed. Professeur - UFM Constantine

Examineurs : BOULKANDOUL Ramzi Docteur - UFM Constantine

Année universitaire
2019- 2020

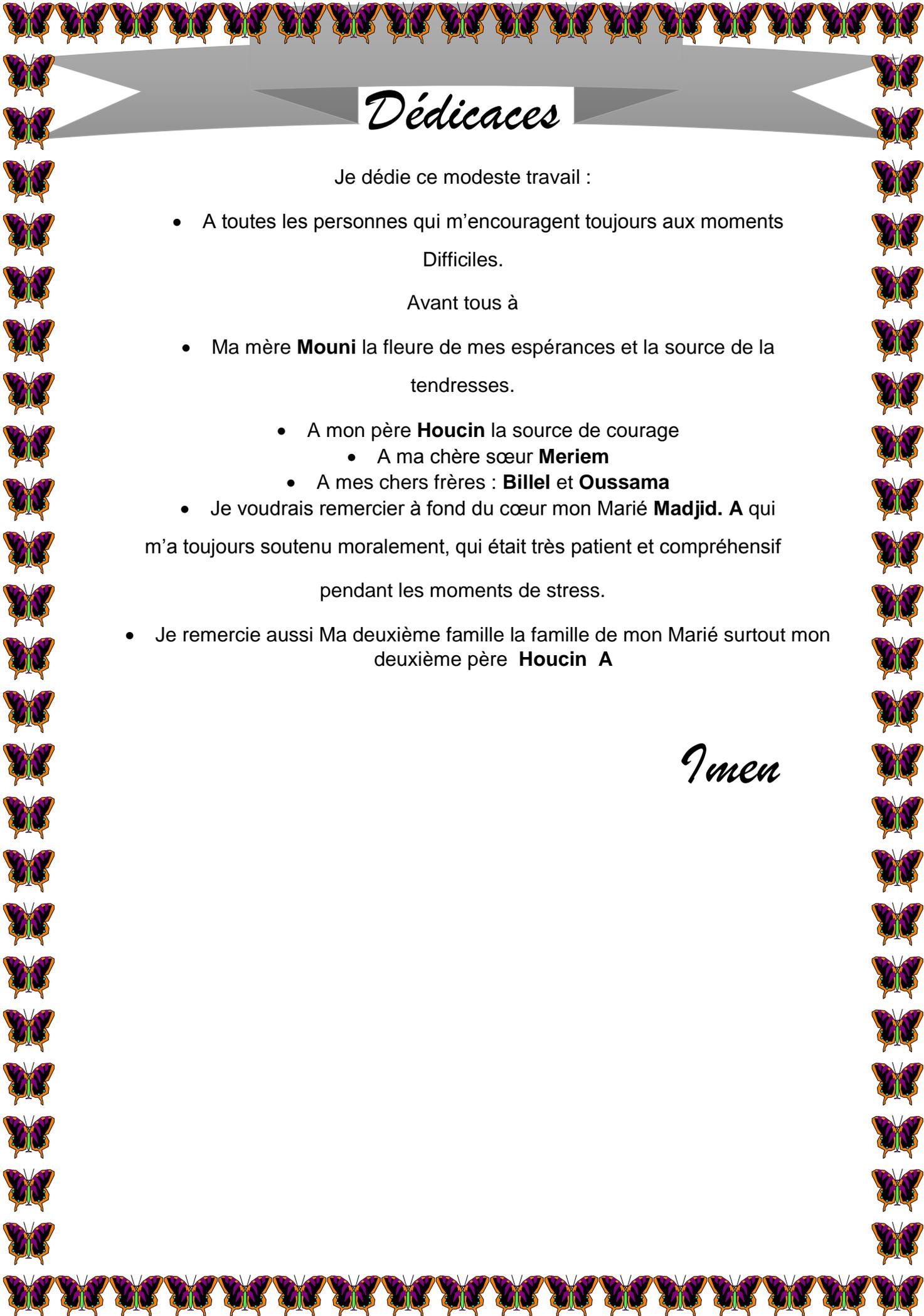


Dédicaces

Avec mes sentiments de gratitude, d'amour, et de respect les plus profonds, Je dédie ce modeste travail :

- À ma famille, spécialement aux mes très chers parents, sans eux je n'ai pas pu être ce que je suis. Que dieu les préserver et les accorder la santé, et le bonheur.
- À ma tendre Mère **Khadidja**, tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.
- À mon très cher Père **Taher**, je vous remercie pour tout le soutien et l'amour, et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.
- À ma belle seule sœur, **Wassila**, qui je remercie pour sa tendresse et sa permanente présence ma côté.
 - À mes chers frères, ainsi qu'à leurs petites familles.
- À mon trinôme, **Wiam** et **Imene** qui sont partagées avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.
- À tous mes amies et mes collègues d'études avec qui j'ai passé des années inoubliables.
- À toutes les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui m'ont aidé de pré ou de loin, directement ou indirectement, tout au long de mon parcours scolaire jusqu'à la réalisation de ce travail.
 - À tous ceux qui m'aiment.

Asma

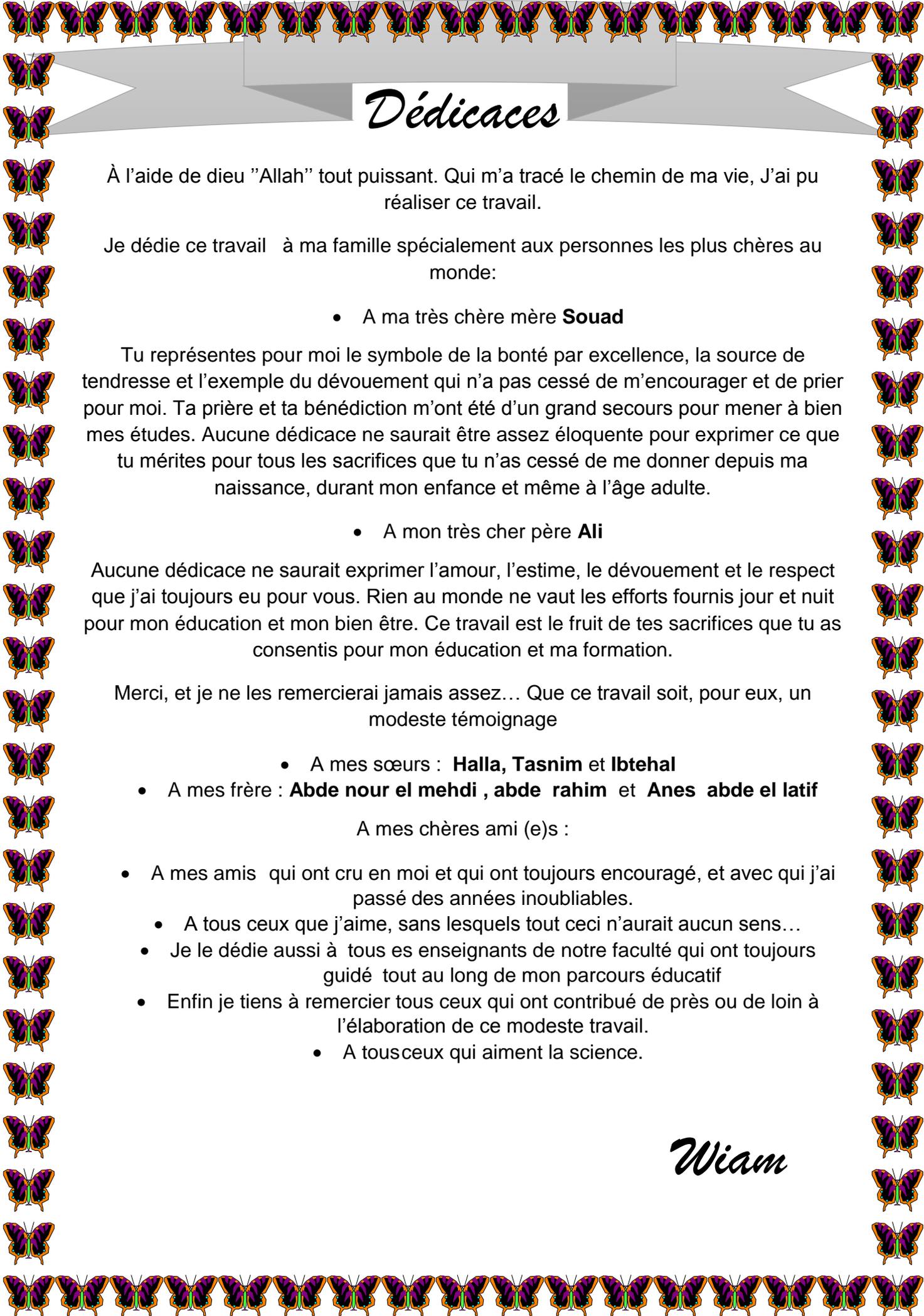


Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- A toutes les personnes qui m'encouragent toujours aux moments
Difficiles.
Avant tous à
 - Ma mère **Mouni** la fleure de mes espérances et la source de la
tendresses.
 - A mon père **Houcin** la source de courage
 - A ma chère sœur **Meriem**
 - A mes chers frères : **Billel** et **Oussama**
 - Je voudrais remercier à fond du cœur mon Marié **Madjid. A** qui
m'a toujours soutenu moralement, qui était très patient et compréhensif
pendant les moments de stress.
- Je remercie aussi Ma deuxième famille la famille de mon Marié surtout mon
deuxième père **Houcin A**

Inmen



Dédicaces

À l'aide de dieu "Allah" tout puissant. Qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde:

- A ma très chère mère **Souad**

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

- A mon très cher père **Ali**

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

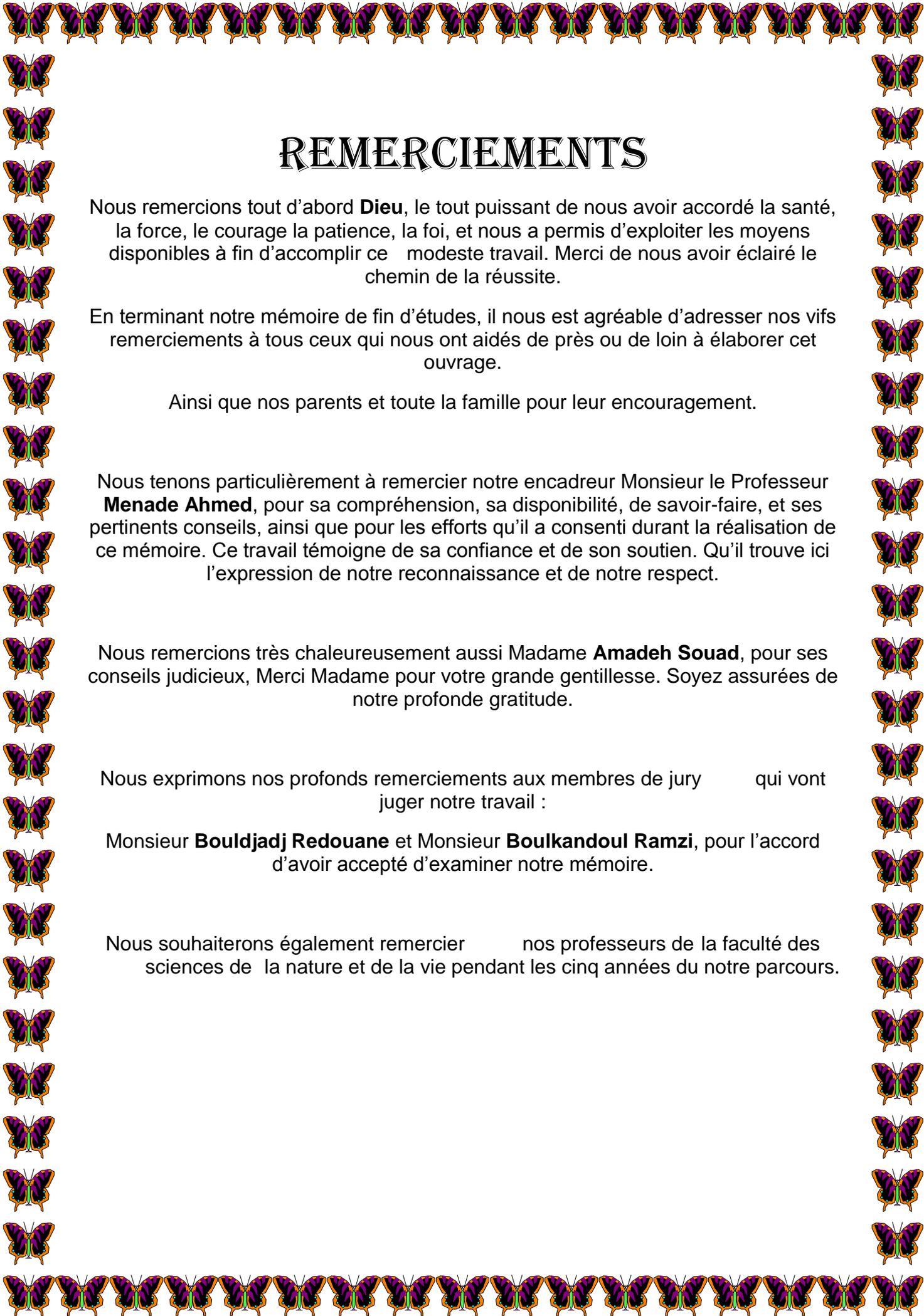
Merci, et je ne les remercierai jamais assez... Que ce travail soit, pour eux, un modeste témoignage

- A mes sœurs : **Halla, Tasnim et Ibtehal**
- A mes frère : **Abde nour el mehdi , abde rahim et Anes abde el latif**

A mes chères ami (e)s :

- A mes amis qui ont cru en moi et qui ont toujours encouragé, et avec qui j'ai passé des années inoubliables.
 - A tous ceux que j'aime, sans lesquels tout ceci n'aurait aucun sens...
 - Je le dédie aussi à tous es enseignants de notre faculté qui ont toujours guidé tout au long de mon parcours éducatif
 - Enfin je tiens à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.
 - A tousceux qui aiment la science.

Wiam



REMERCIEMENTS

Nous remercions tout d'abord **Dieu**, le tout puissant de nous avoir accordé la santé, la force, le courage la patience, la foi, et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

En terminant notre mémoire de fin d'études, il nous est agréable d'adresser nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à élaborer cet ouvrage.

Ainsi que nos parents et toute la famille pour leur encouragement.

Nous tenons particulièrement à remercier notre encadreur Monsieur le Professeur **Menade Ahmed**, pour sa compréhension, sa disponibilité, de savoir-faire, et ses pertinents conseils, ainsi que pour les efforts qu'il a consenti durant la réalisation de ce mémoire. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respect.

Nous remercions très chaleureusement aussi Madame **Amadeh Souad**, pour ses conseils judicieux, Merci Madame pour votre grande gentillesse. Soyez assurées de notre profonde gratitude.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre travail :

Monsieur **Bouldjadj Redouane** et Monsieur **Boukandoul Ramzi**, pour l'accord d'avoir accepté d'examiner notre mémoire.

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des sciences de la nature et de la vie pendant les cinq années de notre parcours.

Table des matières

Liste des abbréviations	1
Liste des figures	2
Liste des tableaux	3
Résumé	4
Abstract	5
الملخص	6
INTRODUCTION	8
CHAPITRE I. STRESS OXYDATIF	11
1.1. Définition	12
1.2. Origine du stress oxydatif	12
1.3. Les radicaux libres	13
1.4. Rôles physiologiques des espèces réactives	14
1.5. Les principales sources des radicaux libres	15
1.5.1. Sources endogènes des dérivés réactifs de l'oxygène	17
1.5.1.1. La mitochondrie	17
1.5.1.1.1. La chaîne respiratoire mitochondriale	17
1.5.1.1.2. La production des ROS par la mitochondries	18
1.5.1.1.3. Stress oxydant et dysfonctionnement mitochondrial	20
1.5.1.2. Réticulum Endoplasmique	21
1.5.1.2.1. Les cytochrome P450	21
1.5.1.3. Sources enzymatiques	21
1.5.1.3.1. NADPH oxydase (NOS)	21
1.5.1.3.2. Les oxydases des peroxysomes	22
1.5.1.3.3. Xanthine déshydrogénase (XDH) et xanthine oxydase (XO)	23
1.5.2. Sources exogènes des espèces réactives de l'oxygène	23
1.5.2.1. Les rayonnements UV	24
1.5.2.2. Les médicaments	24
1.5.3. Les différents types des radicaux libres	24
1.5.3.1. Espèces réactives oxydantes (ROS)	25
1.5.3.1.1. Les ROS radicalaires	27
1.5.3.1.1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)	27
1.5.3.1.1.2. Le radical hydroxyle (OH^{\bullet})	28

1.5.3.1.1.3. Le radical peroxy RO_2	28
1.5.3.1.1.4. Le radical alkoyle $RO\cdot$	29
1.5.3.1.2. ROS non radicalaires	29
1.5.3.1.2.1. Le peroxyde d'hydrogène	29
1.5.3.1.2.2. L'oxygène singlet (1O_2)	30
1.5.3.1.2.3. L'acide hypochloreux (HOCl)	30
1.5.3.2. Les espèces réactives azotées (RNS)	31
1.5.3.2.1. Les RNS radicalaires	31
1.5.3.2.1.1. Le monoxyde d'azote	31
1.5.3.2.1.2. Le dioxyde d'azote $NO_2\cdot$	31
1.5.3.2.1.3. Le peroxy-nitrite	31
1.5.3.2.2. Les RNS non radicalaires.	32
1.5.3.2.2.1. Peroxy-nitrite $OONO^-$	32
CHAPITRE II. SYSTEMES ANTIOXYDANTS	33
2.1. Définition	34
2.2. Les différents sites cellulaires des antioxydants	34
2.3. Les différents types des antioxydants	34
2.3.1. Les antioxydants endogènes	35
2.3.1.1. Les antioxydants enzymatiques	35
2.3.1.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)	35
2.3.1.1.2. La catalase	36
2.3.1.1.3. La Glutathion peroxydase (GPX) et reductase (GR)	37
2.3.1.1.4. Glutathion-S-transférase	38
2.3.1.2. Les antioxydants non enzymatique	38
2.3.1.2.1. L'acide urique	38
2.3.1.2.2. Glutathion	39
2.3.1.2.3. La bilirubine	39
2.3.1.2.4. Le Coenzyme Q10	40
2.3.2. Les systèmes antioxydant exogènes	40
2.3.2.1. Les vitamines	40
2.3.2.1.1. Vitamine C	40
2.3.2.1.2. La vitamine E (Vit E)	41
2.3.2.1.3. Les oligoéléments	41

2.3.2.1.3.1. le sélénium	41
2.3.2.1.3.2. le zinc	42
2.3.2.1.3.3. le manganèse	42
2.3.2.1.3.4. Le cuivre	42
2.3.2.2. Les caroténoïdes	43
2.3.2.3. Les polyphénols	43
2.4. Effets indésirables des radicaux libres	43
2.4.1. Effets métaboliques et cellulaires des radicaux libres sur l'organisme	43
2.4.1.1. Les protéines	44
2.4.1.1.1. Stress oxydatif et altérations des protéines et des acides aminés	44
2.4.1.2. L'ADN	46
2.4.1.2.1. Les dommages de l'ADN	47
2.4.1.2.1.1. Les dommages oxydatifs de l'ADN	48
2.4.1.2.1.2. Les effets indirects des ROS sur l'ADN	48
2.4.1.3. Les lipides	50
2.4.1.3.1. La peroxydation lipidique	51
2.4.1.3.1.1. Les facteurs inducteurs de la peroxydation des lipides	51
2.4.1.3.1.2. Les voies d'oxydation des lipides	51
2.4.1.3.1.2.1. L'oxydation enzymatique des lipides	52
2.4.1.3.1.2.2. La peroxydation non-enzymatique	52
2.4.1.3.1.2.3. Mécanisme de la peroxydation lipidique	53
2.4.1.3.1.2.3.1. Peroxydation lipidique par initiations radicalaire	53
2.4.1.3.1.2.3.2. La peroxydation lipidique initiée par l'oxygène singulet	55
2.4.1.3.1.2.4. Les produits issus de la peroxydation lipidique	55
2.4.1.3.1.2.5. Les biomarqueurs et conséquences de la peroxydation lipidique	55
2.4.1.3.1.2.6. L'induction de la peroxydation lipidique model <i>in vitro et in vivo</i>	56
2.4.1.3.1.2.6.1. Le foie	56
2.4.1.3.1.2.6.1.1. Le mécanisme d'induction de la peroxydation lipidique par le FeSO ₄	56
2.4.1.3.1.2.6.1.2. Le mécanisme d'induction de la peroxydation lipidique par Le CCl ₄	56
2.4.1.3.1.2.6.2. Érythrocytes	57
2.4.1.3.1.2.6.2.1. Composition de la molécule d'hémoglobine	59
2.4.1.3.1.2.6.2.2. La synthèse de l'hémoglobine	60
2.4.1.3.1.2.6.2.3. Etat redox érythrocytaire	61

2.4.1.3.1.2.6.2.4. Conséquences pathologiques des ROS sur les érythrocytes	61
CHAPITRE III. LES POLYPHENOLS	63
3.1. Généralités	64
3.2. Localisation des polyphénols dans les plantes	64
3.3. Biosynthèse des polyphénols	65
3.4. Propriétés chimiques des polyphénols	68
3.5. Classifications	69
3.5.1. Les non flavonoïdes	69
3.5.1.1. Les acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)	69
3.5.1.1.1. Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)	69
3.5.1.1.2. Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)	70
3.5.1.2. Les Stilbènes (C6-C2-C6)	70
3.5.1.3. Les lignines (C6-C3) _n	71
3.5.1.4. Les coumarines (C6-C3)	72
3.5.1.5. Les xanthones C6-C1-C6	72
3.5.2. les flavonoïdes (C6-C3-C6)	73
3.5.2.1. Les flavonols	73
3.5.2.2. Les flavones	74
3.5.2.3. Les flavanones	74
3.5.2.4. Les flavan-3-ols(flavanols)	75
3.5.2.5. Les isoflavones	75
3.5.2.6. Les anthocyanes	76
3.5.3. Les tanins (C ₁₅)	76
3.5.3.1. Tanins hydrolysables	77
3.5.3.2. Tanins condensés (proanthocyanidines ou procyanidines)	77
3.6. Rôles et effets biologiques des polyphénols	78
3.6.1. Chez les plantes	78
3.6.2. Chez les êtres humains	79
3.6.2.1. Activité antioxydant	79
3.6.2.1.1. Inhibition enzymatique	80
3.6.2.1.2. Chélation des ions métalliques	81
3.6.2.1.3. Piégeage des radicaux libres	82
3.7. Propriétés thérapeutiques des polyphénols	83

3.7.1. Polyphénols et cancer	83
3.7.2. Polyphénols et maladies cardiovasculaires	84
3.7.3. Polyphénols et inflammation	84
3.7.4. Polyphénols et maladies neurodégénératives	85
3.7.5. Polyphénols et diabète	86
Chapitre IV Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydants des polyphénols <i>in vitro</i>	87
4.1. Les méthodes basées sur le mécanisme HAT	88
4.1. Les méthodes basées sur le mécanisme SET	89
4.3. Critères du choix d'une méthode	89
4.4. Avantages des protocoles expérimentaux unifiés	90
4.5. Évaluation du pouvoir antioxydant (AOC)	91
4.5.1. Les méthodes AOC utilisant des mécanismes de réaction HAT	91
4.5.1.1. ORAC	91
4.5.1.2. TRAP	91
4.5.1.3. Chemiluminescence (CL)	92
4.5.2. Les méthodes AOC utilisant des mécanismes de réaction SET	92
4.5.2.1. Pouvoir antioxydant Réducteur Ferrique (FRAP).	92
4.5.2.2. Test de réduction du cuivre (CUPRAC)	93
4.5.2.3. Avantages/désavantages des tests de réduction du cuivre par rapport au fer	93
4.5.2.4. Sélection d'une méthode de dosage AOC <i>in vitro</i>	93
4-5.3. Les méthodes AOC utilisant des mécanismes HAT et SET à la fois	94
4.5.3.1. Exemples sur les méthodes AOC utilisant des mécanismes HAT et SET à la fois	95
4.5.3.1.1. La méthode du radical 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°)	95
4.5.3.1.1.1. Exemple d'un protocole expérimental du test DPPH°	96
4.5.3.1.2. La méthode du radical 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS)	97
4.5.3.1.2.1. Exemple d'un protocole expérimental du test ABTS ⁺⁺	97
4.5.3.1.3. La méthode du radical (°OH) (Protocole Exemple)	98
V. CONCLUSION	99
VI. REFERENCES	101

Liste des abréviations

ABTS :Acide 2,2'-Azino-Bis(3-éthylbenzoThiazoline-6-Sulphonique)

AOC : Évaluation du pouvoir antioxydant

ATP : Adénosine TriPhosphate

CAA : Test Activité antioxydante cellulaire

CL : Chemiluminescence

CRP : C-Reactive Protein

CUPRAC : Test de réduction du cuivre

DMPD : Test N,N-dimethyl-*p*-Phenylenediamine

DPPH :2,2-DiPhényl-Picrylhydrazyle

ECL : Chemiluminescence améliorée

FRAP : Puissance antioxydante de réduction de la ferrique

HAT : le transfert d'atome d'hydrogène

IOC : Absorption d'oxygène inhibée

LPIC : Capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique

NADH : Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide

ORAC : Capacité d'absorption radicale d'oxygène méthode

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS :Reactive Oxygen Species

SASA : Scavenging de la formation du radicale superoxyde par alcalin

SET : le transfert d'électrons uniques

SOD :SuperOxyde Dismutase

TEAC : Capacité antioxydante équivalente décoloration de Trolox

TOSC : Capacité totale de scavenging oxydant

TRAP : Piégeage radical total Paramètre antioxydant

Liste des figures

Figure 1 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.	13
Figure 2 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.	13
Figure 3: Rôles physiologique des espèces réactives.	15
Figure 4 : Principaux sites cellulaires de productions des ROS	16
Figure 5 : les différentes sources des radicaux libres	16
Figure 6 : La chaîne respiratoire mitochondriale	18
Figure 7 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire	20
Figure 8 : Génération extracellulaire des radicaux libres	24
Figure 9 : Les processus de formation des ROS	26
Figure 10 : Production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale	27
Figure 11 : Les espèces réactives oxygénés (ROS) et leurs systèmes de détoxification.	31
Figure12 : Régulation de la production des ROS par les systèmes antioxydants de défense	34
Figure13 : Localisation et effet des antioxydants au niveau cellulaire	35
Figure 14: Principaux dommages cellulaires induits par les ROS	44
Figure 15: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	45
Figure 16: structure de la molécule d'ADN	47
Figure 17: Différents types d'altérations d'ADN.	47
Figure 18 : Quelques bases oxydées engendrées par les ROS suite à un stress oxydant	48
Figure 19: Les principales réactions d'oxydation des lipides non saturés	51
Figure 20: Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique	52
Figure 21: Principe de la peroxydation lipidique	53
Figure 22 : La chronologie des étapes menant à un changement des acides gras et à la nécrose cellulaire par le tétrachlorure de carbone.	57
Figure 23 : La membrane d'Erythrocyte	59
Figure 24 : Structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte	60
Figure 25 : Représentation des 4 chaînes de globine identiques 2 à 2	60
Figure 26: Schéma d'une molécule d'hème	61
Figure 27: Rôle et effets biologiques des polyphénols	79
Figure 28 : Structure chimique et piégeage du radical libre DPPH	95

Liste des Tableaux

Le Tableau 1 : Nomenclature des principales ROS	25
Tableau 2 : Les produits issus de la peroxydation lipidique	55
Tableau 3: Les méthodes d'évaluation <i>in vitro</i>	90
Tableau 4. Comparaison entre Les différentes méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> .	95

INTRODUCTION

Liste des abréviations

ABTS :Acide 2,2'-Azino-Bis(3-éthylbenzoThiazoline-6-Sulphonique)

AOC : Évaluation du pouvoir antioxydant

ATP : Adénosine TriPhosphate

CAA : Test Activité antioxydante cellulaire

CL : Chemiluminescence

CRP : C-Reactive Protein

CUPRAC : Test de réduction du cuivre

DMPD : Test N,N-dimethyl-*p*-Phenylenediamine

DPPH :2,2-DiPhényl-Picrylhydrazyle

ECL : Chemiluminescence améliorée

FRAP : Puissance antioxydante de réduction de la ferrique

HAT : le transfert d'atome d'hydrogène

IOC : Absorption d'oxygène inhibée

LPIC : Capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique

NADH : Forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide

ORAC : Capacité d'absorption radicale d'oxygène méthode

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS :Reactive Oxygen Species

SASA : Scavenging de la formation du radicale superoxyde par alcalin

SET : le transfert d'électrons uniques

SOD :SuperOxyde Dismutase

TEAC : Capacité antioxydante équivalente décoloration de Trolox

TOSC : Capacité totale de scavenging oxydant

TRAP : Piégeage radical total Paramètre antioxydant

Liste des figures

Figure 1 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.	13
Figure 2 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.	13
Figure 3: Rôles physiologique des espèces réactives.	15
Figure 4 : Principaux sites cellulaires de productions des ROS	16
Figure 5 : les différentes sources des radicaux libres	16
Figure 6 : La chaîne respiratoire mitochondriale	18
Figure 7 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire	20
Figure 8 : Génération extracellulaire des radicaux libres	24
Figure 9 : Les processus de formation des ROS	26
Figure 10 : Production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale	27
Figure 11 : Les espèces réactives oxygénés (ROS) et leurs systèmes de détoxification.	31
Figure 12 : Régulation de la production des ROS par les systèmes antioxydants de défense	34
Figure 13 : Localisation et effet des antioxydants au niveau cellulaire	35
Figure 14: Principaux dommages cellulaires induits par les ROS	44
Figure 15: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	45
Figure 16: structure de la molécule d'ADN	47
Figure 17: Différents types d'altérations d'ADN.	47
Figure 18 : Quelques bases oxydées engendrées par les ROS suite à un stress oxydant	48
Figure 19: Les principales réactions d'oxydation des lipides non saturés	51
Figure 20: Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique	52
Figure 21: Principe de la peroxydation lipidique	53
Figure 22 : La chronologie des étapes menant à un changement des acides gras et à la nécrose cellulaire par le tétrachlorure de carbone.	57
Figure 23 : La membrane d'Erythrocyte	59
Figure 24 : Structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte	60
Figure 25 : Représentation des 4 chaînes de globine identiques 2 à 2	60
Figure 26: Schéma d'une molécule d'hème	61
Figure 27: Rôle et effets biologiques des polyphénols	79
Figure 28 : Structure chimique et piégeage du radical libre DPPH	

Liste des Tableaux

Le Tableau 1 : Nomenclature des principales ROS	25
Tableau 2 : Les produits issus de la peroxydation lipidique	55
Tableau 3: Les méthodes d'évaluation <i>in vitro</i>	90
Tableau 4. Comparaison entre Les différentes méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> .	95

L'effet antioxydant des polyphénols: Etude *in vitro*

Résumé

D'un jour à l'autre, les antioxydants deviennent une partie essentielle de notre vie. Les antioxydants aident à neutraliser ou à détruire les radicaux libres (ROS/RNS) élaborés durant un état physiologique normal ou issues d'un stress oxydant avant qu'ils ne puissent atteindre les biomembranes et endommager les organites cellulaires. Cette étude revoit les différents types des radicaux libres nocifs générés durant les processus métaboliques et donne également un aperçu de l'aspect mécaniste chimique des diverses méthodes évaluant *in vitro* le pouvoir antioxydant des polyphénols. Ces derniers, issues du métabolisme secondaire des différentes espèces végétales, ont fait l'objet d'un aperçu détaillé englobant leurs diversité structurelle ainsi que leur mode d'action antioxydant vis-à-vis les différents types des radicaux libres. Cette étude a revu d'une manière détaillée les différentes méthodes d'évaluation *in vitro* basées sur les deux mécanismes d'action par lesquels les polyphénols antioxydants peuvent neutraliser les espèces radicalaires, à savoir, le transfert d'atome d'hydrogène (HAT) et le transfert d'électrons (SET). Malgré le nombre les méthodes développées et testées pour évaluer le pouvoir antioxydant des polyphénols *in vitro*, seulement les avantages et les limites de ces méthodes sont encore en débat. Il semble qu'il n'y a pas un consensus pour standardiser une méthode plus pratique et plus simple pour évaluer le pouvoir antioxydant total des polyphénols.

Mots clés: stress oxydant, antioxydant, polyphénols, HAT, SET.

Antioxidant effect of polyphenols: *in vitro* Study

Abstract

Over time, antioxidants become an essential part of our life. Antioxidants help neutralize or destroy free radicals (ROS / RNS) produced during normal physiological conditions or resulting from oxidative stress before they can reach biomembranes and damage cell organelles. This study reviews the different types of harmful free radicals generated during metabolic processes and also gives an overview of the mechanistic aspect of the various methods evaluating *in vitro* the antioxidant power of polyphenols. The latter, resulting from the secondary metabolism of different plant species, have been the subject of a detailed overview encompassing their structural diversity as well as their antioxidant mode of action against the different types of free radicals. This study reviewed in detail the different *in vitro* assessment methods based on the two mechanisms of action by which antioxidant polyphenols can neutralize radical species, namely, hydrogen atom transfer (HAT) and electron transfer (SET). Despite the number of methods developed and tested to assess the antioxidant power of polyphenols *in vitro*, the advantages and limitations of these methods are still under debate. There appears to be no consensus to standardize a more convenient and simpler method for assessing total antioxidant power of polyphénols.

Key words: oxidative stress, antioxidant, polyphenols, HAT, SET.

الأثر المضاد للأكسدة لعديدات الفينول دراسة *in vitro*

الملخص:

من يوم لآخر تصبح مضادات الأكسدة جزءًا أساسيًا من حياتنا، فهي تساعد في تحييد أو هدم الجذور الحرة (ROS / RNS) التي تنتج خلال الظروف الفسيولوجية العادية أو تظهر في حالة الإجهاد التأكسدي وذلك قبل أن تصل إلى الأغشية الحيوية وتقوم بإتلاف العضيات الخلوية. استعرضت هذه الدراسة الأنواع المختلفة من الجذور الحرة الضارة المتولدة أثناء عمليات التمثيل الاستقلابي وأعطت لمحة عامة عن المبدأ الميكانيكي الكيميائي للطرق المختلفة التي تستخدم في التقييم (*in vitro*) للقوة المضادة للأكسدة لعديدات الفينول. وهذه الأخيرة وهي مركبات تنتج عن الأيض الثانوي للأنواع النباتية المختلفة فقد مثلت موضوع دراسة عامة مفصلة شملت تنوعها البنيوي بالإضافة إلى آلية عملها المضاد للأكسدة ضد الأنواع المختلفة للجذور الحرة. كما استعرضت هذه الدراسة بالتفصيل طرق التقييم (*in vitro*) المختلفة بناءً على آليتي العمل التي يمكن من خلالها لعديدات الفينول المضادات للأكسدة تحييد الأنواع المختلفة للجذور الحرة ، وهم طريقة نقل ذرة الهيدروجين (HAT) وطريقة نقل الإلكترون (SET) . وعلى الرغم من الطرق التي تم تطويرها واختبارها لتقييم القوة المضادة للأكسدة للعديدات الفينول (*in vitro*) إلا أن الإجابات والسلبيات التي تمثل حدودا لهذه الطرق لا تزال قيد الجدال العلمي ويبدو أنه لا يوجد إجماع على توحيد طريقة أكثر ملاءمة وبساطة لتقييم إجمالي القوة المضادات للأكسدة الكلية لعديدات الفينول.

الكلمات الاستدلالية : الاجهاد التأكسدي ، مضادات الأكسدة ، عديدات الفينول ، HAT، SET

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Avec l'évolution de la connaissance scientifique, le concept du stress oxydatif est devenu un terme fondamental dans le monde des sciences biologiques et médicales. La notion du terme stress oxydatif est conçue pour définir un état physiologique cellulaire caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces radicalaires et les capacités de défense antioxydante de l'organisme [1].

Les espèces radicalaires provenant de l'oxygène (ROS) ou du nitrogène (RNS) sont constamment générés à l'intérieur des cellules suite à l'exposition aux xénobiotique dispersés dans notre environnement ambiant et /ou à un certain nombre de métabolismes endogènes, impliquant des enzymes redox et celle de la chaîne respiratoire lors de transfert d'électron [2] D'autres activités enzymatique fournissent aussi des ROS, notamment les NADPH Oxydases au cours de l'inflammation et les cytochromes P450 au cours de la détoxification des xénobiotique, ainsi, la mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération des ROS [3].

Les ROS et les RNS, à des concentrations physiologiques, peuvent accomplir une variété de fonctions bénéfiques dans l'organisme, telles que la régulation de la transduction des signaux, l'induction de la réponse mitogénique et la participation à la défense contre les agents infectieux A des concentrations excéives les ROS et les RNS provoquent des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fais de leur conséquence sur le plan moléculaire, telle que les altérations au niveau des protéines, l'apparition des cassures sur l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique [4]. Ainsi, cette agression vis-à-vis aux cellules est l'une des causes initiales de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré [5]. Afin de retenir la concentration de ces espèces radicalaires à celle de l'état physiologique normal et neutraliser leurs actions nocives, la cellule utilise un système antioxydant constitué d'un ensemble d'enzymes d'origine endogène (SOD, CAT, GPx, GST) et d'un autre ensemble de substances non enzymatiques d'origine endogène et exogène [6].

Les antioxydants exogènes sont des composés synthétiques ou naturels, présents dans l'alimentation et les végétaux, tels les vitamines (Vit A, C ou E), les oligoéléments (zinc, manganèse, cuivre...) et les polyphénols. Les antioxydants agissent comme un moyen de défense majeur contre la toxicité induite par les ROS ou RNS, en protégeant les biomembranes et les composés cytosoliques [7].

L'étude des composés naturels d'origine végétal dotée d'une capacité de piégeage des radicaux libres représente un thème de recherche d'intérêt renouvelable quotidiennement. Les plantes se distinguent par leur capacité à élaborer un nombre très important de métabolites secondaires y compris les composés phénoliques (polyphénols). Les polyphénols sont largement répandus dans le règne végétal, ils se trouvent dans toutes les parties de la plante. Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique sur lequel se greffe un ou plusieurs groupements (-OH), ce qui leur confère l'avantage d'une diversité structurale possédant un large spectre d'activités biologiques [8].

L'effet protecteur des polyphénols a été attribué à leurs propriétés antioxydantes, susceptibles de prévenir des dommages oxydatifs moléculaires et cellulaires induisant diverses pathologies. (Cancers, diabète de type 2, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives), ils sont également utilisés comme additifs dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [9].

La recherche de l'activité antioxydante des polyphénols dans les systèmes modèles permet l'élargissement de nos conceptions vis-à-vis les mécanismes physiocellulaires lors des défaillances que peuvent subir les cellules atteintes par les différentes maladies. Il existe de nombreuses méthodes *in vitro* et *in vivo* qui peuvent être utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des polyphénols. Les méthodes de mesure de l'activité antioxydative *in vitro* diffèrent selon les systèmes utilisés dans la génération des radicaux libres et des conditions qui l'accompagnent. Ceci peut rendre pénible de comparer d'une manière objective les résultats obtenus par les différentes études [10]. Il existe de nombreuses théories contradictoires qui essaient d'expliquer les mécanismes des activités antiradicales des substances analysées *in vitro* [11].

Les tests mesurant les activités antiradicalaires adaptées aux molécules simples et non complexes pourraient faillir en présence de produits complexes composés de nombreuses substances possédant des propriétés de masquage ou d'intensification [12]. C'est pour ces raisons que la recherche d'une méthode rapide, simple et fiable est toujours demandée pour obtenir le pouvoir univoque d'un polyphénol antioxydant.

Cette investigation revisite le concept du stress oxydatif, celui des polyphénols et trace les différentes méthodes *in vitro* appréciées pour la détermination du pouvoir antioxydant des polyphénols.

Cette investigation, basée sur une documentation fondamentale et actualisée, a permis de structurer notre manuscrit en quatre chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à un rappel sur le **stress oxydant**, les radicaux libres,

- Le deuxième chapitre, traite **le système antioxydant** cellulaire adopté par la cellule vivante pour contrecarrer les effets néfastes issues du stress oxydants
- La troisième, est une étude bibliographique sur **les polyphénols**, leur biosynthèse, leur classification, leurs propriétés chimiques, leur rôle, ainsi que leurs intérêts sur la santé (activité anti oxydant et Propriétés thérapeutiques).
- Le quatrième chapitre est une revue des **méthodes d'évaluation *in vitro*** les plus importantes utilisées pour estimer les propriétés antioxydantes des polyphénols.

Chapitre I
STRESS OXYDATIF

1. Stress oxydatif

Le stress est un terme général qui a été d'abord employé dans un contexte biologique par l'endocrinologue Hans Selye en 1936 pour décrire la réponse physiologique inadéquate d'un organisme [13]. Le stress oxydatif occupe une place importante dans la recherche biologique actuelle. L'intérêt considérable porté à ce domaine est justifié par les multiples implications des ROS dans diverses pathologies, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Et dans ce sens la recherche fondamentale du stress oxydant s'efforce à déchiffrer les bases moléculaires des agressions oxydatives provoquées par les ROS, ainsi que les systèmes physiologiques de protection et de réparation des lésions d'origine oxydatives.

1.1. Définition

On désigne par stress oxydatif, l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et/ou par carence en micronutriments antioxydants ou cofacteurs des systèmes enzymatiques antioxydants [14]. C'est un déséquilibre de la balance pro-oxydan-antioxydant en faveur des premiers [15], ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Ce déséquilibre endommage des macromolécules, des cellules, des tissus, des organes et l'organisme dans l'ensemble. Une fois qu'il y a des dégâts à ces macromolécules, leurs fonctions essentielles dans le métabolisme cellulaire sont changées aboutissant à la manifestation de beaucoup de maladies [16].

1.2. Origine du stress oxydatif

Le stress oxydatif peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets, pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques) [17] (Figure 1).

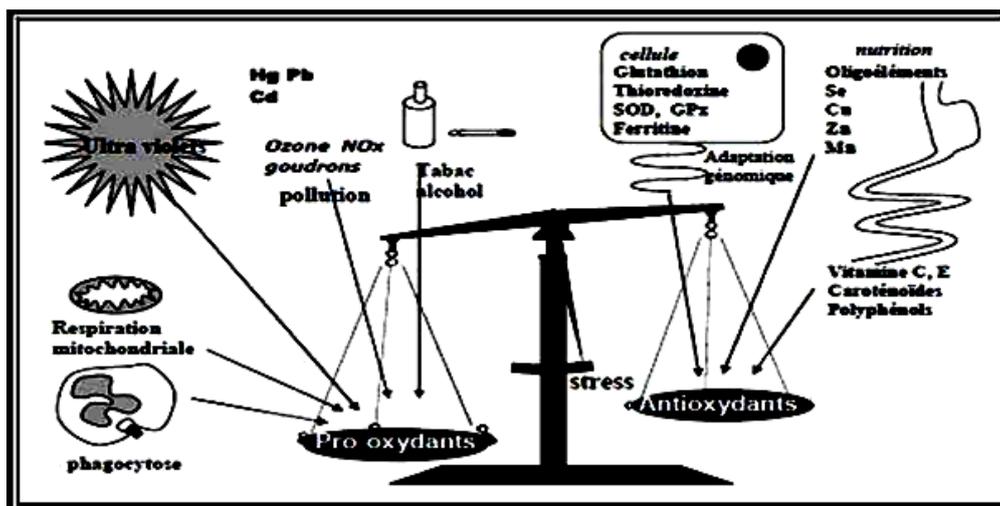


Figure 1 : La balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants [6]

1.3. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont définis comme des espèces chimiques capables d'une existence indépendante et possédant une orbitale dont un électron au moins est non apparié ou célibataire. Un électron apparié occupe une orbitale atomique ou moléculaire par lui-même. Les radicaux libres, par la présence en leur sein, d'un ou plusieurs électrons non appariés, sont sensibles à un champ magnétique. C'est la raison pour laquelle ils sont qualifiés d'entités paramagnétiques [18]. De point de vue chimique, ils sont électrophiles transitoires et momentanés restant une période de l'ordre de microseconde. Il s'agit donc d'un intermédiaire d'une réaction formant une réaction en chaîne qui va élaborer de nouveaux radicaux libres car la molécule agressée par le radical libre passe par la suite à son tour à un état radicalaire [19].

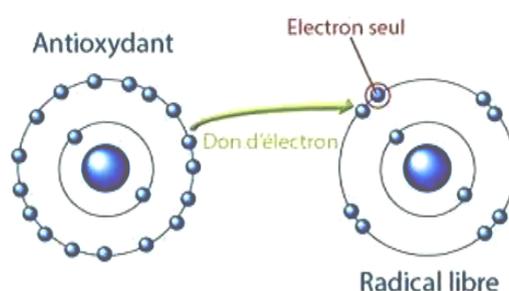


Figure 2 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant

Les ROS et les RNS ont la capacité pour faire le don d'électrons aux macromolécules. (Kang et al, 2017) tels que l'ADN, les protéines et les lipides, entraînant ainsi une réduction des molécules, des enzymes protectrices puis la mort cellulaire [20]. Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la

nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) ne sont pas très réactifs, mais constituent des précurseurs d'autres espèces plus réactives [6].

1.4. Rôles physiologiques des espèces réactives

Les radicaux libres sont indispensables à la vie car ils participent à de nombreuses fonctions physiologiques lors de la croissance ou de la défense de l'organisme. Ils contribuent à l'activité de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire vis-à-vis les organismes pathogènes, à l'apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, et à la régulation des gènes. Plusieurs études ont bien montré le rôle des radicaux libres et des espèces oxygénées réactives dans la genèse de nombreuses maladies. En effet, La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides [21, 22].

Du fait de l'importance de l'oxygène dans les systèmes biologiques, en situation physiologique, les espèces réactives sont créées en continu dans l'organisme. Ainsi, les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène ne sont pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs de voies de transduction du signal et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections [23]. Ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes [6].

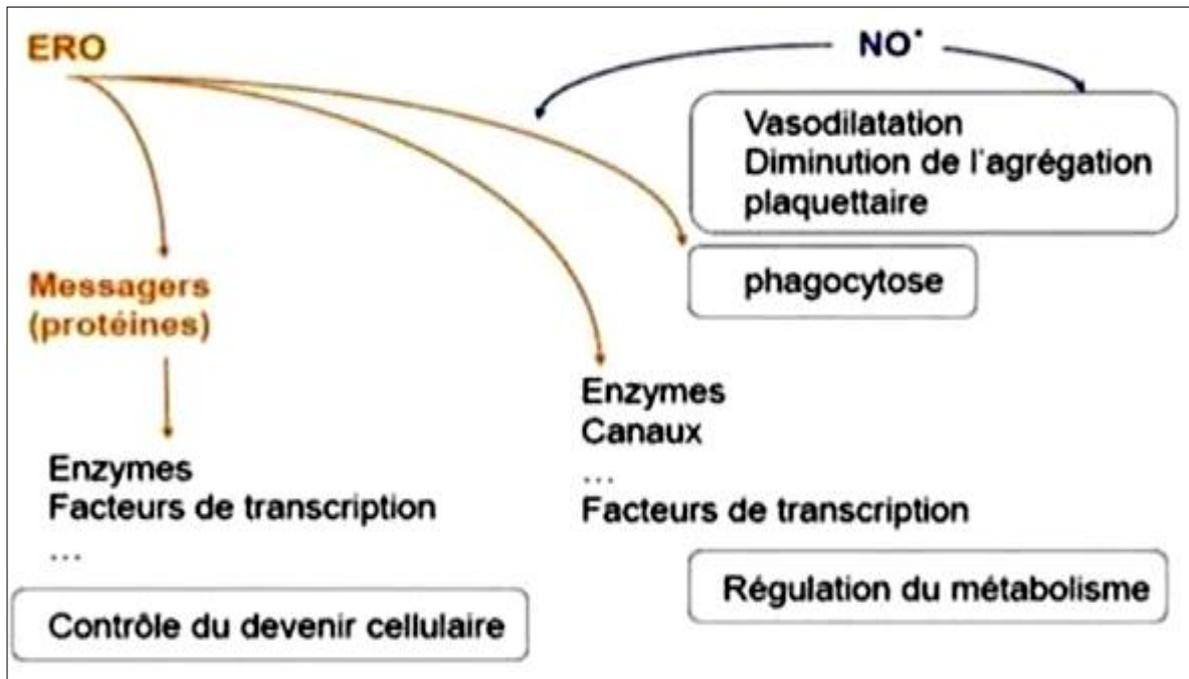


Figure 3: Rôles physiologique des espèces réactives [24].

1.5. Les principales sources des radicaux libres

L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécule d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée à la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique à partir d'une molécule de glucose (contre deux seulement dans un processus anaérobie). Les cellules convertissent 3 % de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS sont majoritaires mais des radicaux soufrés, nitrogènes, phosphorés ou carbonés sont également formés. Ces ROS qui peuvent être radicalaires ou non radicalaires, sont aussi produites en permanence par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants sont les NAD (P) H-oxydase et les NO synthase (Figur 4) [25].

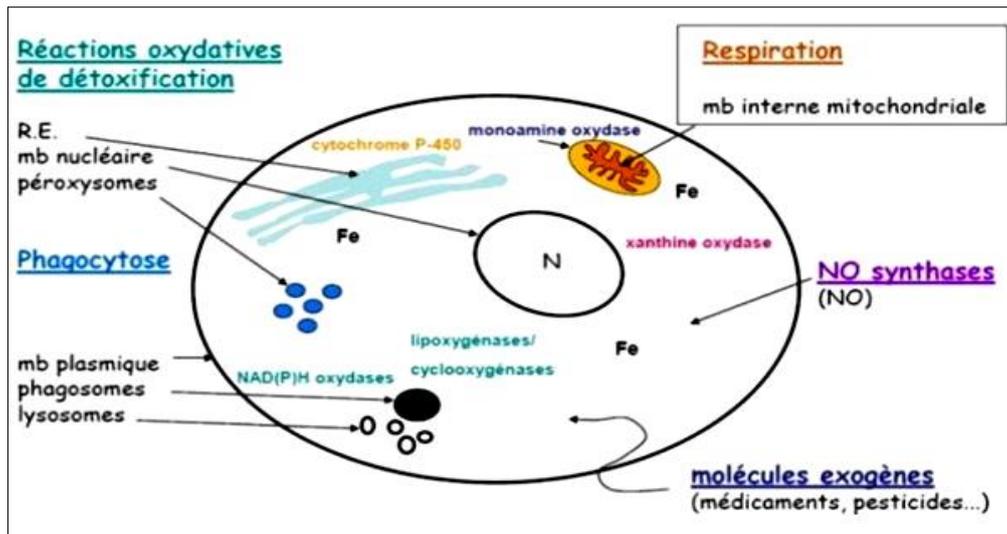


Figure 4 : Principaux sites cellulaires de productions des ROS [25]

La principale source des radicaux $O_2\cdot$ et H_2O_2 , pendant le métabolisme énergétique cellulaire, est la chaîne respiratoire [26]. Les mitochondries ont été identifiées comme responsables de l'initiation de la plupart des réactions des radicaux libres se produisant dans les cellules [27]. Il y a également d'autres sources cellulaires des radicaux libres telles que l'enzyme xanthine oxydase (qui catalyse la réaction de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique), le cytochrome P450, les peroxyosomes, les microsomes et les macrophages au cours de l'inflammation. Les ROS peuvent aussi être produits par une multitude de sources exogènes telles que les xénobiotiques, les composés chlorés, les agents environnementaux, les métaux (redox et non redox), les ions et les rayonnements [28].

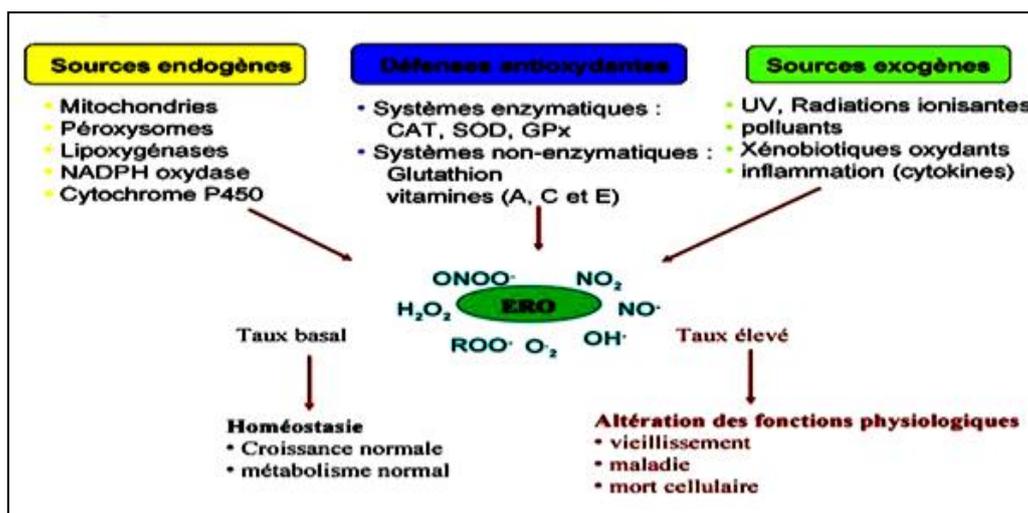


Figure 5 : les différentes sources des radicaux libres [28].

1..5.1. Sources endogènes des dérivés réactifs de l'oxygène :

Dans l'organisme il y a de nombreuses sources de ROS dont l'importance varie selon les tissus. La réaction chimique de Fenton produit des ROS dans la cellule. Les autres sources cellulaires de ROS sont enzymatiques et non-enzymatiques [29].

1..5.1.1. La mitochondrie

1..5.1.1.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

La mitochondrie est un organite au cœur du métabolisme énergétique de la cellule. Elle est «la machine » de synthèse de l'ATP en condition aérobie. Si cette production constitue son rôle le plus connu, la mitochondrie est aussi impliquée dans d'autres mécanismes comme l'homéostasie calcique, l'apoptose et bien sûr la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [30].

Les mitochondries possèdent deux membranes délimitant un espace intermembranaire et un compartiment matriciel. La membrane externe, formée de 50 % de protéines et 50 % de lipides polaires, est perméable aux ions et aux petites molécules grâce entre autres à l'existence de porines. La membrane interne, quant à elle, est imperméable car elle est constituée pour 80 % de protéines et 20 % de lipides. La membrane interne est le siège de la respiration qui correspond à un transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final l'oxygène.

Dans cette chaîne respiratoire mitochondriale, le transport électronique est opéré par quatre complexes enzymatiques (I, II, III et IV).

Complexe 1: NADH déshydrogénase/NADH-CoQ réductase par l'intermédiaire de ce complexe , les e- apportés par le NADH sont transférés au CoQ .

Complexe 2: Succinate-deshydrogénase

Le complexe II catalyse la ré-oxydation du succinate en fumarate qui, par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH₂ et de la réduction d'ubiquinone, permet le transfert de 2 électrons au complexe III (complexe b-c1). Ce transfert d'électrons est le seul à ne pas être couplé à un efflux de protons.

Complexe 3: Complexe b-c1 (ubiquinone-cytochrome c réductase)

Le pool des quinones est un transporteur libre d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Ce dernier permet un transfert d'électrons à un deuxième transporteur mobile situé dans l'espace inter membranaire, le cytochrome c qui relie le complexe III au complexe IV. Ce

transfert d'électrons, également associé à un efflux de protons, fait du complexe III la deuxième pompe à protons de la chaîne respiratoire.

Complexe 4 : ou (cytochrome-C oxydase) ce complexe transfère les e- depuis le cytochrome C à l'O₂ par intermédiaire des cytochromes α et α₃. ce complexe est inhibé par le cyanure, l'azide ou encore le monoxyde de carbone. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire est non seulement associé à la synthèse d'ATP mais aussi à la production de radicaux libres oxygénés [31].

l'ATP synthase est parfois considérée comme le 5ème complexe de la chaîne respiratoire. Ce complexe enzymatique permet la conversion de la différence de potentiel électrochimique en énergie chimique (ATP) au travers d'un processus réversible [31].

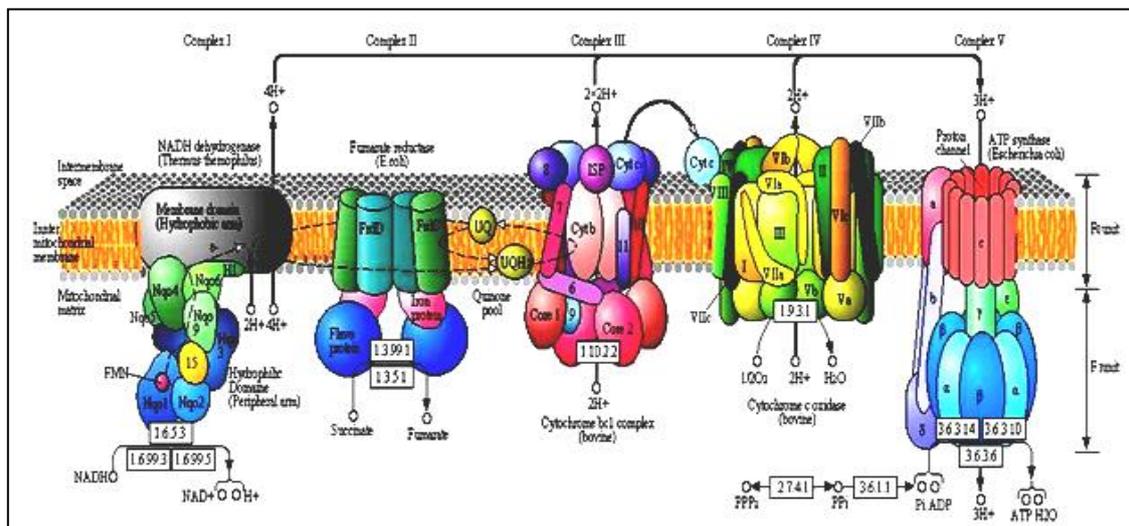


Figure 6 :La chaîne respiratoire mitochondriale [31].

1.5.1.1.2. La production des ROS PAR par la mitochondries

Une des premières études ayant mise en évidence la production de H₂O₂ par des mitochondries intactes a été réalisée par [32]. C'est le fonctionnement même de la chaîne respiratoire qui produit des ROS en conditions physiologiques. Rapidement, il a été montré que cette production d'H₂O₂ est directement liée à la dismutation de l'anion superoxyde. Selon certains auteurs, le pourcentage d'O₂ qui entre dans la chaîne respiratoire pour donner des ROS est de 1 à 4 %. Mais ces estimations ont été réalisées à partir de mesures in vitro sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production de ROS mitochondriale in vivo soit beaucoup plus faible (0,2 à 0,4 %) [33].

- Le débit de production de ROS est fonction du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons. Mais la production de ROS semble moins liée au flux d'électrons qu'au potentiel de membrane. En effet, une relation directe a été mise à jour entre le potentiel de membrane et la production d'anion superoxyde [34].

- L'évolution des concepts a permis de confirmer l'importance des complexes I et III dans la production de ROS à l'état 4 [35]. Ces deux complexes contiennent des quinones qui sont potentiellement des sources importantes de ROS. Pour certains auteurs, le complexe I est la principale source de $O_2^{\bullet-}$ par le groupe flavine mononucléotidique [36]. Mais d'autres désignent le site ubiquinone du complexe III comme le site majeur de production de ROS [37]. En effet, ce site catalyse la conversion de l'oxygène moléculaire en anion superoxyde par le transfert d'un électron de l'oxygène moléculaire. Expérimentalement, si le succinate est utilisé comme substrat en l'absence de roténone, la production de H_2O_2 est très importante, ce qui a mis à jour l'importance du flux inverse d'électrons du complexe II au complexe I. Ce flux inverse d'électrons est dû au fait qu'en absence d'ADP (état 4), les électrons dérivés du succinate peuvent remonter au complexe I (parce que le potentiel de membrane est une force) et réduire le NAD^+ en $NADH$ [38].

St Pierre et al. (2002) [39] ont étudié la topologie de production de l'anion superoxyde au niveau de la membrane interne. Pour cela, ils ont mesuré la production de H_2O_2 sur mitochondrie intacte en présence de différents substrats et inhibiteurs, avec ou sans SOD exogène ajoutée. Si la production de H_2O_2 a lieu sur la face cytoplasmique de la membrane interne, l'ajout de SOD exogène va augmenter la dismutation du $O_2^{\bullet-}$ et provoquer une augmentation de la production d' H_2O_2 . Par contre, si la production de H_2O_2 se fait du côté matriciel de la membrane interne mitochondriale, l'anion superoxyde sera dismuté en H_2O_2 par la SOD mitochondriale, le H_2O_2 diffuse ensuite à l'extérieur, et donc la SOD exogène n'aura pas d'effet. Ces auteurs ont pu observer que le complexe I produit l'anion superoxyde sur la face matricielle de la membrane interne. Une autre équipe de recherche a récemment décrit, en utilisant d'autres méthodes, la production d'anion superoxyde au niveau du complexe III sur la face cytoplasmique de la membrane interne mitochondriale [37].

La fuite de ROS au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale est schématisée dans la figure 7:

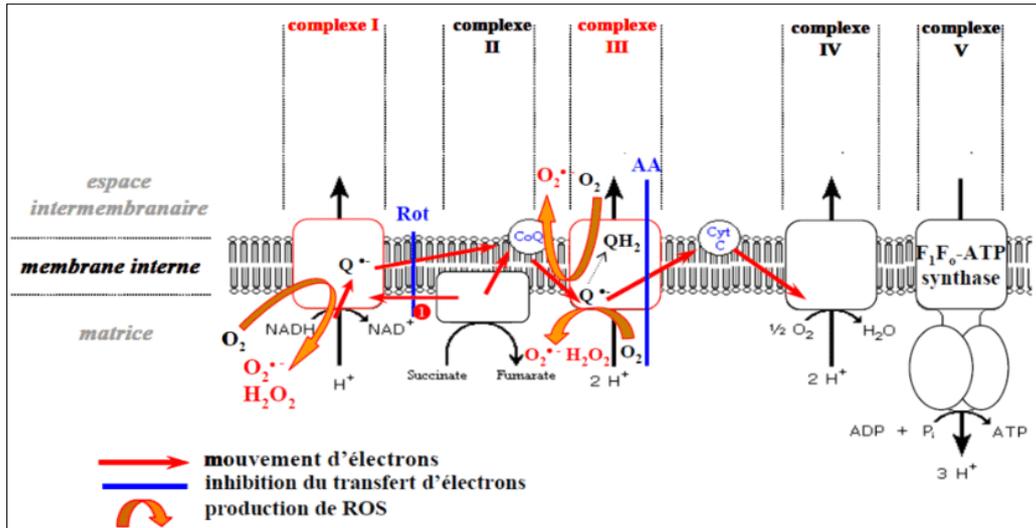


Figure 7 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire [33].

1..5.1.1.3. Stress oxydant et dysfonctionnement mitochondrial

Les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, de nature protéique, sont également des cibles pour les ROS; de plus, ils sont souvent complexés avec des métaux de transition, cibles et des générateurs des radicaux libres. Les complexes protéiques I et III sont particulièrement concernés [22].

Par ailleurs, on sait que l'excès de NO[•] inhibe la cytochrome oxydase, favorisant également la formation de O₂^{•-} depuis la chaîne respiratoire [40].

Enfin, l'inflammasome est un complexe protéique oligomérique impliqué dans l'immunité innée non spécifique et est notamment exprimé dans les cellules de la lignée granulocytaire. Des travaux récents suggèrent que la mitochondrie est impliquée dans l'intégration et le relai de différents signaux extracellulaires à l'inflammasome. En effet, une mitochondrie a fortiori dysfonctionnelle produit des ROS en plus grande quantité et stimuleraient l'activation de l'inflammasome [41]. L'inflammasome stimule notamment l'activation de la caspase-1 dans l'apoptose et favorise la production et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, de nature protéique, sont également des cibles pour les ROS ; de plus, ils sont souvent complexés avec des métaux de transition, cibles et des générateurs des radicaux libres. Les complexes protéiques I et III sont particulièrement concernés [22].

Les ROS peuvent avoir une action directe sur l'activité mitochondriale. Ainsi, l'O₂ peut réagir avec l'oxyde d'azote (NO), et produire le peroxynitrite (ONOO⁻) qui peut inhiber la chaîne respiratoire [42] et endommager différents composants mitochondriaux (complexe de la chaîne

respiratoire, membrane, ADN). En effet, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est à proximité directe de la source de production, du fait qu'il est fixé à la membrane interne. L'ADNmt est fragile car il est dépourvu d'histones et ne semble pas avoir de systèmes de réparation aussi efficaces que celui de l'ADN nucléaire (ADNn) [43].

Les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont codées en partie par l'ADNn et par l'ADNmt. Ainsi 13 sous-unités protéiques qui constituent l'ETC sont codées par l'ADNmt (7 sous-unités du complexe I, une du complexe III, 3 du complexe IV, et 2 pour l'ATPsynthase). Une altération de l'ADNmt pourrait donc altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire et déclencher un cercle vicieux augmentant la production de ROS et les dégâts oxydatifs mitochondriaux. De même, une oxydation accrue des phospholipides membranaires mitochondriaux pourrait modifier le fonctionnement mitochondrial [44].

1.5.1.2. Réticulum Endoplasmique

1.5.1.2.1. Les cytochromeS P450

Les cytochromes P450 sont des complexes enzymatiques situés dans la membrane du reticulum endoplasmique ou dans la membrane interne des mitochondries. Ils sont essentiellement présents dans le foie et participent au métabolisme des médicaments et autres xénobiotiques, de l'acide arachidonique, du cholestérol, de la vitamine D3, des eicosanoïdes. Ils catalysent l'oxydation de ces substrats par le dioxygène selon un cycle réactionnel [22], qui a pour bilan la réaction suivante :



Les cytochromes P450 ont une structure héminique. Ils sont composés d'un groupement prosthétique (protoporphyrine IX identique à celle de l'hémoglobine et de la myoglobine) et d'une partie protéique (apoprotéine). Le groupement prosthétique fixe, par quatre liaisons, un atome de fer en son centre. Une cinquième liaison est réalisée entre l'atome de fer et le groupement thiolate (RS-) d'une cystéine de l'apoprotéine. Enfin, une molécule d'eau ou de dioxygène peut se fixer par une sixième liaison à l'atome de fer [45].

1.5.1.3. Sources enzymatiques

1.5.1.3.1. NADPH oxydase (NOS)

La NOX est une enzyme cellulaire initialement complexe enzymatique membranaire appartenant à la classe des oxydo-réductases (enzymes de classe I). Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène (O₂). Le complexe NADPH-oxydase

consiste essentiellement en deux sous-unités (hétérodimère) peptidiques membranaires de 22 kD (la sous-unité) et 91 kDa (la sous-unité , contenant la portion catalytique de l'enzyme), ainsi qu'un peptide régulateur nommé Rac ; la partie cytosolique est constituée de plusieurs petites protéines (ou facteurs cytosoliques) régulées par l'état redox intracellulaire [46]. La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes. En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d'O₂^{•-}. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire [47].

Son rôle principal est de générer le radical superoxyde O₂^{•-} en transférant des électrons du NADPH au dioxygène O₂:



La NAD(P)H oxydase est une enzyme localisée au niveau de la membrane cytoplasmique et, chez les phagocytes, également dans la membrane du phagosome (membrane formée pendant la phagocytose à partir de la membrane plasmique) et dans la membrane des granules azurophiles des neutrophiles [6].

Autre différence importante, l'anion super oxyde Formé par le leucocyte est libéré dans le compartiment Extracellulaire, alors qu'il l'est en grande partie au niveau intracellulaire pour les autres types cellulaires, dont les cellules vasculaires [48].

1.5.1.3.2. Les oxydases des peroxysomes

Le peroxysome est une source importante dans la production cellulaire de H₂O₂ car cet organite contient de nombreuses enzymes générant du H₂O₂. Toutefois ce dernier est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans les processus de détoxification présents dans le foie et le rein [49].

A l'exception des érythrocytes, au sein des cellules animales, les oxydases (OX) sont largement retrouvées au niveau d'organites entourés par une membrane simple ; les peroxysomes et qui sont présents dans divers tissus dont le foie et les reins. Les peroxysomes détiennent plusieurs enzymes qui génèrent du peroxyde d'hydrogène. Citons, entre autres, l'urate oxydase, la glycolate oxydase [22].



Bien que les peroxysomes possèdent une enzyme à action anti-oxydante, la catalase, une partie de la production de peroxyde d'hydrogène passe dans le cytoplasme.

1.5.1.3.3. Xanthine déshydrogénase (XDH) et xanthine oxydase (XO)

Il s'agit de la principale enzyme cytosolique impliquée dans le catabolisme des bases puriques. La conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase peut se produire, in vivo, au sein de tissus lésés. Elle conduit, alors, à la production d'anion superoxyde [22]. Cette enzyme est présente dans le sang, les cellules endothéliales des capillaires et de façon très importante dans le foie et les intestins. La localisation cellulaire de la XO est principalement cytoplasmique [20].

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypo xanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\bullet -}$ [51].



1.5.2. Sources exogènes des espèces réactives de l'oxygène

La production extracellulaire Des facteurs exogènes liés à l'environnement ou au mode de vie sont également à l'origine d'une augmentation du stress oxydant dans l'organisme par l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme. Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérogènes non-génotoxiques peuvent directement ou indirectement être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes). L'exposition prolongée au soleil, ainsi les rayonnements UV induisent la synthèse de $O_2^{\bullet -}$, OH^{\bullet} , 1O_2 et d' H_2O_2 l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants [52] (Figure 8).

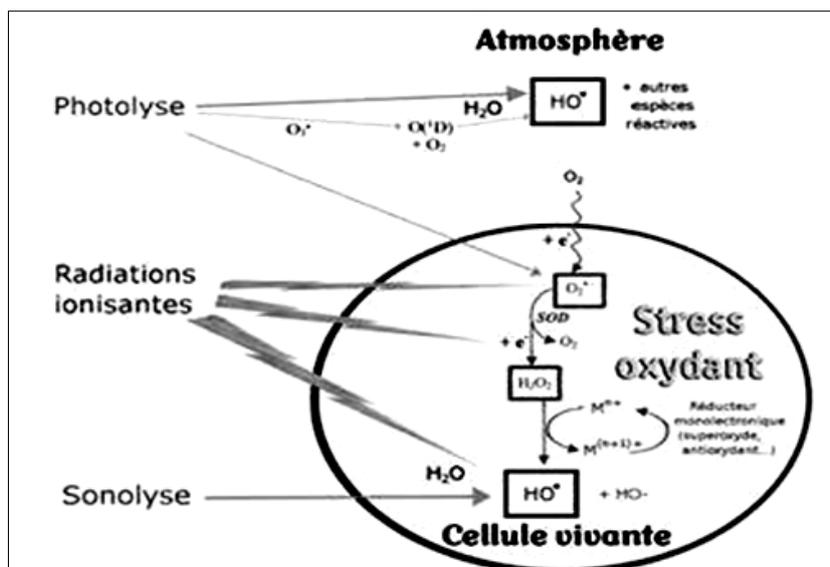


Figure 8 : Génération extracellulaire des radicaux libres

1.5.2.1. Les rayonnements UV:

Les radiations UV provoquent particulièrement des démâtements au niveau de l'ADN. Les radiations ionisantes induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que le $O_2^{\bullet-}$, et les molécules génératrices des radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants [53].

1.5.2.2. Les médicaments:

les médicaments qui sont utilisés comme un traitement contre le cancer (anticancéreux comme les anthracyclines) peuvent provoquer aussi la production des radicaux libres. Des facteurs environnementaux peuvent contribuer à la formation d'entités radicalaires. Une production importante des ROS est observée lors d'une intoxication par des métaux lourds (cadmium, mercure, arsenic) ou dans les phénomènes d'irradiations provoquant des dommages au niveau de l'ADN. Par ailleurs la fumée de tabac, l'alcool ou même certains médicaments (Xénobiotiques) peuvent être source de radicaux libres par oxydations de ces composés au niveau du cytochrome P450 [51].

1.25.3. Les différents types des radicaux libres

Le tableau 1 récapitule la nomenclature des espèces réactives, incluant les principales espèces réactives de l'oxygène (radicalaires et non radicalaires)

Tableau 1 : Nomenclature des principales ROS [22].		
	Radicaux libres	Non-radicaux
Espèces dérivées de l'oxygène (ROS)	Anion superoxyde, $O_2^{\cdot-}$ Radical hydroxyl, HO^{\cdot} Radical hydroperoxyl, HO_2^{\cdot} Anion carbonate, $CO_3^{\cdot-}$ Radical peroxy, RO_2^{\cdot} Radical alkoxy, RO^{\cdot} Dioxyde de carbone, $CO_2^{\cdot-}$ Anion oxygène singulet, O_2^{\cdot}	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 Acide Hypobromeux, $HOBr$ Acide Hypochloreux, $HOCl$ Ozone, O_3 Oxygène singulet, $1O_2$ Peroxyde organique, $ROOH$ Anion peroxydinitrite, $ONOO^-$ Acide peroxydinitrique, $ONOOH$ Anion peroxydinitrate, O_2NOO^- Anion nitrosoperoxy carbonate, $ONOCOO_2^-$ Anion peroxomonocarbonate, $HOOCO_2^-$
Espèces dérivées de l'azote (RNS)	Monoxyde d'azote, NO^{\cdot} Dioxyde d'azote, NO_2^{\cdot} Radical nitrate, NO_3^{\cdot}	Acide nitreux, HNO_2 Cation nitrosyl, NO^+ Anion nitroxyl, NO^- Tetroxyde dinitreux, N_2O_4 Trioxyde dinitreux, N_2O_3 Anion peroxydinitrite, $ONOO^-$ Acide peroxydinitrique, $ONOOH$ Anion peroxydinitrate, O_2NOO^- Cation nitrile, NO_2^+ Alkyl-peroxydinitrites, $ROONO$ Alkyl-peroxydinitrates, RO_2ONO Chlorure de nitrile, NO_2Cl Peroxyacétyl nitrate, $CH_3C(O)OONO_2$

1.2.5.3.1. Espèces réactives oxydantes (ROS)

Notre organisme a besoin d'énergie pour fonctionner correctement. Les cellules transforment les nutriments apportés par l'alimentation en énergie et en eau. Cette transformation génère environ 2 % de molécules d'oxygène [55].

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des radicaux libres issus de l'oxygène moléculaire, elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie [56]. Les dérivés de l'oxygène non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singlet ($1O_2$) et le anion peroxydinitrite ($OONO^-$) sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres. Ces ROS qui peuvent (radicalaires ou non radicalaires) sont aussi produites en

permanence par différents systèmes enzymatiques tels les NAD(P)H-oxydase et les NO⁻ synthéase.

-Formation des ROS

Les ROS présentent différentes réactivités :

- Le O₂^{•-} et H₂O₂ représentent une classe peu active. Le O₂^{•-} peut se dismuter en H₂O₂ et O₂ (réaction spontanée ou catalysée par la SOD), réagir avec NO[•] pour former ONOO⁻, un oxydant puissant, ou réduire les ions de métaux de transition. Le O₂^{•-} est produit notamment par réduction monovalente d'O₂ dans les mitochondries, par la NADPH oxydase (enzyme élaborée par les macrophages participant à la destruction des virus et bactéries) ou par la xanthine oxydase (une enzyme du métabolisme des purines) [57].
- Le radical OH[•] est l'une des espèces chimiques les plus oxydantes et peut attaquer très rapidement la plupart des molécules biologiques. C'est le produit de la réduction monoélectronique de H₂O₂, en présence des ions métalliques de basse valence (réaction de Fenton). ¹O₂ peut être généré par excitation de 3O₂ en présence de photosensibilisateurs mais aussi par des processus chimiques (ex. : réaction de H₂O₂ avec ClO⁻). ¹O₂ est très réactif et peut par exemple s'additionner rapidement sur des doubles liaisons carbone-carbone [58]. Les différents processus de formation des ROS sont schématisés dans la figure 9. :

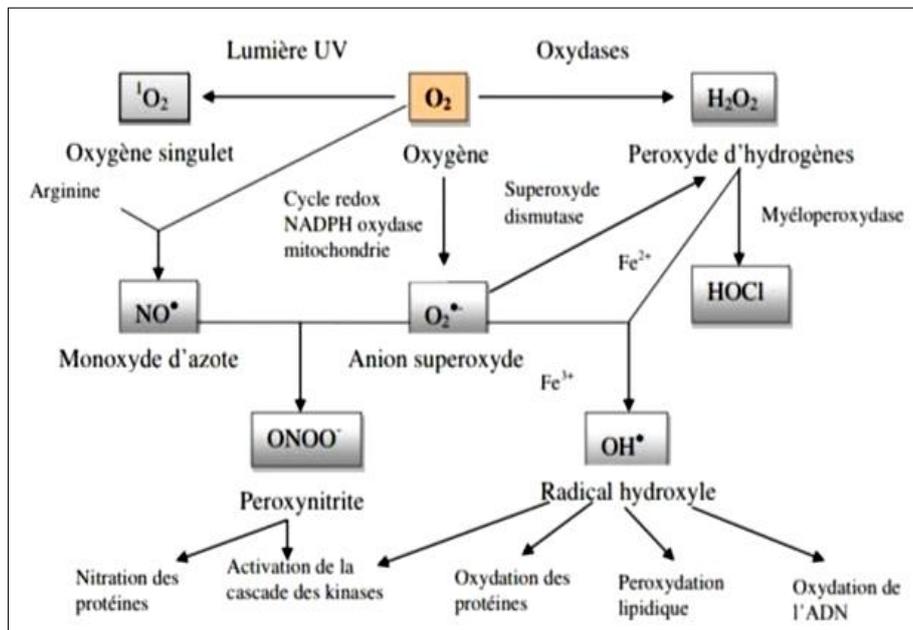
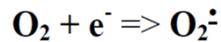


Figure 9 : Les processus de formation des ROS

1.2.5.3.1.1. Les ROS radicalaires

1.2.5.3.1.1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

Le superoxyde est le principal précurseur de la plupart des ROS, généré par l'addition d'un électron à l' O_2 . Sa principale source dans une cellule est le complexe I et le complexe III de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale [59].



Cet anion est produit au niveau cellulaire lors du catabolisme des bases puriques et du fonctionnement des cytochromes P450 dans les *reticuli* endoplasmiques et les mitochondries. Cependant, c'est la chaîne respiratoire mitochondriale qui est responsable de 80 % de la production d'anion superoxyde dans les cellules non phagocytaires [60]. sous l'influence du Q10 et la NADH-déshydrogénase, sous l'influence de métalloenzymes endommagées ou altérées par mutation génétique, et par des NADPH oxydases au niveau des membranes des cellules du système immunitaire où il participe à une action bactéricide. Les xanthines oxydases rencontrées dans le cytosol pratiquement de tous les tissus sont capables de produire des radicaux superoxydes à partir de l'hypoxanthine/xanthine et d'oxygène, et pourraient avoir des implications particulièrement en cas d'ischémie-réperfusion [61].

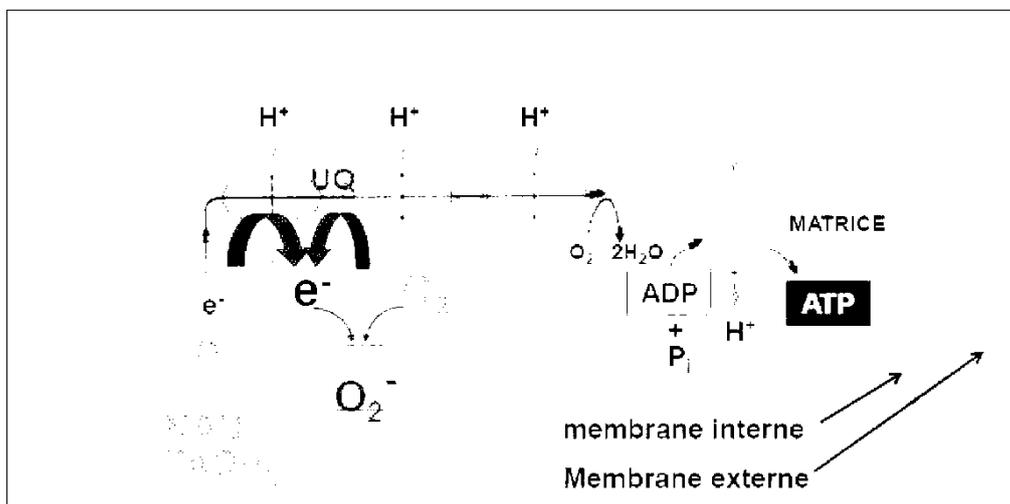
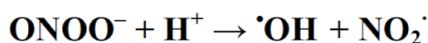


Figure 10. Production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

L'anion super oxyde $O_2^{\cdot-}$ joue un rôle très important dans la génération de d'autre radicaux libres tels que Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle $\bullet OH$, et l'oxygène singulet O_2^{\cdot} . L'anion super oxyde capable de réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxyde nitrite

(ONOO⁻) qui est capable de donner par la suite des composés très toxiques comme le radical hydroxyle et le dioxyde nitrique [62].

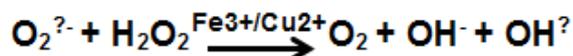


1.2.5.3.1.1.2. Le radical hydroxyle (OH[•])

Le radical hydroxyle (OH[•]) est extrêmement puissant et réagit indifféremment avec toutes les biomolécules, auxquelles il a un accès facilité à travers le H₂O₂ [63] est l'oxydant le plus puissant des ROS avec une vitesse de réactivité élevée, ne possède pas de cibles privilégiées et a une très faible durée de vie. Ce radical peut oxyder un substrat selon trois modes d'action : l'arrachement d'un électron, l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique ou l'addition sur une double liaison [64].

Le radical hydroxyle (OH[•]) est formé principalement par la dégradation du H₂O₂ en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi H₂O₂ associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$

H₂O₂ peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production du OH[•], ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss [65].



D'autres voies de formation du OH[•]. Le radical hydroxyle est produit durant l'inflammation en grande quantité lors des interactions entre l'anion superoxyde et l'acide hypochloreux, entre l'acide hypochloreux et les ions ferreux (Fe²⁺) ou entre le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote [66]

1.2.5.3.1.1.3. Le radical peroxy RO₂[•]

Les radicaux R[•] peuvent réagir avec une molécule de dioxygène. Les radicaux R[•] ainsi obtenus sont transformés en radicaux peroxydes RO₂[•] par addition d'une molécule de dioxygène selon la réaction :



ainsi, une réaction en chaîne produisant des hydroperoxydes. Ils'agit d'une peroxydation. Dans les cellules, cette chaîne réactionnelle affecte principalement les acides gras polyinsaturés ; il s'agit de la peroxydation lipidique. Les radicaux peroxydes sont de bons oxydants. Plusieurs modes d'actions sont décrits pour les propriétés oxydantes des radicaux peroxyde : transfert de charge (arrachement d'un électron) ou d'un atome d'hydrogène (Arrachement d'un atome H),

addition sur les doubles liaisons (réactions intramoléculaires ou intermoléculaires) exemple Les radicaux peroxy peuvent alors arracher un atome d'hydrogène H• à une autre molécule organique RH, formant, ainsi, des hydroperoxydes RO₂H et des radicaux libres R• comme suit :

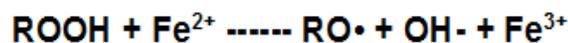
peuvent également se décomposer avant d'avoir réagi avec un substrat en donnant des radicaux superoxydes [67].

1.2.5.3.1.1.4. Le radical alkoxy RO•

Les hydroperoxydes produisent des radicaux alkoxy RO•. En présence de métaux de transition (M⁺) qui prolongent le processus de réaction en chaîne en agissant sur une molécule organique RH.



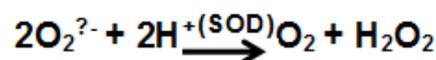
Les RO• peuvent également être générés par la décomposition des peroxydes organiques (ROOH). Normalement stables dans l'organisme et à température ambiante, l'addition de métaux de transition permet leur décomposition et constitue un des principaux démarrages de la peroxydation lipidique [22]. Par exemple :



1.2.5.3.1.2. ROS non radicalaires

1.2.5.3.1.2.1. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) se forme par la dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde [68]. La dismutation enzymatique est catalysée principalement par la superoxyde dismutase (SOD).



À côté de la SOD, il existe d'autres enzymes produisant H₂O₂, comme les oxydases présentes particulièrement dans les peroxysomes [69]. Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ peut être formé par réaction de deux anions superoxydes, réaction catalysée par la superoxyde dismutase ;



Il s'agit d'un intermédiaire stable mais très oxydant, capable de diffuser au sein des membranes hydrophobes et participant à la production de plusieurs molécules dont les plus réactives sont OH• et HOCl [70]. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l'H₂O₂ donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO• hautement réactif [71].



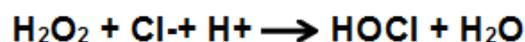
Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ peut également être transformé en hypochlorite desodium (eau de Javel) par la myéloperoxydase, enzyme localisée dans les granules azurophiles des polynucléaires neutrophiles.

1.2.5.3.1.2.2. L'oxygène singlet (¹O₂)

C'est un agent oxydant très puissant qui peut directement oxyder des protéines, l'ADN et des lipides et causer des dommages tissulaires. L'oxygène singlet réagit avec des molécules contenant des doubles liaisons carbone-carbone pour former des peroxydes. Par exemple, le cholestérol des membranes peut être oxydé par l'oxygène singlet et former son 5-alpha-hydroperoxyde [22]. Il est également formé *in vivo* par l'activation des neutrophiles, des éosinophiles et par certaines d'autres réactions enzymatiques catalysées par des enzymes, telles que les lipoxgénases, les dioxygénases et la lactoperoxydase [72].

1.2.5.3.1.2.3. L'acide hypochloreux (HOCl)

Comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux ne rentre pas dans la définition stricte du radical. Cependant, au cours de l'inflammation, la métabolisation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux par l'enzyme, la myéloperoxydase est élevée (**Deby-Dupont *et al.*, 1999**). L'acide hypochloreux est un agent chlorant et un oxydant fort



Il passe facilement à travers les membranes biologiques, et peut altérer les constituants protéiques de la cellule à cause de son fort pouvoir oxydant [73]. Dans les organismes vivants, l'acide hypochloreux est produit par une enzyme contenue dans les cellules phagocytaires, la myéloperoxydase (MPO) [22].

1.2.5.3.2. Les espèces réactives azotées (RNS)

Ils sont synthétisés à partir du monoxyde de d'azote (NO) et de l'anion superoxyde (principal élément donnant naissance aux espèces réactives d'oxygène ou ROS) donnant lieu au peroxynitrite (ONOO⁻), substrat hautement réactif. Ceci a poussé certains auteurs à parler de RONS (Réactive Oxygen and Nitrogen Species) au lieu de ROS pour désigner l'ensemble des espèces réactives oxydantes radicalaires ou non radicalaires.

1.2.5.3.2.1. Les RNS radicalaires

1.2.5.3.2.1.1. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO[•]) est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation de l'un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par la nitrique oxyde synthase (NOS) selon la réaction suivante :



Le NO libéré des cellules endothéliales réagit très rapidement avec l'oxygène pour former du dioxyde d'azote (NO₂[•]) qui peut à son tour réagir avec l'oxyde nitrique pour former le trioxyde d'azote (N₂O₃). Sa rapide réaction avec le radical superoxyde (•O₂⁻) produit le très réactif peroxynitrite (ONOO⁻) qui est capable d'oxyder les macromolécules particulièrement lors des états pathologiques [74] (Figure 11).

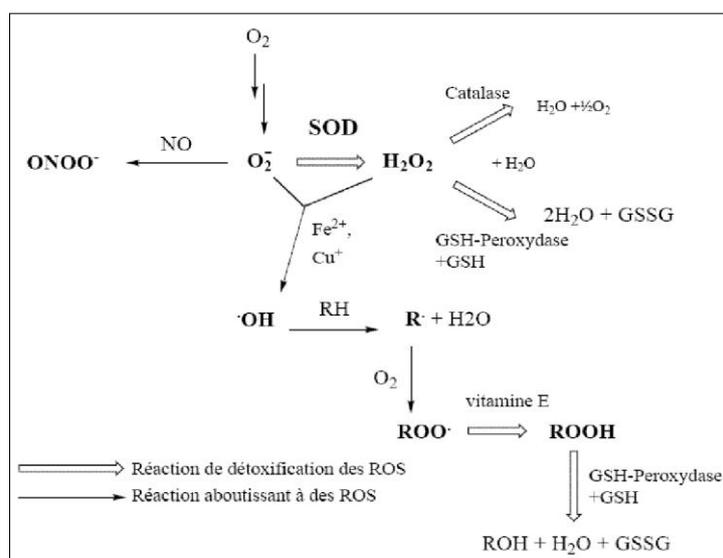
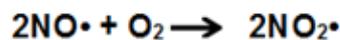


Figure 11 : Les espèces réactives oxygénés (ROS) et leurs systèmes de détoxification.

Le monoxyde d'azote a une demi-vie relativement longue, et est connu pour jouer des rôles fonctionnels importants dans une variété de systèmes physiologiques.

1.2.5.3.2.1.2. Le dioxyde d'azote NO₂[•]

In vitro le dioxyde d'azote est un gaz marron, mais aussi un radical libre aux potentialités oxydantes bien plus fortes que NO[•] [22]. Il se forme notamment lorsque du monoxyde d'azote NO[•] est exposé directement au dioxygène :



In vivo les concentrations en dioxygène dissout ne sont cependant pas suffisantes pour que la réaction soit quantitativement importante. Le nitrique dioxyde est un puissant déclencheur du lipide peroxydation par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés [62]. (

1.2.5.3.2.1.3. Le peroxy-nitrite

Son apparition est extrêmement rapide, et se produit par une réaction entre deux ROS:



A l'instar du radical hydroxyle, NO₃⁻ est une ERO qui cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires [75].

1.2.5.3.2.2. Les RNS non radicalaires

1.2.5.3.2.2.1. Peroxynitrite OONO⁻ :

Le peroxy-nitrite est produit dans des cellules contenant des enzymes NOS, tels que le muscle lisse ou les cellules endothéliales, et en particulier lors de la réponse inflammatoire. est un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques. Il est formé par la réaction entre O₂^{•-} et NO[•] [76].



Le peroxy-nitrite apparait comme l'espèce la plus toxique pour les tissus au niveau des sites de l'inflammation et participe dans plusieurs désordres neurodégénératif et des lésions rénales. Le peroxy-nitrite (OONO⁻) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle [77].

Chapitre II
SYSTEME ANTIOXYDANTS

2. Systèmes antioxydants

2.1. définitions

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficace contre la surproduction des ROS et des RNS [78]. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats [79]. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles.

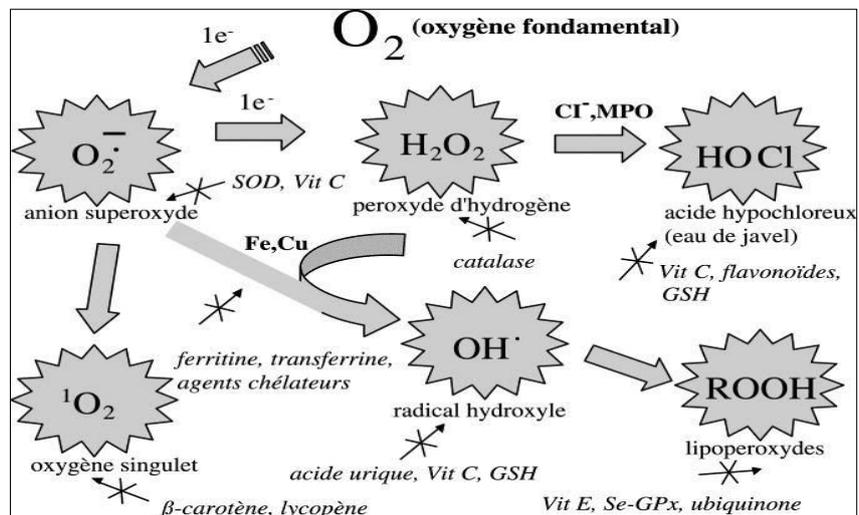


Figure12 : Régulation de la production des ROS par les systèmes antioxydants de défense.

2.2. Les différents sites cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle : les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles. Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de milieu, respectivement (Figure 13).

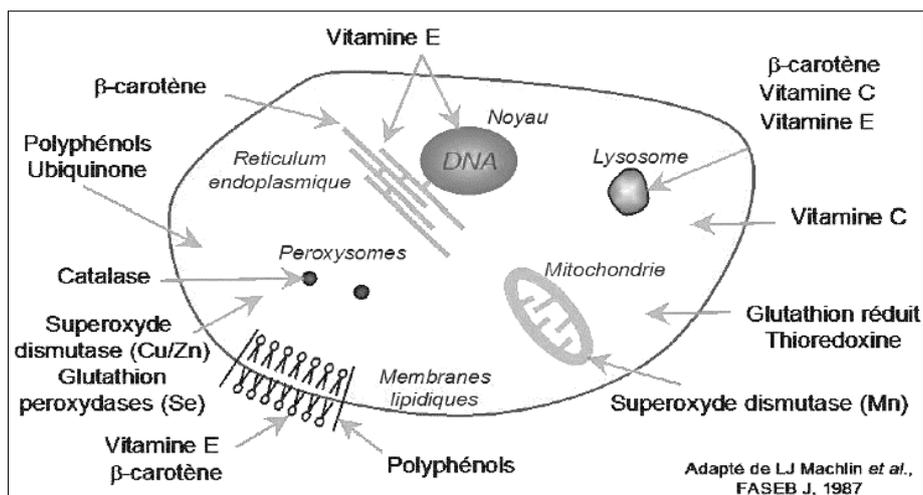


Figure13 : Localisation et effet des antioxydants au niveau cellulaire.

2.3. Les différents types des antioxydants

Les antioxydants existent dans les cellules vivantes sous une forme enzymatique (SOD, GPx, CAT...etc) ou non-enzymatique (GSH, l'acide urique).

2.3.1. Les antioxydants endogènes

C'est un système de défense endogène réduisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) issues de réactions redox en molécules stables et moins réactives.

2.3.1.1. Les antioxydants enzymatiques

Le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'O₂ et du H₂O₂ conduisant à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire [82].

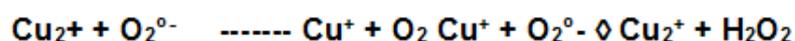
2.3.1.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases sont le premier et le plus important élément de défense contre les ROS et plus particulièrement contre l'anion superoxyde [83]. Elles sont à l'origine de la production de peroxyde d'hydrogène, elles permettent surtout de diminuer la durée d'existence de l'anion superoxyde et ainsi, d'empêcher la formation d'espèces beaucoup plus néfastes comme le peroxyde d'hydrogène par exemple.

Il existe trois isoformes de la superoxyde dismutase qui se distinguent par leurs localisations et leurs co-facteurs [84].

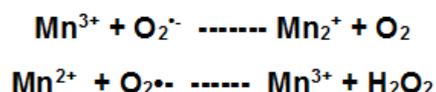
a. SOD 1 ou CuZn-SOD

C'est un homodimère très stable, elle possède du cuivre (Cu) et du zinc (Zn) comme cofacteurs dans son centre catalytique et est localisée dans le milieu intracellulaire [85]. Elle est particulièrement active dans le foie, le cerveau et les globules rouges. Le cuivre participe à l'activité catalytique alors que le zinc stabilise le site actif où il se produit une alternance de réduction et d'oxydations du cuivre par les anions superoxydes :



b. SOD 2 ou Mn-SOD

Assemblée en tétramère, la protéine SOD-2 possède Mn comme cofacteur dans son centre catalytique et est présente dans les membranes internes des mitochondries [86]. Elle se trouve dans la matrice mitochondriale où elle permet la protection des mitochondries face aux anions superoxydes produits. On observe aussi, au sein du site actif, une alternance de réduction et d'oxydation :



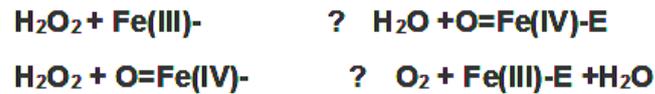
c. SOD 3 ou EC-SOD

Il s'agit de la SOD découverte le plus récemment. Assemblée en tétramère, elle possède une haute affinité pour l'héparine et a été détectée dans le plasma, la lymphe, les liquide d'ascite et dans le liquide cérébro-spinal. Comme SOD 1, elle possède Cu et Zn comme cofacteur dans son centre catalytique mais est localisée dans le milieu extracellulaire. Son mécanisme d'action est encore mal connu et il s'avère que les concentrations en SOD 3 chez le chien sont extrêmement faibles [85].

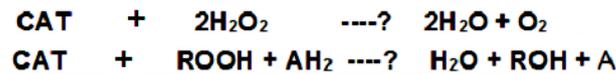
2.3.1.1.2. La catalase :

La catalase (EC1.11.1.6) est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les condition physiologiques. Elle est localisée principalement dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et le cytoplasme (chez les cellules qui ne possèdent cette organelle tels les érythrocytes). La catalase est composée de quatre sous unités protéiques, chacune contenant un groupement héminique avec le Fe^{3+} lié au site actif. Chaque

molécule a habituellement une molécule de NADPH+H⁺ qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène.



La CAT réagit très efficacement avec le H₂O₂, pour former de l'eau et de l'oxygène moléculaire, et avec les donneurs d'hydrogène (méthanol, éthanol, acide formique ou phénol).



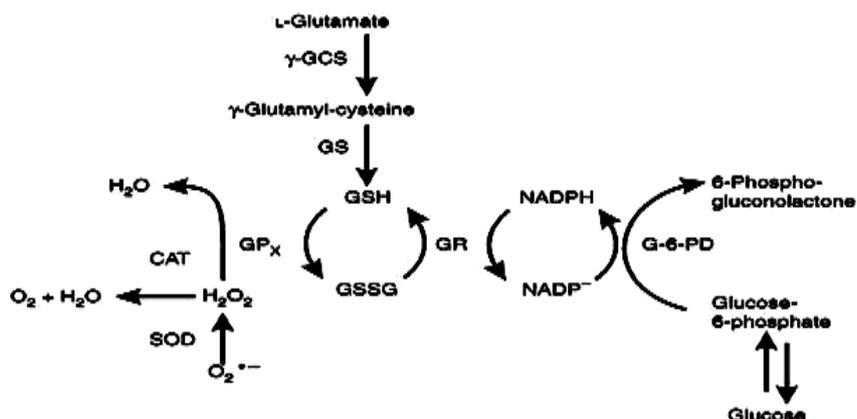
Sa vitesse de réaction est uniquement dépendante de la vitesse limite avec laquelle les molécules parviennent au site actif de l'enzyme ce qui en fait une des enzymes les plus efficaces connues [87].

2.3.1.1.3. la Glutathion peroxydase (GPX) et reductase(GR)

Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR) :

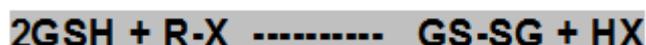
La GPx agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂^{•-} Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipidehydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction [88]. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.



2.3.1.1.4. Glutathion-S-transférase

La Glutathion-S-transférase (GST) est une enzyme cytosolique présente dans de nombreux tissus (muscle, intestin, foie, rein). C'est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le glutathion avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes. L'activité de conjugaison du GSH avec les composés électrophiles est présentée comme suit:



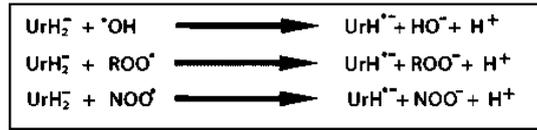
Elle catalyse la réaction de conjugaison du GSH réduit avec les xénobiotiques afin de les rendre plus hydrosolubles. En effet, Il existe 5 isoformes cytosoliques de la GST [89].

2.3.1.2. Les antioxydants non enzymatique

L'organisme possède une seconde ligne de défense « les piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ROS, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire

2.3.1.2.1. L'acide urique :

L'acide urique est produit final du métabolisme des purines, augmente dans le plasma lors d'efforts physiques intenses. Il a été proposé comme des meilleurs antioxydant du plasma *in vivo* où il pourrait contribuer à 35 – 60 % de. Il peut être oxydé en différents produit, puis est régénéré par la vitamine C. C'est un puissant piègeur de radicaux [•]OH, ROO[•] et NOO[•] en produisant le radical UrH, qui est relativement stable en raison de la délocalisation des électrons dans le noyau purine [76].



L'ion urate peut être ensuite régénéré suite à la réduction du radical $\text{UrH}^{\cdot-}$ par l'ascorbate (AscH^- , ce qui limite ainsi l'action du radical urate avec d'autres cibles.



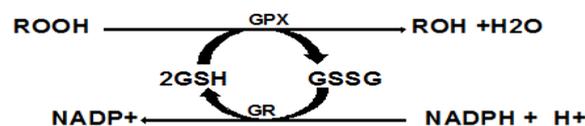
Il subsiste certains doutes quant à une réelle fonctionnalité antioxydant de l'acide urique, dont l'augmentation peut aussi bien avoir des conséquences pro que antioxydants [90].

2.3.1.2.2. Glutathion

Le glutathion constitue la molécule à thiol libre la plus répandue dans les cellules. Ce tripeptide soluble, de formule γ -Glu-Cys-Gly, est omniprésent dans les cellules à des concentrations pouvant dépasser le millimolaire [40]. Il est présent principalement sous deux formes redox distinctes, une forme réduite monomérique (GSH) et une forme oxydée dimérique (GSSG), toutes deux solubles en milieu aqueux. Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tels que la vitamine C ou la vitamine E baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique [90].

Le GSH constitue également une source importante de stockage de soufre dans les différents compartiments cellulaires et tissus. Outre ces rôles, le glutathion intervient également dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques, la régulation du cycle cellulaire, le transport cellulaire, le métabolisme secondaire, la protection cellulaire et l'activité de certaines enzymes agissant en tant que co-substrat [91].

La glutathion peroxydase catalyse l'oxydation du glutathion dans laquelle deux molécules de glutathion sont reliées par leurs groupements sulfhydriles en formant un pont disulfure. Ce dernier est ensuite réduit par la glutathion réductase avec l'utilisation de NADPH^+H^+ [92].



2.3.1.2.3. La bilirubine :

La bilirubine est le produit final de la dégradation de l'hème de plusieurs protéines hémiques d'intérêt biologique comme l'hémoglobine des hématies et la myoglobine des muscles. Transportée dans le sang, la bilirubine est conjuguée dans le foie et excrétée dans la bile où elle

quitte l'organisme. L'hème oxydase (HO) est une enzyme retrouvée dans le réticulum endoplasmique, catalysant la dégradation de l'hème en biliverdine et libérant du fer à l'état ionique Fe^{2+} et du monoxyde de carbone. La biliverdine est ensuite transformée en bilirubine grâce à la biliverdine réductase présente dans le cytosol. Faiblement hydrosoluble, la bilirubine est fortement liée aux protéines et lipoprotéines plasmatiques et potentialise la défense antioxydante sanguine (notamment avec l'albumine). *In vitro*, on a montré que la bilirubine avait de puissantes propriétés antioxydantes envers plusieurs espèces réactives comme le peroxyde d'hydrogène, les radicaux peroxy et alkoxy, ainsi que l'oxygène singulet [22].

2.3.1.2.4. Le Coenzyme Q10

Transporteur liposoluble d'électron dans la chaîne de transport des électrons, le Q10 est situé dans la membrane mitochondriale interne. Il se forme dans le cytosol ainsi que dans la mitochondrie par condensation enzymatique entre l'hydroxybenzoate. C'est un élément mobile qui transfère les électrons au complexe III. Il peut être également impliqué dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS, ainsi son effet antioxydant peut s'exercer au niveau de l'ADN [93].

2.3.2. Les systèmes antioxydant exogène :

2.3.2.1. Les vitamines :

2.3.2.1.1. Vitamine C :

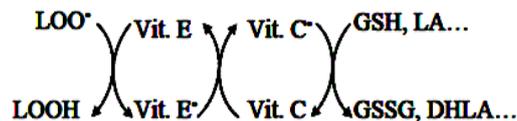
La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène. Après ingestion, elle passe rapidement dans le sang puis diffuse de façon variable dans tous les tissus. Elle est essentielle pour plusieurs fonctions physiologiques. La plupart des plantes et des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique sauf les singes et les humains en raison du manque de l'enzyme gulonolactone oxydase [94].

La vitamine C ou acide ascorbique agit principalement comme un agent réducteur et représente un excellent piègeur des espèces réactives de l'oxygène ($OH\cdot$, $O_2^{\cdot-}$, RO_2^{\cdot}), en réagissant avec ces dernières, l'acide ascorbique est alors oxydé en acide déshydroascorbique. En outre, il agit en synergie avec la vitamine E en permettant sa régénération ; il contribue aussi au bon fonctionnement du système immunitaire, du métabolisme du fer ainsi que dans la synthèse du collagène et des globules rouges [95, 96].

2.3.2.1.2. La vitamine E (Vit E) :

La vitamine E est un terme générique qui représente une famille de composés chimiquement apparentés qui est subdivisée en deux sous-groupes appelés tocophérols et tocotriénols. De plus, les tocophérols et les tocotriénols ont les formes α , β , γ et δ , nommées sur la base du nombre et la position des groupements méthyles dans le cycle chromanol [97].

La vit E est une vitamine liposoluble qui se trouve dans les membranes cellulaires et les lipoprotéines circulantes. Parmi les quatre tocophérols et les quatre tocotriénols trouvés dans les aliments, seulement l' α -tocophérol répond aux besoins humains en vitamine E [98]. Cette dernière piège les radicaux peroxydes produits durant la peroxydation lipidique, ce qui conduit à un radical tocophérol [99].



Les α -tocophérols (ArOH) réagissent avec des radicaux peroxyde lipidiques formant un radical d'hydroperoxyde lipidique et un tocophéroxyde (ArO \bullet), et empêchant la propagation de la peroxydation lipidique[92].



2.3.2.1.3. Les oligoéléments

Ces oligo-éléments interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libres. Parmi ces oligo-éléments, le zinc, le sélénium et le manganèse ont une action définie.

2.3.2.1.3.1. Le sélénium :

Sélénium est un élément minéral essentiel contenu à l'état de traces dans l'organisme. Il se présente sous diverses formes chimiques dans l'alimentation. Le sélénium agit comme un cofacteur enzymatique de la glutathion peroxydase. Dans l'alimentation le sélénium organique se trouve essentiellement lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la

synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx. Les aliments riches en sélénium sont notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail...etc [76].

2.3.2.1.3.2. Le zinc :

Le zinc est le deuxième oligo-élément le plus répandu dans le corps, il est impliqué dans la structure et la fonction de plus de 300 enzymes. Il est essentiel pour le fonctionnement et le métabolisme normaux des cellules. Les concentrations les plus élevées se trouvent dans la prostate, la rétine, les muscles, les os, le foie et les reins. Dans ces tissus le zinc n'est pas facilement mobilisé, et donc ne constitue pas un réservoir utile. Il fonctionne comme un antioxydant complexe, il participe aux activités de chélation enzymatique (superoxyde dismutase), stabilise les membranes cellulaires et inhibe la peroxydation lipidique [100].

2.3.2.1.3.3. Le manganèse :

Le manganèse est présent en grande quantité dans les mitochondries du muscle squelettique, du foie, du pancréas et du rein. Il est impliqué dans la synthèse, la sécrétion et l'action de l'insuline en association au zinc et au cuivre. Il est également indispensable pour la maturation des os et du cartilage. Il participe aussi à la synthèse des vitamines E et B1 [101]. La carence en manganèse est rare. Elle peut entraîner une hypocholestérolémie, une hypocoagulabilité ainsi qu'une atteinte cutanée. En revanche, l'excès de manganèse entraîne une toxicité lorsqu'elle est localisée dans le cerveau car elle peut entraîner un syndrome pseudo-parkinsonien [100]. Lorsque l'on observe un déficit ou une diminution de la biodisponibilité du manganèse dans les tissus riches en mitochondries, on observe parallèlement une inactivation de la SOD-Mn, ce qui peut augmenter le stress oxydant.

2.3.2.1.3.4. Le cuivre :

Le cuivre est un des cofacteurs essentiels de la SOD étant donné sa facilité à passer de l'état réduit à l'état oxydé [103]. On retrouve le cuivre surtout dans le foie, les huîtres et le chocolat noir. Néanmoins, il joue également un rôle important dans l'initiation des réactions produisant des ROS de par ses propriétés de métal de transition, tout comme le fer [104]. Une concentration importante en cuivre pourra être le révélateur d'un stress oxydant. Au cours du processus de vieillissement, la concentration sérique en cuivre est amenée à augmenter [105]. En d'autres termes, cet élément peut jouer à la fois le rôle de protecteur ou d'initiateur.

2.3.2.2. Les caroténoïdes :

Bêta-carotène sont surtout effectives aux faibles pressions partielles d'oxygène, d'ailleurs réalisées en milieu cellulaire. Grâce à son système de doubles liaisons conjuguées, le bêta-carotène fixe les radicaux peroxydes ROO° et le radical formé est stabilisé par mésomérie ; la propagation des oxydations en chaîne s'en trouve inhibée. Cette rupture est constatée pour les acides gras (protection contre les lipopéroxydations [106]).

Le bêta-carotène neutralise l'oxygène singulet. Cette atténuation excite le carotène qui relâche alors son énergie sous forme thermique et sans dommage pour la cellule. Dans ce domaine, d'autres caroténoïdes sont plus actifs que le bêta-carotène, le lycopène, la canthaxanthine. De ce fait, les caroténoïdes font partie du système de défense cellulaire contre les formes agressives de l'oxygène et les radicaux libres [107].

2.3.2.3. Les polyphénols :

Les polyphénols représentent un groupe de molécules chimiques produites par des plantes, caractérisées par la présence d'unités phénoliques dans leur structure moléculaire. Ils comprennent une multitude de structures chimiques, à partir de molécules simples comme les acides phénoliques, aux composés hautement polymérisés, tels que les tannins condensés [108].

2.4. Effets indésirables des radicaux libres

2.4.1. Effets métaboliques et cellulaires des radicaux libres sur l'organisme :

Les antioxydants sont des molécules en général faiblement toxiques. Pourtant, pour certains d'entre eux, leur utilisation à forte dose n'est pas dénuée de danger. Par exemple, le radical α -tocophérol (α -TO.) stabilisé par mésomérie, peut initier des réactions d'oxydation avec les acides gras mono et poly insaturés des phospholipides membranaires (LH, LOOH) à l'origine de radicaux libres, et peut ainsi contribuer à la phase de propagation des réactions radicalaires survenant dans la peroxydation lipidique. Ce rôle pro oxydant de l' α -tocophérol en tant qu'initiateur des réactions radicalaires n'est néanmoins possible que si le radical α -tocophéryl est présent en forte concentration dans les membranes et que la vitamine C n'assure pas sa régénération [109].

Le taux élevé des ROS provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des

lipides (Figure18). Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement, maladies cardiovasculaires, cancer, diabète [110].

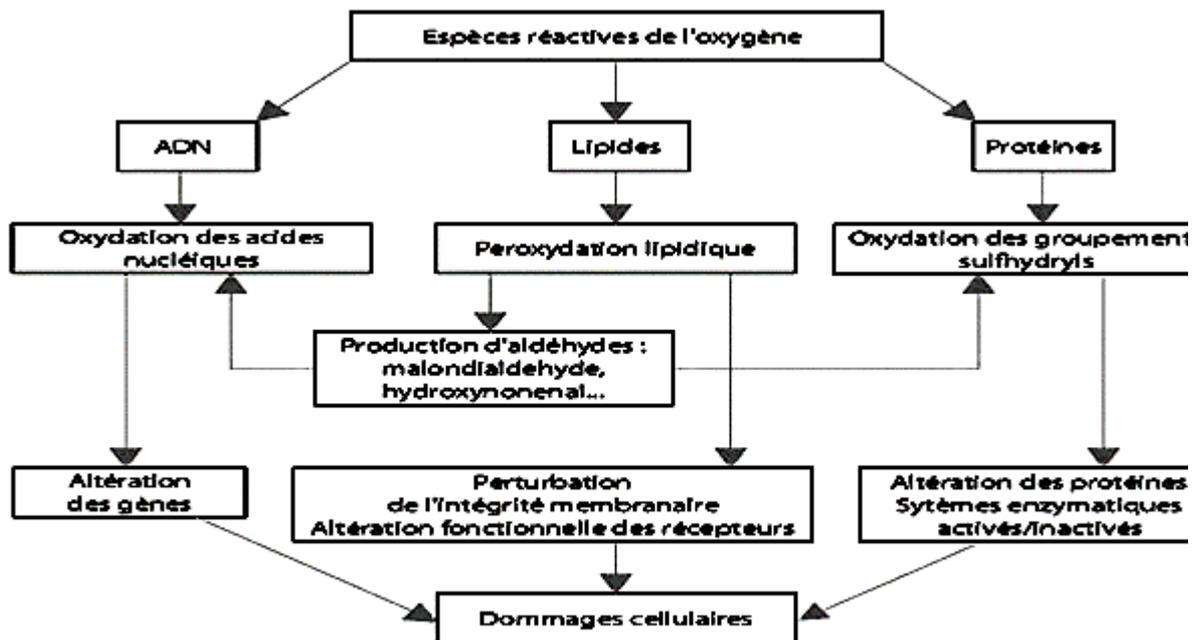


Figure 14 : Principaux dommages cellulaires induits par les ROS

2.4.1.1. Les protéines

Les protéines sont de grosses molécules complexes qui jouent de nombreux rôles critiques dans le corps. Ils font la plupart du travail dans les cellules et sont nécessaires pour la structure, la fonction et la régulation des tissus et des organes du corps. Les protéines sont constituées de centaines ou de milliers d'unités plus petites appelées acides aminés, qui sont liées les unes aux autres par de longues chaînes. Il existe 20 types différents d'acides aminés qui peuvent être combinés pour former une protéine. La séquence d'acides aminés détermine la structure tridimensionnelle unique de chaque protéine et sa fonction spécifique.

2.4.1.1.1. Stress oxydatif et altérations des protéines et des acides aminés

La protéine subit différents types de modifications, qui peuvent être soit direct ou indirects. Lors des modifications directes, l'activité de la protéine est modifiée en raison de diverses modifications chimiques, telles que la nitrosation, la carboxylation, la formation de liaisons disulfures. La modification indirecte des protéines peut survenir à la suite d'une interaction avec les produits de la LPO [111].

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine détectables par leur fluorescence, soit subir des coupures en cas d'agression forte, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés [6].

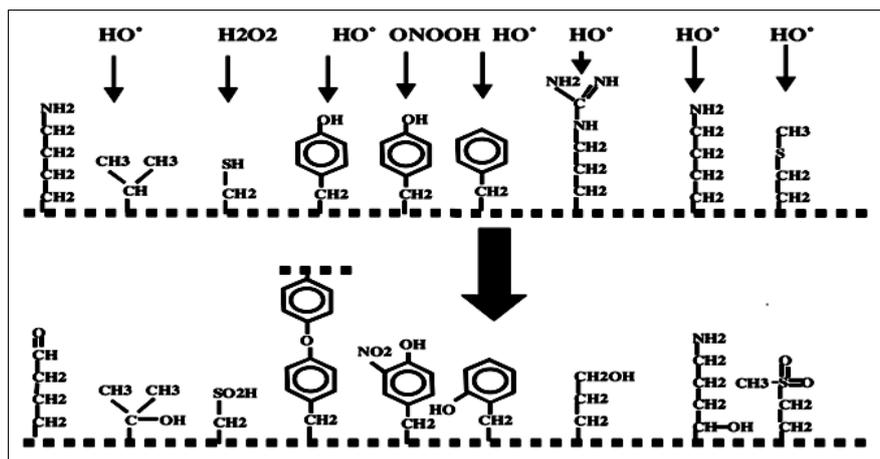


Figure 15: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire [6].

Les radicaux libres peuvent également affecter les protéines par oxydation de l'ARN. Là où c'est prouvé que l'ARN oxydé cause des erreurs dans la traduction, menant finalement à la production de protéines anormales. Ces protéines peuvent être responsables de la présence de maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer [112].

2.4.1.2. L'ADN

Toutes les cellules contiennent un ensemble d'instructions contrôlant l'élaboration de leurs structures et le maintien de leurs diverses activités. Cet ensemble est gouverné et contrôlé par l'acide désoxyribonucléique ou ADN.

1. La structure de l'ADN

La structure de l'ADN présente différents niveaux de complexité, une structure primaire et une structure secondaire.

a) Structure primaire de l'ADN

L'ADN est un polymère linéaire de nucléotides. Chaque nucléotide est constitué de trois parties : une base azotée, un sucre et un groupement phosphate.

Une liaison N-glycosidique relie la base au sucre, le 2-désoxyribose ; l'association base et sucre forme un nucléoside.

Il existe quatre bases azotées, séparées en deux familles :

- Les bases puriques (guanine et adénine)
- Les bases pyrimidiques (cytosine et thymine).

Les nucléotides sont reliés entre eux par des ponts phosphodiester impliquant les fonctions hydroxyle des extrémités 3' et 5' des 2-désoxyriboses.

b) Structure secondaire de l'ADN

L'ADN présente une structure hélicoïdale, composée de deux brins dont la séquence des bases est complémentaire. Ainsi deux chaînes de nucléotides sont maintenues accolées par des liaisons hydrogène spécifiques entre des paires de bases complémentaires (adénine et thymine d'une part, guanine et cytosine d'autre part). L'organisation spatiale de l'ADN double brin est une double hélice dans laquelle les bases sont situées à l'intérieur tandis que le squelette sucre phosphate est repoussé à l'extérieur. Le diamètre de l'hélice est d'environ 2 nm. La biomolécule d'ADN se retrouve dans le noyau de toutes les cellules eucaryotes et dans une zone nucléaire appelée nucléoïde dans les cellules procaryotes. Chez les eucaryotes, l'ADN se retrouve compacté sous forme de chromosomes de telle manière que le polymère d'1.60 m puisse être contenu dans un noyau de quelques μm de diamètre.

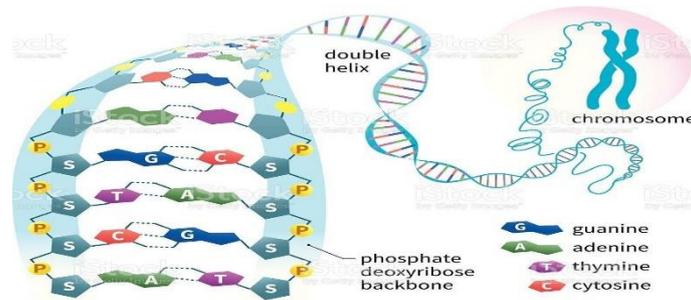


Figure 16: structure de la molécule d'ADN

2 - Rôle biologique

L'ADN assure deux fonctions fondamentales pour la vie de tous organismes, la transmission de l'information génétique et la synthèse des protéines.

2.4.1.2.1. Les dommages de l'ADN

Comme les autres molécules cellulaires, l'ADN subit l'attaque perpétuelle d'agents délétères. Ces agents introduisent des modifications dans la double hélice appelées dommages ou lésions. Les bases modifiées, les coupures simples et doubles brins, les pontages ADN / ADN et ADN / protéines ainsi que les sites abasiques (provenant d'une altération première du sucre ou d'une perte de base) constituent les quatre grandes classes de dommage de l'ADN (Figure 21).

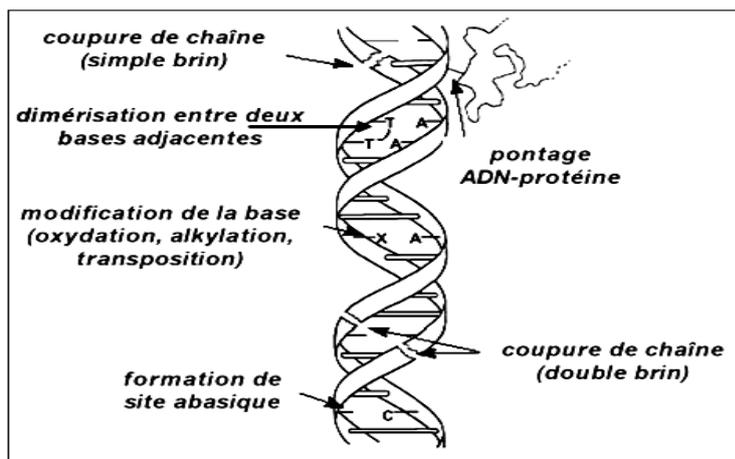


Figure 17 : Différents types d'altérations d'ADN.

2.4.1.2.1.1. Les dommages oxydatifs de l'ADN

Le radical hydroxyle et l'oxygène singulet constituent les deux ROS qui sont à l'origine des dommages oxydatifs de l'ADN, ils provoquent l'oxydation des bases, les cassures simples et doubles brins [113]. La probabilité de diffusion du radical hydroxyle dans le noyau est limité par sa faible durée de vie. Il peut cependant être généré dans le noyau par l'anion superoxyde via le cycle d'Haber-Weiss [110]. L'attaque radicalaire directe peut entraîner l'oxydation des bases, engendrant un très grand nombre de bases modifiées : 8 oxo-guanine, 8 nitro-guanine, formamidopyrimidine, 8-oxo-adénine, formimido-uracile, 5-hydroxycytosine, 5-hydroxyméthyl-uracile, thymine-diol, oxazolone [6] (figure22). La guanine est une base azotée particulièrement sensible à ces altérations [115].

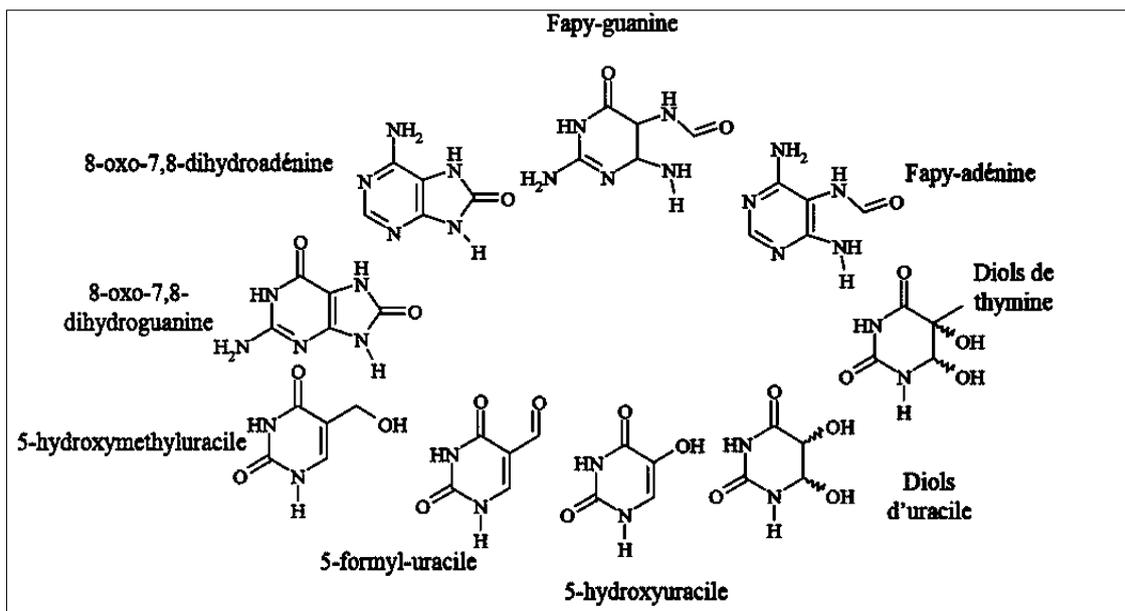


Figure 18 : Quelques bases oxydées engendrées par les ROS suite à un stress oxydant

Aussi, les ROS peuvent s'attaquer à la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple ou double (rupture complète de la double hélice) [6]. L'attaque radicalaire des protéines qui entrent en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription), peut entraîner des pontages entre les protéines ou leurs adduits avec les bases azotées et former des liaisons de type lysine-guanine ou tyrosine-thymine [116]. Par ailleurs,

les chloramines et l'acide hypochloreux HOCl sont considérés comme des perturbateurs des mécanismes de réparation de l'ADN dans le noyau [22].

La sensibilité de l'ADN aux ROS s'explique également en partie par la présence de nombreux métaux de transition (comme Fe, Cu, Zn, Mg, Ni, Cd...) fixés sur la molécule d'ADN en raison de son caractère polyanionique. Toute production de radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ ou de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est en effet susceptible de générer HO^{\bullet} par une réaction de Fenton et d'amplifier ou d'orienter le profil de ces lésions le long de la double hélice [56].

L'ADN mitochondrial a une sensibilité particulière aux radicaux libres [22]. On considère généralement que l'ADN nucléaire présente une base modifiée par les ERO sur 1,3.105 bases contre une base sur 8.103 bases dans l'ADN mitochondrial [6].

En effet, l'ADN mitochondrial est au plus proche du principal site de production de radicaux dans la cellule. Les radicaux les plus agressifs pour la mitochondrie sont le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote, formé localement au sein même de la machine mitochondriale et attaquant directement son ADN [56]. De plus, contrairement à l'ADN nucléaire, l'ADN mitochondrial n'est pas enroulé autour d'histones; il est donc particulièrement exposé. Il a également été suggéré que les mécanismes de réparation de l'ADN mitochondrial, bien que présents, étaient plus lents que dans le noyau. Enfin, l'ADN mitochondrial, bien que codant pour un faible nombre de protéines (dont sept sous-unités du complexe I, une du complexe III, trois du complexe IV et deux du complexe V), ne comportent pas d'introns : les dommages entraînés par les radicaux libres sont alors plus susceptibles d'affecter un gène que dans le cas de l'ADN nucléaire [22].

2.4.1.2.1.2. Les effets indirects des ROS sur l'ADN

Les ROS sont souvent produites à l'extérieur des cellules lors des mécanismes d'inflammations ou dans le cytoplasme lors des cycles rédox. L'espèce la plus réactive des ROS, le radical hydroxyle, a une durée de vie très limitée (durée de vie de 10^{-9} s quand elle est mise à réagir avec une solution 1 M d'acide linoléique à 37 °C [117]). Elle attaque donc difficilement directement l'ADN car elle doit au préalable diffuser dans le cytoplasme puis traverser la membrane nucléaire. Par contre, elle est amenée à réagir d'autres biomolécules cellulaires comme les protéines ou les lipides qui sont présentes à proximité de son site de génération.

- La réaction des protéines avec les ROS conduit à la formation de nouveaux radicaux organiques alcoyle ou peroxyde Ces radicaux peuvent endommager l'ADN [118]. Deux types

de dommages sont induits par cette dégradation : des pontages entre les protéines et les bases de l'ADN mais aussi des dommages oxydatifs comme la 8-oxo-7,8-dihydroguanine. Les radicaux alcoyle dérivés des protéines sont à l'origine des pontages avec les bases de l'ADN alors que les radicaux peroxy engendrent des dommages oxydatifs.

- Aussi l'endommagement des lipides peut être source de dommages de l'ADN. A ce propos, la réaction entre les bases aminées de l'ADN et des aldéhydes dérivés de la peroxydation lipidique comme le malondialdéhyde (MDA) forme ce qu'on appelle des adduits.

2.4.1.3. Les lipides

Les lipides sont des composés organiques, qui forment le cadre de la structure et de la fonction des cellules vivantes. Il existe une grande diversité de lipides du fait de la variété des fonctions chimiques polaires et hydrophobes. Les lipides assurent quatre fonctions essentielles dans l'organisme. Ils constituent l'ossature des membranes biologiques, la réserve d'énergie en étant stockés sous forme de triglycérides dans les tissus adipeux. Ils servent de signal de ciblage des protéines vers les membranes et ils véhiculent des informations. Les acides gras polyinsaturés représentent les molécules clés des réactions d'oxydation.

- Les lipides membranaires :

Les membranes biologiques sont principalement constituées de lipides. Elles se divisent en deux grandes classes, une classe pour laquelle la queue hydrophobe est composée de deux chaînes aliphatiques comportant entre 14 et 24 carbones (classe des phospholipides et des glycolipides) et une seconde pour laquelle il s'agit d'un squelette carboné cyclique (dérivés du stérol).

- Les lipoprotéines

Les lipoprotéines sont constituées par un assemblage de lipides et de protéines (les apolipoprotéines), et appartiennent à la classe des protéines de transport.

Elles assurent le rôle de transport dans l'organisme du cholestérol, des phospholipides et des triacylglycérols (lipides réserves d'énergie).

Relations entre les radicaux libres et les lipides membranaires :

Il y a longtemps qu'il a été reconnu que les concentrations élevées des radicaux libres, peuvent infliger des dégâts directs aux lipides. Les glycolipides, les phospholipides et le cholestérol sont les cibles préférées d'endommagement radicalaire.

2.4.1.3.1. La peroxydations lipidiques :

La peroxydation des lipides est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène moléculaire [119] soit par des espèces radicalaires de l'oxygène, soit catalysée par des enzymes. Il s'agit d'un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras insaturés conduisant à la formation d'hydro peroxydes instables, responsables de la diminution de la fluidité membranaire [120].

2.4.1.3.1.1. Les facteurs inducteurs de la peroxydation des lipides

Les facteurs qui influencent l'oxydation des lipides sont nombreux. On trouve des facteurs intrinsèques tels que la composition en acide gras des lipides (nombre et position des doubles liaisons), la présence des métaux de transition tel que le Fer et le cuivre, et d'autres enzymes ou un excès d'antioxydants naturels : tocophérols, caroténoïdes ... etc, et des facteurs externes tels que la température, la lumière [121]. La phase d'initiation de l'oxydation des lipides peut être déclenchée par plusieurs facteurs : les ROS, les enzymes, les métaux et la température [121].

2.4.1.3.1.2. Les voies d'oxydation des lipides :

- L'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :
- l'autoxydation (catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres)
- la photoxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs
- l'oxydation enzymatique initiée par la lipoxygénase.

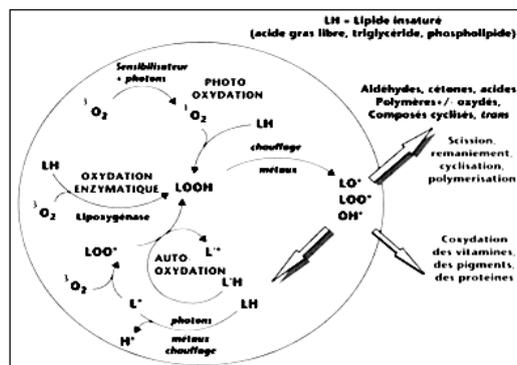


Figure 19 : Les principales réactions d'oxydation des lipides non saturés.

2.4.1.3.1.2.1. L'oxydation enzymatique des lipides

et plus particulièrement l'acide arachidonique, peuvent être oxydés enzymatiquement, par les lipoxygénases, les cyclooxygénases et le cytochrome C qui sont des enzymes importantes qui oxydent des acides gras in vivo. (Niki, 2008). selon deux voies majeures et une voie mineure (voie de la cyclooxygénase, voie de la lipoxygénase, voie des époxygénase à cytochrome P450) . Ces voies sont essentielles car elles permettent aux acides gras d'assurer leur rôle de médiateur cellulaire.

Les lipides membranaires des cellules animales ou végétales, les triglycérides ainsi que les lipides des lipoprotéines, peuvent être oxydés

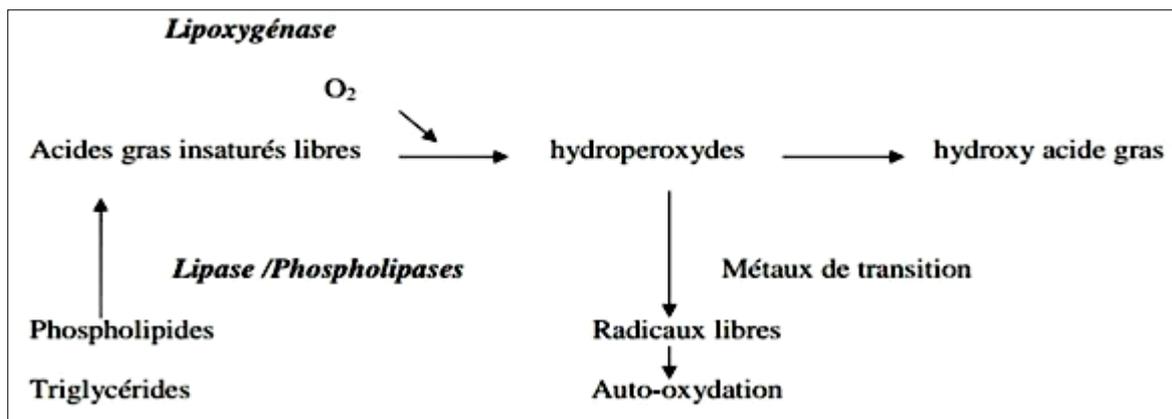


Figure 20 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique [12].

-La photo-oxydation:

Elle se produit lorsque l'oxygène triplet est converti en oxygène singlet, par l'exposition au rayonnement UV. L'oxygène singlet interagit avec des acides gras polyinsaturés pour former les hydroxyperoxydes, qui initient la réaction d'auto-oxydation [12].

2.4.1.3.1.2.2. La peroxydation non-enzymatique

La peroxydation lipidique constitue la voie d'oxydation non enzymatique des lipides initiées par les espèces réactives de l'oxygène, est un processus physiologique normal qui a lieu dans tous les tissus de l'organisme vivants [123]. Cette voie constitue un processus de dégradation en chaîne des acides gras et engendre la formation d'hydroperoxydes lipidiques.

Contrairement aux trois voies d'oxydation enzymatique, la peroxydation lipidique s'avère le plus souvent néfaste. Au lieu de conduire à des biomolécules essentielles pour l'organisme, elle

génère des molécules capables de réagir avec les autres entités cellulaires ou nucléaires parmi lesquelles l'ADN.

2.4.1.3.1.2.3. Mécanisme de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique entraînée par l'action des radicaux libres est une réaction spontanée en chaîne qui comporte trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison [124].

On distingue deux types d'initiations, radicalaire et par l'oxygène singulet.

2.4.1.3.1.2.3.1. Peroxydation lipidique par initiations radicalaire

Un atome d'hydrogène d'un acide gras est arraché au cours d'une étape d'initiation par un radical (hydroxyle, alcoxyle ou peroxyde). Ensuite, une étape de propagation permet l'amplification de la dégradation initiale avec formation d'hydroperoxydes lipidiques. Ces derniers se décomposent en un nombre important de produits secondaires. Le processus de propagation peut être arrêté par des étapes de terminaison pouvant faire intervenir des antioxydants.

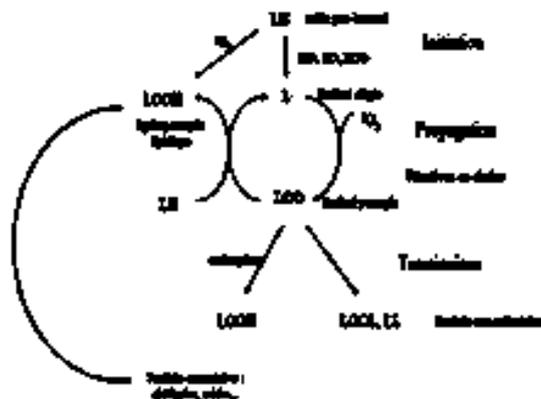


Figure 21: Principe de la peroxydation lipidique

a) Etape d'initiation :

Le mécanisme de peroxydation lipidique est initié par arrachement d'un atome d'hydrogène, soit d'un acide gras, soit du cholestérol par une ROS. On considère généralement que le radical hydroxyle HO^\bullet , les radicaux alcoxydes RO^\bullet et peroxydes ROO^\bullet (les acteurs principaux de la propagation de la peroxydation lipidique), HOO^\bullet , et NO_2^\bullet font parties des espèces initiatrices majeures chez les mammifères. Le radical hydroxyle constitue l'entité la plus réactive [125].

Cette réaction aboutit à la formation d'un radical d'acide gras [126] ou d'un radical dérivé du cholestérol [11]. Pour les acides gras, les atomes d'hydrogène des groupements bis-allyliques

sont les plus facilement arrachés [127] alors que pour le cholestérol, il s'agit de l'atome d'hydrogène lié au carbone C7. Les acides gras les plus conjugués sont les plus facilement oxydables, le radical alkyle d'acide gras étant alors stabilisé par mésomérie [128].

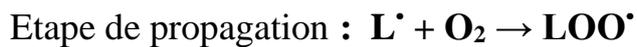


b) Etape de propagation

Cette étape implique deux réactions :

- Le radical alkyle formé réagit tout d'abord très rapidement avec l'oxygène pour former un radical peroxy très peu stable. Cette réaction est suivie par une étape, cinétiquement limitante, au cours de laquelle le radical peroxy arrache à son tour un atome d'hydrogène à un acide gras pour générer un hydroperoxyde lipidique ainsi qu'un nouveau radical alkyle d'acide gras qui va assurer la propagation de la réaction [129].

Notons également que certains radicaux peroxy peuvent subir des transpositions ou des cyclisations avant de réagir avec un nouveau lipide [130].



. Après diffusion des membranes cellulaires vers le cytoplasme, les hydroperoxydes lipidiques sont peu stables vont se dégrader par des mécanismes complexes et variés, surtout en présence de métaux réducteurs (cuivre et fer) libres ou sous formes hémiques [131]. Leur décomposition aboutit à la formation des produits secondaires de la peroxydation lipidique.

c) Etape de terminaison

Le processus de propagation en chaîne amplifiant la dégradation lipidique initiale peut être interrompu par combinaison des radicaux lipidiques pour donner des produits non radicalaires[125]. La réaction la plus fréquente est la dimérisation de deux radicaux peroxyes selon le mécanisme de Russell. L'étape de terminaison peut également faire intervenir des molécules anti-oxydantes comme l' α -tocophérol qui joue le rôle de piègeur de radicaux [132]. L'anti-oxydant est alors transformé en radical puis est réduit par l'acide ascorbique pour retrouver sa forme initiale [133].



2.4.1.3.1.3.2. La peroxydation lipidique initiée par l'oxygène singulet

L'oxygène singulet peut également initier la peroxydation lipidique. L'espèce réactive de l'oxygène s'additionne alors aux doubles liaisons C=C de la chaîne des acides gras pour former directement les hydroperoxydes. Dans ce cas, il n'y a pas d'étape de propagation. Cependant, par décomposition en radicaux libres, les hydroperoxydes peuvent servir d'initiateurs radicalaires et engendrer un nouveau processus en chaîne de peroxydation lipidique [134].

2.4.1.3.1.2.4. Les produits issus de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un processus complexe allant de la formation des produits primaires jusqu'à celle des produits secondaires [135].

Tableau 2 : Les produits issus de la peroxydation lipidique

Les produits primaires	Les diènes conjugués
	Les hydroperoxydes
Les produits secondaires	Le malondialdéhyde (MDA)
	4-hydroxynonanal (4-HNE)
	Les isoprostanes

2.4.1.3.1.2.5. Les biomarqueurs et conséquences de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est une source endogène des aldéhydes qui provoquent de nombreux dommages oxydatifs aux macromolécules intracellulaires. Ces dommages sont très nombreux, les hydroperoxydes instables en se décomposant vont donner de nouveaux radicaux libres provoquant des oxydations des biomolécules, mais aussi des aldéhydes réactifs qui feront des adduits sur les groupements NH₂ des biomolécules (acides nucléiques, protéines, lipides).

- L'oxydation des protéines au niveau de leurs fonctions thiols altère leurs structures et leurs fonctions (perte d'activités des enzymes et des récepteurs).
- Toutes les structures de la cellule seront ainsi touchées et particulièrement les membranes (plasmiques, mitochondriale, lysosomale).
- Des conséquences nutritionnelles vont résulter de l'oxydation de nutriments (disparition des vitamines A, E, C, oxydation d'acides aminés) [119].

2.4.1.3.1.2.6. L'induction de la peroxydation lipidique model *in vitro* et *in vivo*

2.4.1.3.1.2.6.1. Le foie

Le foie représente l'organe interne le plus volumineux du corps humain, s'avère responsable de plusieurs fonctions physiologiques vitales, il reçoit et gère la plupart des nutriments et des substances nocives provenant du métabolisme cellulaire et de circulation. Les maladies du foie peuvent être causées par des produits chimiques toxiques, des médicaments et l'infiltration virale par l'ingestion ou l'infection. L'exposition à des polluants divers et des xénobiotiques comme l'alcool, le paracétamol, le tétrachlorure carbonique (CCl₄) endommagent le foie en produisant les ROS, qui est extrêmement toxique et produit des lésions dans le tissu hépatique par la liaison covalente et l'oxydation dans la base d'ADN, le lipide et la protéine, il peut aussi changer l'activité fonctionnelle d'enzymes et des protéines structurelles [136].

2.4.1.3.1.2.6.1.1. Le mécanisme de l'induction de la peroxydation lipidique par le FeSO₄ :

Le sulfate de fer est disponible comme une préparation de médicament, il est utilisé pour le traitement et la prévention de l'anémie ferroprive [137]. Le fer est potentiellement toxique et son accumulation dans l'organisme aboutit à la génération des ROS [138]. Le mécanisme majeur de l'hépatotoxicité induit par le fer, semble être dû au stress oxydatif pour augmentant la peroxydation lipidique hépatique. Le Fe²⁺ réagit avec l'eau oxygénée qui est un réactif essentiel dans la réaction fenton tirée par l'action du radical l'anion superoxyde, pour former le OH[•] fortement réactif. En raison de son haut potentiel standard [139]. Ce radical peut non-spécifiquement oxyder des molécules lipidiques dans la membrane cellulaire (des acides gras non saturés, les phospholipides et le cholestérol) pour former le LOOH [140].

2.4.1.3.1.2.6.1.2. Le mécanisme de l'induction de la peroxydation lipidique par Le CCl₄

L'exposition au CCl₄ est peut aboutir à l'hépatotoxicité aiguë chez les humains. C'est un hépatotoxine célèbre qui est responsable des dégâts hépatocellulaires [141]. Ces dégâts surviennent en deux phases. La phase initiale implique le métabolisme de CCl₄ par le cytochrome P450 aux radicaux trichlorométhyle et/ou peroxytrichlorométhyle (CCl₃[•],

$\text{CCL}_3\text{OO}^\bullet$) métabolites fortement réactifs. Ces radicaux peuvent se lier aux molécules cellulaires comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques, promouvant la peroxydation lipidique et finalement à la nécrose cellulaire. La deuxième phase implique l'activation des cellules Kupffer, qui est accompagnée par la production de médiateurs proinflammatoires [142].

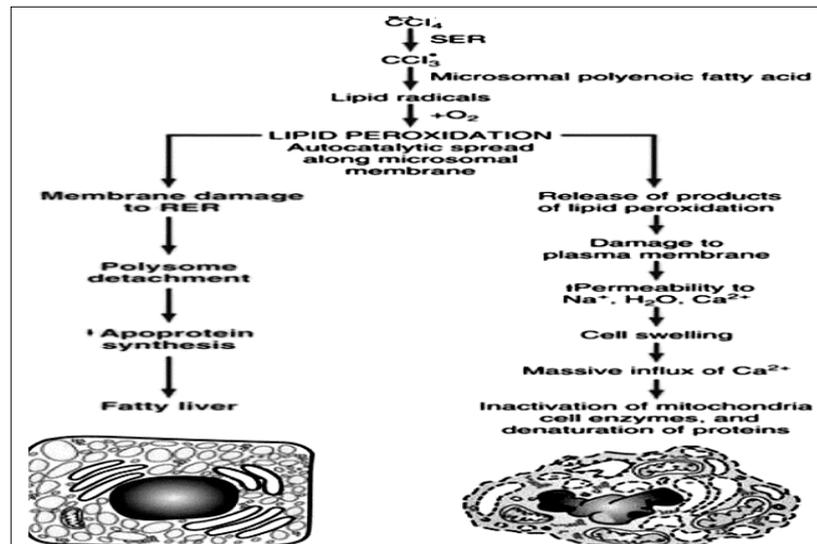


Figure 22 : La chronologie des étapes menant à un changement des acides gras et à la nécrose cellulaire par le tétrachlorure de carbone.

2.4.1.3.1.2.6.2. Érythrocytes

Généralité

L'érythrocyte est une cellule anucléée, sa membrane déformable lui permet de transiter vers les capillaires sanguins et atteindre les tissus du corps. Il a seule fonction, le transport du dioxyde de carbone du tissu aux poumons et du transport de l'oxygène des poumons au tissu. Il a une durée de vie moyenne de 120 jours dans la circulation sanguine.

-Membranes érythrocytaires

La membrane érythrocytaire est une membrane fluide. La composition biochimique de la membrane représente en poids 40-55 % de protéines, 35- 45 % de lipides, et 10 % de glucides. Ces derniers sont conjugués soit à des protéines (glycoprotéines), soit à des lipides (glycolipides). Le modèle de structure généralement admis est celui de Singer et Nicolson

[143]. La membrane est constituée par une trame lipidique en double feuillet d'une épaisseur de 7 à 9 nm. Dans cette bicouche phospholipidique baignent des molécules protéiques enchâssées profondément dans les deux feuillets lipidiques.

- Protéine

- Du côté interne, le réseau protéique constitue le cytosquelette qui confère la forme discoïde au GR et assure sa grande déformabilité. Le squelette protéique comporte 3 protéines principales : la spectrine, l'actine ou protéine 5, la protéine 4.1 . qui soutiennent la couche phospholipoprotéique membranaire grâce à des liaisons avec les protéines 3 (via l'Ankyrine) avec les glycophorines (via la protéine 4/1 et l'Actine).

- Du côté externe, se situent les récepteurs et les motifs antigéniques . Les protéines transmembranaires jouent un rôle essentiel dans les échanges du GR avec le milieu extérieur. Les plus importantes sont les ATPases Na^+ et K^+ dépendantes qui permettent le transport actif des cations Na^+ et K^+ , le ATPases Ca^{++} dépendantes et les protéines permettant le transport des anions, de l'eau et du glucose [144].

-Les lipides

La majorité des lipides de la membrane érythrocytaire sont représentés par les phospholipides (20 %), le cholestérol (16 %) et les glycolipides (4 %).

a - Les phospholipides :

Les phospholipides prédominants sont la phosphatidylcholine (28 %), la phosphatidyléthanolamine (26 %), la sphingomyéline (25 %) et la phosphatidylsérine (13 %). On trouve aussi, en faibles quantités, l'acide phosphatidique (2 %), le phosphatidylinositol (1%) et la lysophosphatidylcholine (1 %). Les lipides sont répartis asymétriquement dans la membrane, la majeure partie de la phosphatidylcholine (65-75 %) et la sphingomyéline est orientée vers l'extérieur de la cellule, tandis que la phosphatidylsérine (96 %) est dans le cytoplasme.

b- Le cholestérol :

possède des cycles aromatiques, qui lui permettent d'adopter une configuration plane et rigide, ainsi qu'une chaîne latérale, qui est libre : il peut par conséquent s'insérer dans les membranes entre les PL. Cette propriété est essentielle pour son rôle de modulateur de la fluidité membranaire.

c -Les glycolipides :

Une partie des lipides sont glycosylés et constituent la classe des glycolipides qui sont représentés par les globosides, les trihexoside-céramides et les dihexoside-céramides. Les glycophorines érythrocytaires s'intègrent entre les phospholipides dans la couche bilamellaire, avec les longs axes hydrophobes des acides gras plantés dans la couche lipidique.

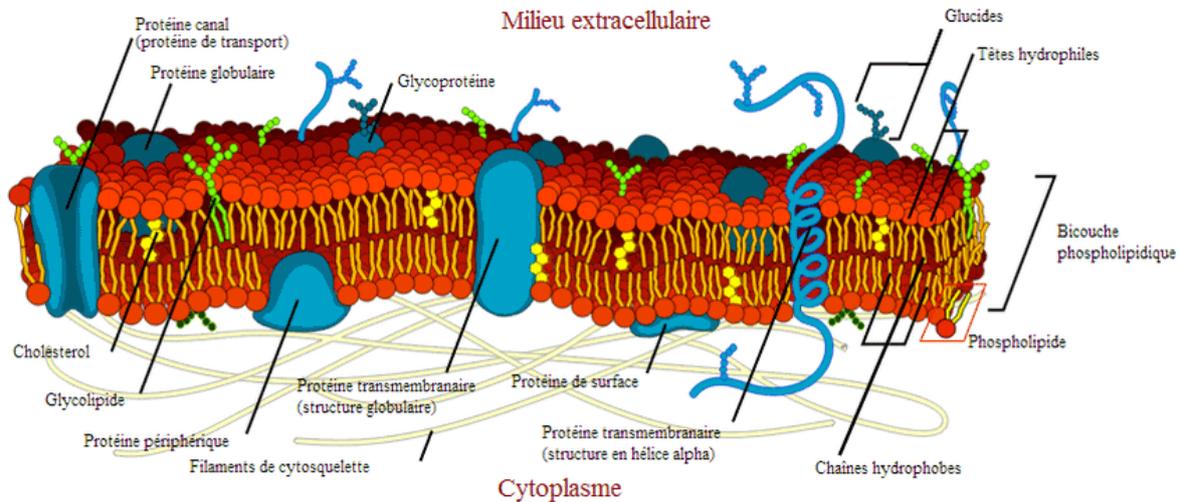


Figure 23 : La membrane d'Erythrocyte.

- Hémoglobines

Principal constituant du GR, elle représente 95 % des protéines intracellulaires. L'Hb est une chromoprotéine qui donne la couleur rouge aux hématies. Sa fonction essentielle est celle de transporteur d'oxygène, assurant l'oxygénation tissulaire. Elle est maintenue à l'état fonctionnel grâce aux enzymes érythrocytaires. L'Hb est constituée de quatre chaînes peptidiques de globine et d'une molécule d'hème [145].

2.4.1.3.1.2.6.2.1. Composition de la molécule d'hémoglobine

La globine est constituée de chaînes polypeptidiques variables :

Les hémoglobines humaines sont des protéines tétramériques, constituées de quatre sous-unités polypeptidiques identiques les deux à deux : deux polypeptides ou globines alpha et deux globines non alpha (beta pour l'hémoglobine adulte A , gamma pour l'hémoglobine fœtale et deta pour l'hémoglobine A2). unies par des liaisons non covalentes. Chaque chaîne de globine possède un groupe prosthétique, l'hème, constitué d'une protoporphyrine IX et d'un atome de fer divalent qui fixe l'oxygène.

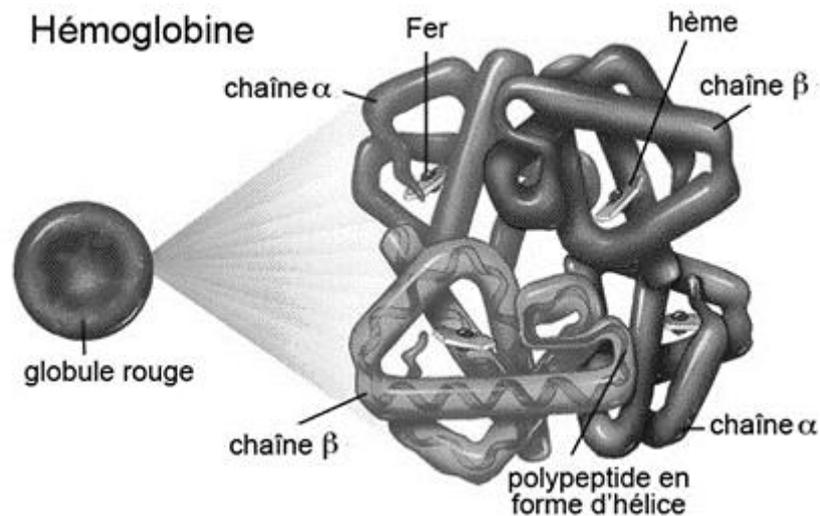


Figure 24 : Structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte

2.4.1.3.1.2.6.2.2. La synthèse de l'hémoglobine :

La synthèse de l'hémoglobine débute dès le stade de proérythroblaste et s'achève à celui de réticulocyte.

- La synthèse des chaînes de globine :

. La répartition des différentes hémoglobines varie selon l'âge:

- Chez le fœtus l'Hb F est majoritaire et l'Hb A représente moins de 10 % de l'Hb totale;
- A la naissance l'Hb F représente 60 à 85 % de l'Hb totale;
- Six mois après la naissance, un profil identique à celui de l'adulte est atteint HbA1 : 97%, HbA2 : < 3%, HbF : < 1%.

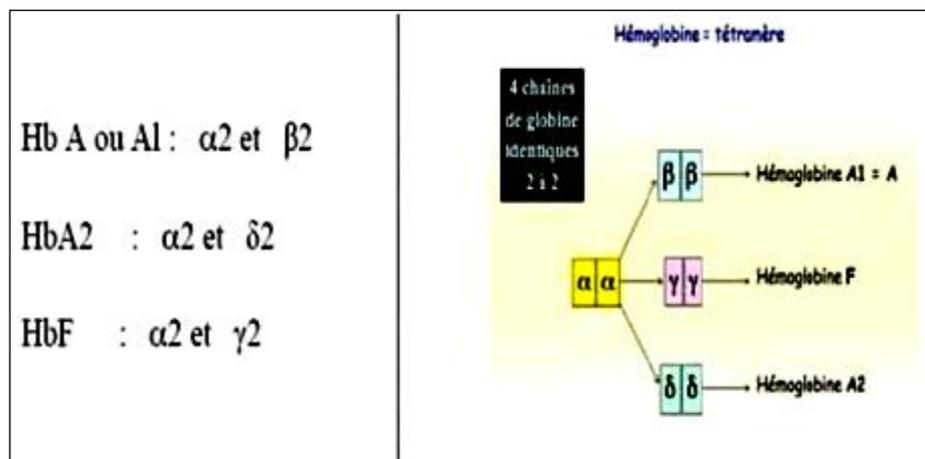


Figure 25 : Représentation des 4 chaînes de globine identiques 2 à 2 [146]

- La synthèse héminique :

La synthèse héminique s'effectue au même temps dans les érythroblastes. Trois étapes biochimiques peuvent être schématisées : - Formation d'acide delta amino-lévulinique (ALA) à partir du succinyl coenzyme A (produit par le cycle de Krebs dans la mitochondrie) qui s'unit à la glycine grâce à l'ALA synthétase [147].

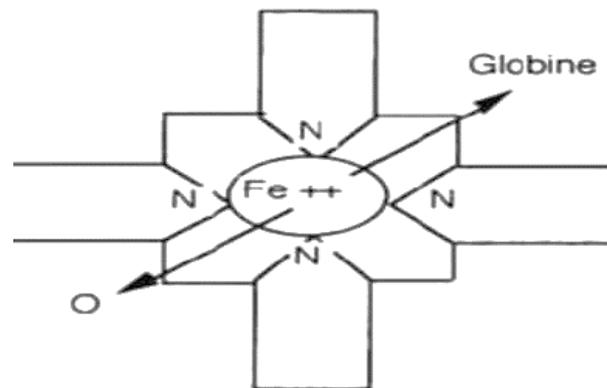


Figure 26: Schéma d'une molécule d'hème.

2.4.1.3.1.2.6.2.3. Etat redox érythrocytaire :

La richesse du globule rouge en oxygène, en Hb et en fer ainsi que la membrane érythrocytaire en acides gras poly-insaturés, rend le globule rouge susceptible aux dommages peroxydatifs. Différents facteurs mènent à la formation des RL (O_2^- , H_2O_2 , HO^\cdot) dans les érythrocytes dont l'auto-oxydation de l'Hb et la réaction de Fenton [138].

2.4.1.3.1.2.6.2.4. Conséquences pathologiques des ROS sur les érythrocytes:

À cause de la présence de l'hémoglobine les globules rouges produisent les radicaux libres qui sont responsables de la peroxydation lipidique et de la formation du radical superoxyde lors de l'auto-oxydation de l'oxyhémoglobine en méthémoglobine. La réaction du radical superoxyde avec les peroxydes dans le globule rouge produit des espèces hautement réactives, telles que le radical hydroxyle. [139]. Or les globules rouges ne peuvent pas synthétiser leurs lipides membranaires, donc si une peroxydation a lieu, la paroi est définitivement endommagée et l'hémoglobine libérée ; ce phénomène est l'hémolyse peroxydative [148].

De nombreuses expériences ont été menées afin de déterminer les effets de substances oxydantes sur les globules rouges. Il a été montré que l'exposition de globules rouges humains à l'action de concentrations faibles de peroxyde d'hydrogène provoque la formation de complexes covalents entre la spectrine et l'hémoglobine ce qui entraîne par la suite une modification de la forme et de la déformabilité cellulaire, avec une réorganisation des lipides de la membrane et une modification des propriétés de surface [149]. En augmentant le stress oxydant, suite à une exposition à de l'oxygène pur une altération des lipides membranaires a été observée. Deux hypothèses s sont conçues :

- soit l'hémolyse est une conséquence directe de la peroxydation des acides gras insaturés de la membrane érythrocytaire
- soit l'hémolyse fait suite à la rupture des doubles liaisons des AGPI, qui entraîne une modification de la forme du globule rouge et de la perméabilité.

on conclut que la peroxydation lipidique n'est que la phase initiale de modifications biochimiques initiées par l'hyperoxémie, et que la lyse cellulaire est le résultat de nombreuses modifications membranaires et énergétiques. En captant un hydrogène sur un lipide membranaire, un radical libre va entraîner la formation d'un radical peroxygéné. Celui-ci va entraîner une chaîne de réactions, se propageant au sein de la membrane cellulaire. Cette attaque radicalaire entraîne une réorganisation profonde de l'architecture membranaire par :

- l'oxydation des groupements thiols de la membrane,
- la peroxydation des lipides avec création de pontages moléculaires,
- la formation de liaisons avec la spectrine,
- l'inhibition des enzymes et des protéines de transport.

Tout ceci entraîne une perte de la souplesse et de la solidité membranaire, avec des conséquences sur les fonctions de barrière et de transmission des informations de la membrane. Ces modifications sont liées à la formation de brèches ioniques, à des troubles de la perméabilité, ainsi qu'à des modifications de la relation récepteurs-ligands. La réponse cellulaire au stress dépend de l'intensité de la stimulation. Lorsqu'il est modéré, il stimule la prolifération cellulaire, ainsi que la surexpression des enzymes antioxydantes. Lors de stimulation plus importante, les radicaux libres vont stimuler l'activation de protéases, ce qui va entraîner l'altération des transports ioniques, et la fuite de la glutathion synthétase intracellulaire. Lors de stress excessif, les radicaux libres entraînent l'oxydation des lipides, protéines et glucides. Les dégâts cellulaires sont alors importants, avec lyse cellulaire [149].

Chapitre III
LES POLYPHENOLS

III. : Les polyphénols

3.1. Généralités

Les polyphénols sont des molécules organiques hydrosolubles largement répandus dans le règne végétal, par plus de 8000 structures identifiées. Ils se résultent du métabolisme secondaire des plantes, principalement via la voie du shikimate. Ils comportent au moins un groupe phénolique dans leur structure et se caractérisent généralement par haut poids moléculaire élevé. Ils se caractérisent par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes [150, 151]. Ils se classifient en plusieurs sous-groupes selon la structure de leur squelette carboné qui se diversifie suivant la position des substitutions sur les noyaux, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature des liaisons hétérosidiques [152]. Ils contribuent aux réactions de défense vis-à-vis différents type de stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences). Ils contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) [153].

3.2. Localisation des polyphénols dans les plantes :

Les polyphénols peuvent être localisés dans les divers organes de la plante, : racine, tige, bois, feuille, fleur, fruit. Leurs principales sources alimentaires sont les fruits, les légumes, les plantes médicinales, les boissons (tels le thé, le café, les jus de fruits) [154].

A l'échelle de la cellule végétale, les polyphénols sont principalement répartis dans deux compartiments : les vacuoles et la paroi. Dans les vacuoles, ils sont conjugués avec des sucres ou des acides organiques, ce qui permet d'augmenter leur solubilité et de limiter leur toxicité vis-à-vis la cellule. Au niveau de la paroi, on trouve surtout de la lignine et des flavonoïdes liés aux structures pariétales. Les composés phénoliques sont synthétisés dans le cytosol. Une partie des enzymes impliquées dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes est liée aux membranes du réticulum endoplasmique, où elles sont organisées en métabolons [155].

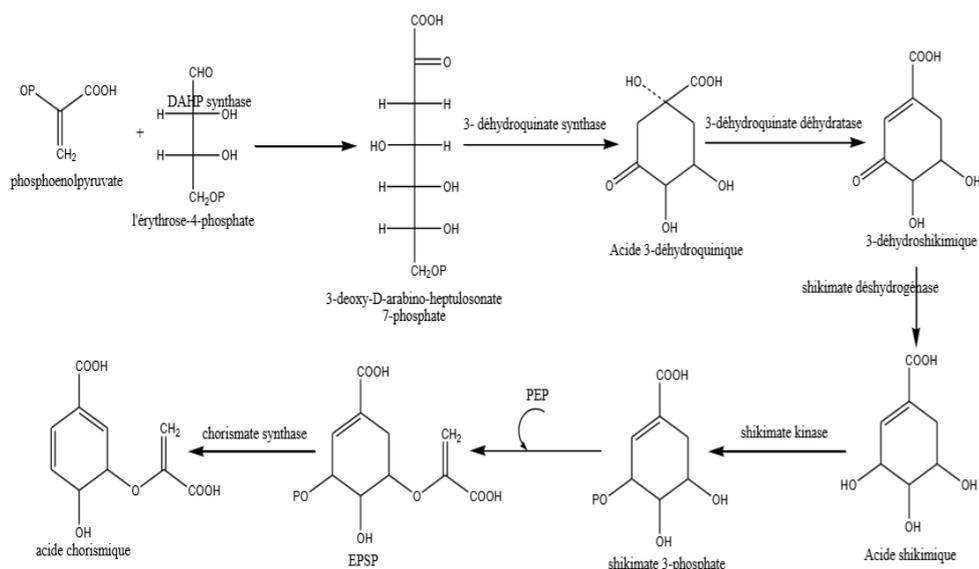
Au niveau des tissus, la localisation des polyphénols est liée à leur rôle dans la plante et peut être très caractéristique. Au sein des feuilles leur répartition est variable, par exemple les anthocyanes et les flavonoïdes sont majoritairement présents dans l'épiderme. Certains composés sont accumulés dans des organes bien définis.

3.3. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont synthétisés à partir des hydrates de carbone via deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/ malonate [156].

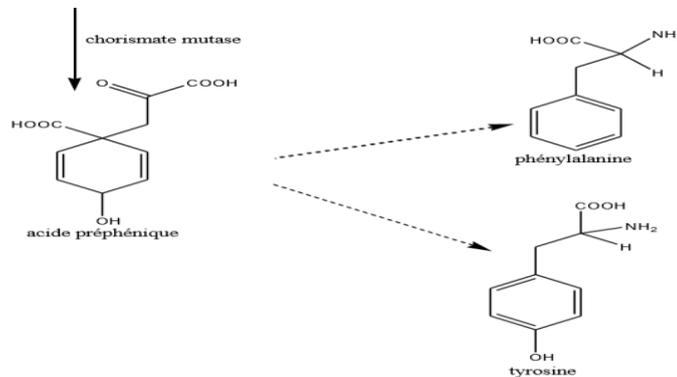
• La voie de l'acide shikimique.

La voie de l'acide shikimique représente la voie principale pour la biosynthèse des composés aromatiques chez les plantes et les micro-organismes y compris les acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ces derniers sont des métabolites primaires et servent comme précurseurs de nombreux produits naturels secondaire tels les flavonoïdes, les acides phénoliques, les coumarines, les alcaloïdes [157].



Les deux substrats phosphoenolpyruvate et l'érythrose-4-phosphate sont des précurseurs qui dérivent respectivement de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphate. Ils se condensent pour former le 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP). Cette réaction est catalysée par l'enzyme DAHP synthase (2-déhydro-3-déoxyarabinoheptulosonate-7-phosphate synthase). La série des réactions enzymatiques conduit respectivement à la formation de l'acide 3-déhydroquinique par l'enzyme 3-déhydroquinatesynthase, l'acide 3-déhydroshikimique par l'enzyme 3-déhydroquinatase et finalement l'acide shikimique par l'enzyme shikimate déshydrogénase.

L'acide shikimique est encore converti en shikimate 3-phosphate par l'enzyme **shikimate kinase**, et plus tard en 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) par l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. L'EPSP est alors converti en acide chorismique par la chorismate synthase. L'acide chorismique est à un point de branchement pour la biosynthèse des acides aminés aromatiques: le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine



La phénylalanine et la tyrosine sont des précurseurs d'une importante classe des composés phénoliques ; les phénylpropanoïdes, aussi bien que plusieurs d'autres classes des composés phénoliques. Ceci exige la conversion de l'acide chorismique en acide préphénique, catalysée par la chorismatémutase et en acide arogénique catalysé par le préphénateaminotransférase. L'enzyme arogénatedéhydratase convertit l'acide arogénique en phénylalanine, tandis que l'enzymearogénate déshydrogénase génère la tyrosine [158].

La désamination de la phénylalanine grâce à l'action de la Phénylalanine Ammoniac Lyase (PAL) conduit à l'acide t-cinnamique, (le premier phénylpropane formé).

La PAL est l'enzyme constituant le point de branchement entre le métabolisme primaire du shikimate et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes.

L'acide t-cinnamique est ensuite transformé en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement par l'action des enzymes cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et CoA-ligase (4CL).

Cette étape conduit directement à la voie du phénylpropanoïde conduisant à la synthèse des différents composés phénoliques [159].

Une grande diversité caractérise ces phénylpropanoïdes spécifiques du règne végétal. Le squelette carboné subit, de manière régiospécifique, des réactions d'hydroxylation, de méthylation, de glycosylation, d'acylation, de prénylation ou encore de sulfatation. Ces réactions biochimiques sont catalysées par des enzymes spécialisées appartenant à des familles

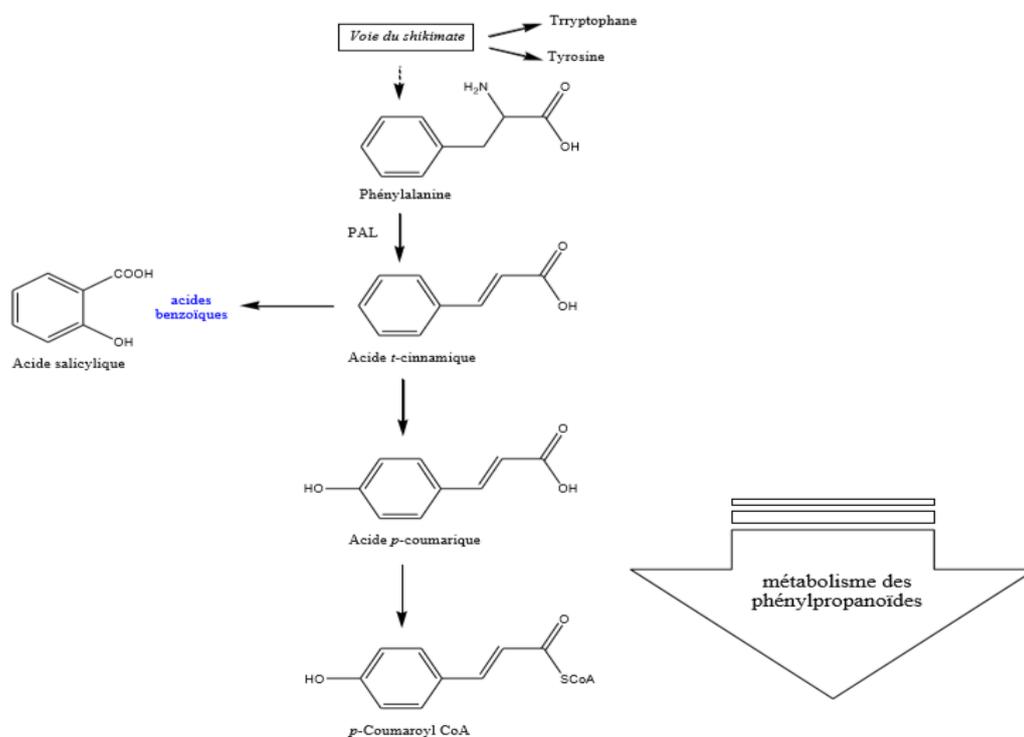
multigéniques telles que les monooxygénases, les méthyltransférases, les glucosyltransférases ou encore les acyltransférases.

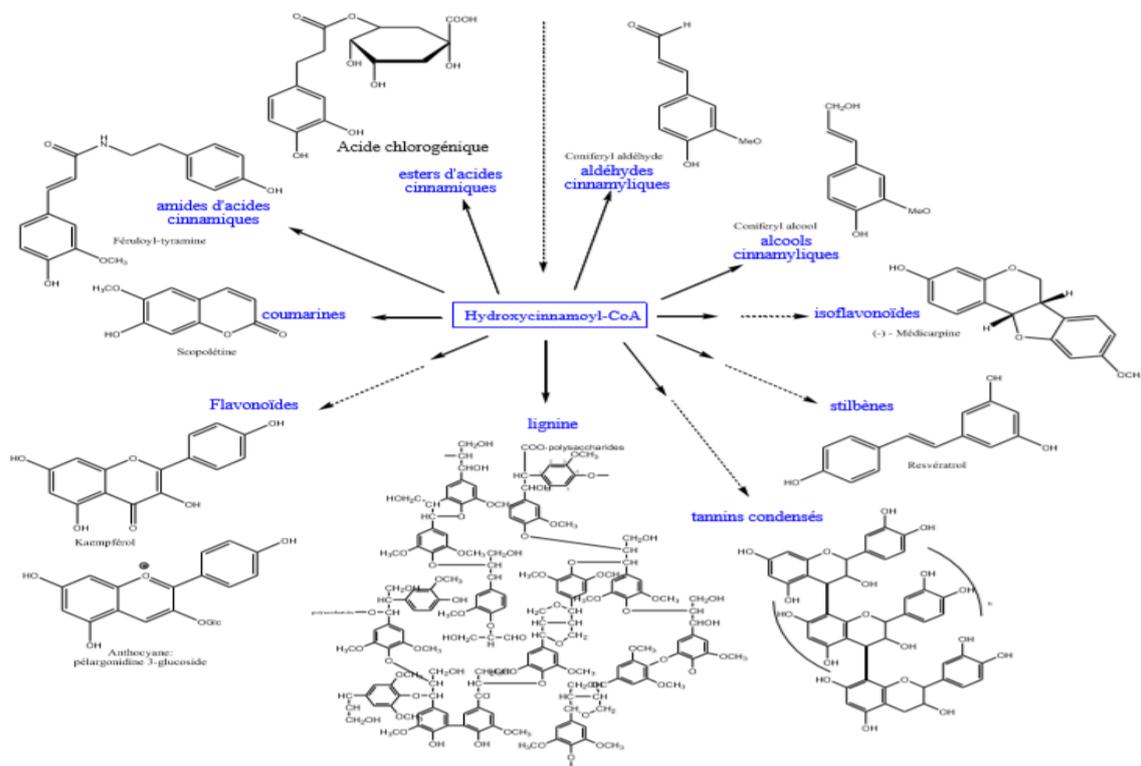
Cette variabilité structurale reflète la multitude des activités et des fonctions biologiques de ces composés. Ceci implique une régulation fine des étapes enzymatiques intervenant dans cette voie métabolique, que ce soit au cours du développement de la plante ou en réponse à divers stimulus environnementaux.

La régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes et de la voie de l'acide shikimique est coordonnée, afin de mieux contrôler le flux de carbone injecté dans la voie des phénylpropanoïdes, par l'intermédiaire de la PAL [160].

• Voie de l'acétate / malonate

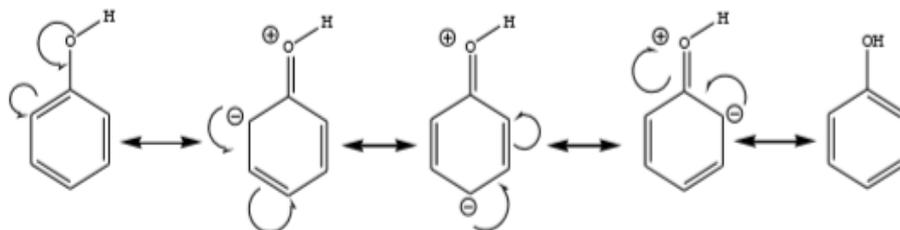
La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétylCoA donnant le malonate. A travers cette voie s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase.





3.4. Propriétés chimiques des polyphénols

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques [161] particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons ($-M$) et substituants à effet mésomère donneur ($+M$). La conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome oxygène avec le cycle traduit l'effet ($+M$) du groupe OH. Ce phénomène augmente la délocalisation électronique et produit une charge négative partielle sur les atomes C2, C4, C6 (figure 3) [162].



On constate qu'une charge négative apparaît en position ortho et para du phénol (figure3), ce sont donc les positions susceptibles de recevoir un électrophile [163]. De ces caractères de base découlent les différentes propriétés physico-chimiques suivantes :

- La nucléophilie
- Les propriétés réductrices
- La polarisabilité
- La Liaison hydrogène
- L'acidité

3.5. Classifications

Les polyphénols sont en général classés en flavonoïdes et non flavonoïdes. Le groupe des non flavonoïdes comprend plusieurs composés parmi lesquels on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthones [160]. Le groupe des flavonoïdes comprend principalement; les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols. Ce groupe se caractérise par une structure de type C6-C3-C6, soit deux cycles aromatiques reliés par trois carbones. Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation [164].

3.5.1. Les non flavonoïdes

3.5.1.1. Les acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)

Les acides phénoliques représentent les formes les plus simples des composés phénoliques, ils atteignent environ le tiers de la teneur totale de l'alimentation en polyphénols. Ils possèdent au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils se divisent en deux sous-classes, les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique [165].

3.5.1.1.1. Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)

Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque proviennent de l'acide benzoïque et prennent une formule de base de type C6-C1 [166]. Ils sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides. Ils existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique [167].

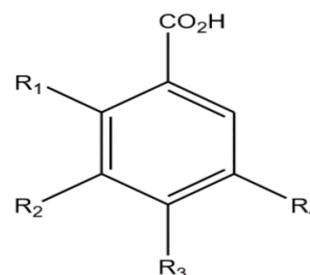
R1=R2=R4=H, R3=OH : acide phydroxybenzoïque

R1=R4=H, R2=R3=OH : acide protocaatéchique

R1=R4=H, R2=OCH3, R3=OH : acide vanillique

R1=H, R2=R3= R4=OH : acide gallique

R1=OH, R2=R3= R4=H : acide salicylique



3.5.1.1.2. Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)

La structure de base C6-C3 des acides hydroxycinnamiques dérive de celle de l'acide cinnamique (figure 5) Rarement libres, ils sont souvent estérifiés [168] et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (*O*-acylglucosides, *O*-arylglucosides) ou des polyols tel l'acide quinique [165].

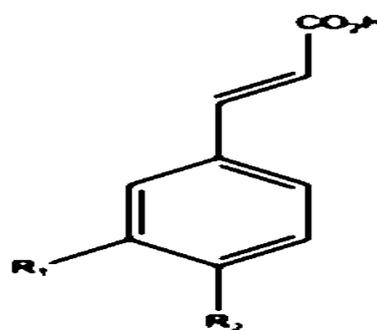
Les molécules de base de la seriehydroxycinnamique : L'acide *p*-coumarique, caféique, férulique, et l'acide sinapique. Le composé le plus courant est l'acide caféique qui représente à lui seul 75 à 100 % des acideshydroxycinnamiques totaux de la plupart des fruits [9]. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique, ainsi que on modification via des réactions secondaires représentent joue un rôle primordial das la réactivité chimique de ces molécules [166].

R1=R2=H : acide cinnamique (non phénolique)

R1=H, R2=OH : acide *p*-coumarique

R1=R2=OH : acide caféique

R1=OCH3, R2=OH : acide férulique



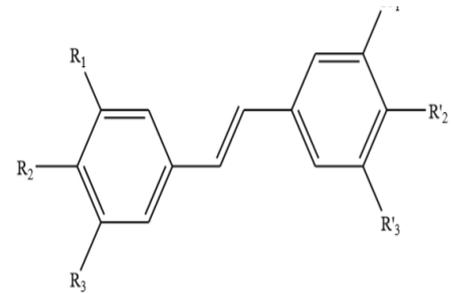
3.5.1.2. Les Stilbènes (C6-C2-C6)

Les stilbènes dérivent de l'acide cinnamique (phénylpropanoïdes), ils présentent une structure en C6-C2-C6, avec deux cycles aromatiques (un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para). Les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons π sur la totalité de la molécule. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine [169].

R1=R3= R'2=OH, R2=R'1= R'3=H : resvératrol

R1=R3=OCH3 , R2=R'1=R'3=H, R'2=OH : ptérostilbène

R1=glucose, R2=R'1=R'3=H, R3=R'2=OH : picéide

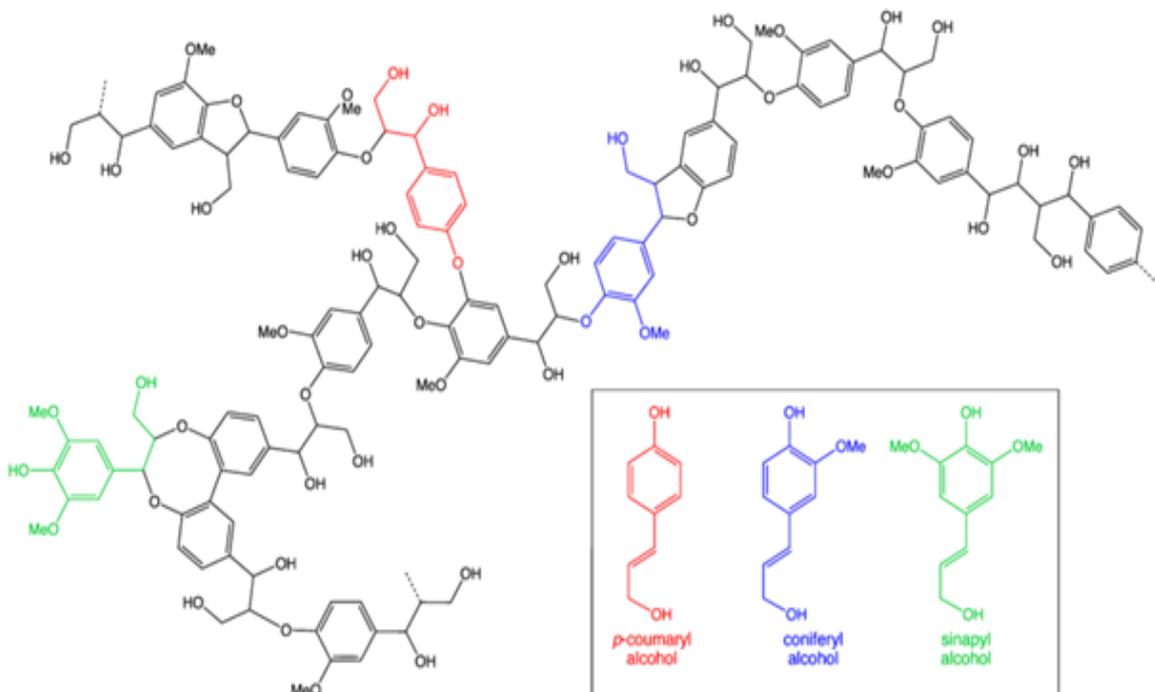


3.5.1.3. L lignines (C6-C3)n

Les lignines sont des polymères ramifiés formés de trois alcools phénoliques simples (alcool sinapylique, alcool coniférylique, alcool p-coumarylique). Les alcools s'oxydent par la suite par la peroxydase pour donner des radicaux libres.

Les lignanes phénoliques se trouvent dans la plupart des plantes riches en fibres, y compris les graines de citrouille, graines de sésame, les céréales, les fruits et les légumes [170].

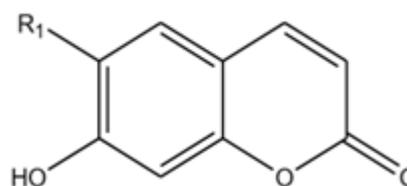
La lignine est un polymère insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques. Les trois monomères de bases peuvent s'assembler de diverses manières pour former une structure tridimensionnelle très ramifiée [171]. La figure suivante illustre la structure d'une lignine.



3.5.1.4. Les coumarines (C6-C3)

Les coumarines sont des tétracycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ce sont des composés phénoliques cyclisés (figure 8) qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux. Cependant, leur voie de biosynthèse peut varier d'une espèce à l'autre. Ils inhibent la croissance et la sporulation des champignons et autres microorganismes qui sont pathogènes pour les plantes [172]. Les coumarines ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides orthohydrocinnamiques [173].

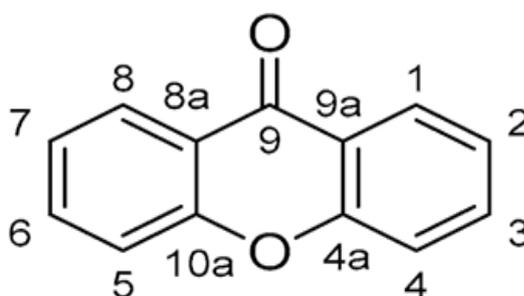
- R1=H : umbelliférol
- R1=OH : aesculol
- R1= OCH₃ : scopolétol



3.5.1.5. Les xanthones C6-C1-C6

C'est une famille constituée des composés polyphénoliques ayant une structure de base (C6-C1-C6).

La structure chimique d'un xanthone est constituée d'un système cyclique conjugué composé de carbone 1-4 (cycle aromatique A) et de carbone 5-8 (cycle aromatique B) [174] et d'un système à trois anneaux qui contient plusieurs groupes fonctionnels comprenant l'isoprène, le groupe méthoxy et les groupes phényles, ainsi que des protons aromatiques, des groupes hydroxyle phénoliques, des protons hydroxyle, et les anneaux dihydrofuranne [175].

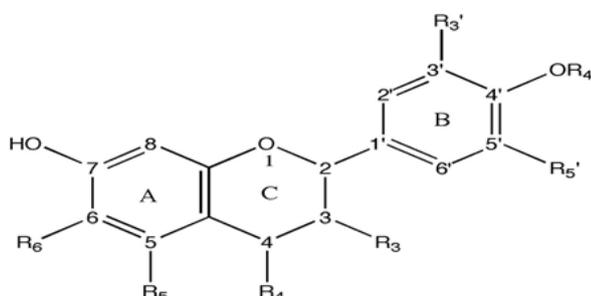


3.5.2. les flavonoïdes (C6-C3-C6)

Les flavonoïdes englobent une très large gamme de composés naturels (plus de 6000) quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux [176]. Ils possèdent la même structure de base (C6-C3-C6) contenant quinze atomes de carbone dans leur structure de base : (deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (figure 10) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C). Leur structure riche en groupements hydroxyles leur attribue le terme polyphénols. Ces groupements hydroxyles sont responsables de bioactivités des polyphénols [177].

La liste des flavonoïdes ne cesse de croître, ceci est dû à l'apparition de nombreux modèles de substitution; les substituants primaires (groupe hydroxyle) peuvent eux-mêmes être substitués (glycosylés ou acylés) donnant parfois des structures très complexes [9].

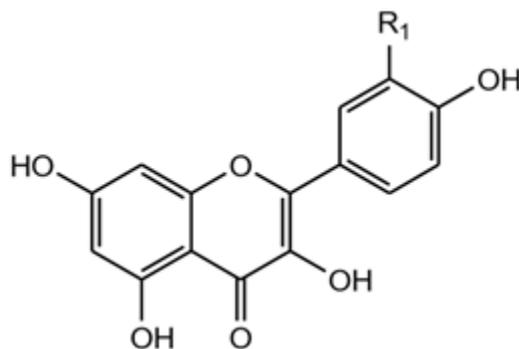
Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les isoflavones, et les anthocyanes, ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.



3.5.2.1. Les flavonols

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et la présence d'une double liaison en position 2-3 (Figure 11). Ces composés constituent le groupe le plus hydroxylé des flavonoïdes et les plus répandus dans le règne végétal. Elles sont essentiellement représentées par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjuguée glycosylés [178].

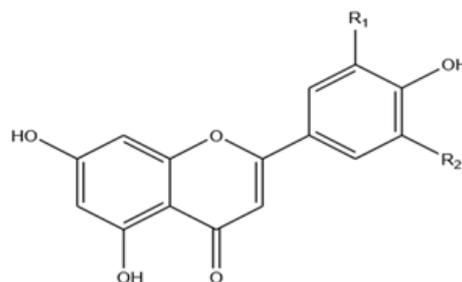
- R1=H : Kaempférol
- R1= OH : Quercétine
- R1=OCH₃ : Isorhamnétine



3.5.2.2. Les flavones

Les flavones sont structurellement très similaires aux flavonols et ne diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C (figure 12). Elles sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent, leur apport alimentaire est très faible [178].

- R1=R2=H : Apigénine
- R1= OH, R2=H : Lutéoline
- R1=R2= OCH₃ : Tricine



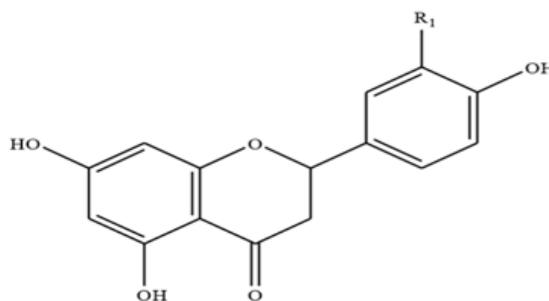
3.5.2.3. Les flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2 (figure 13). Les principales sources des flavanones sont les agrumes, mais ils sont également trouvés dans les tomates et certaines plantes aromatiques tels que la menthe. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée. Parmi les formes libres des flavanones, on cite la naringénine retrouvée dans le pamplemousse et l'orange amère. Le plus souvent, les flavanones existent sous forme glycosylée en position 7, comme dans le cas d'héspéridine, qui se trouve dans le citron, l'orange douce et la mandarine, et les néohesperidosides responsables du goût amer du pamplemousse et de l'orange [179].

R1=H : Naringénine

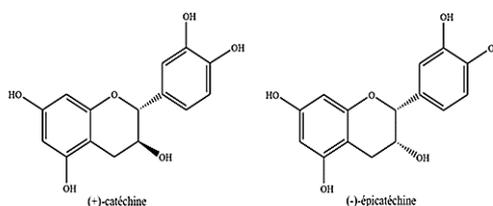
R1= OH : Eriodictyol

R1=OCH₃ : Hésprítine



3.5.2.4. Les flavan-3-ols(flavanols)

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4 (figure14). Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavanols sont largement répandus dans les fruits et légumes, mais la source la plus riche de flavanols au sein de l'alimentation humaine est certainement le thé. Dans ce groupes chaque composé peut exister sous forme de quatre stéréoisomères optiquement actifs : (+)catéchine, (+)-épicatéchine, (-)-catéchine, (-)-épicatéchine. Le premier et le quatrième sont les formes les plus répandues.

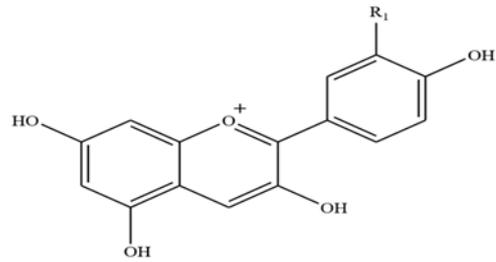


3.5.2.5. Les isoflavones

Les isoflavones se sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes (**BOUHEROUM,2007**). Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt que la position C2 (figure15). Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal (**Fraga, 2009**). Les isoflavones se trouvent presque exclusivement dans les légumineuses [178, 179].

R1=OH, R2=OH : Genisteine

R1= OGlu, R2=H : Daidzeine



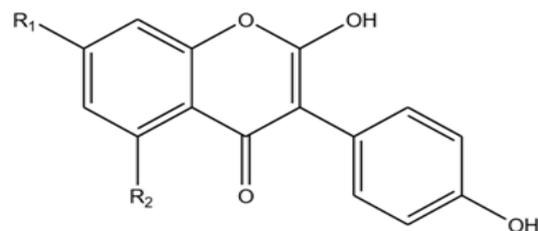
3.5.2.6. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces [180]. Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylium (figure 16). Constituée de trois cycles aromatiques, responsable du pouvoir absorbant (chromophore).

Elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplis d'eau [181] et ils sont responsable des couleurs rouges, violettes et bleues dans les fruits, les légumes, les fleurs et les graines, leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu , mais aussi jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes et dans la dispersion des graines [182]. Les anthocyanes sont stabilisés dans les plantes par des interactions avec des acides aminés, des tanins, des 4-oxo-flavonoïdes.

R1=H : Pélagonidine (Rouge)

R1= OH : Cyanidine (Bleu)



3.5.3. Les tanins (C15)n:

Les tanins sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles, de structures variées et de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Elles sont fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments [183].

Les tanins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources

les plus importantes de tannins sont le vin et le thé. On distingue deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables et condensés.

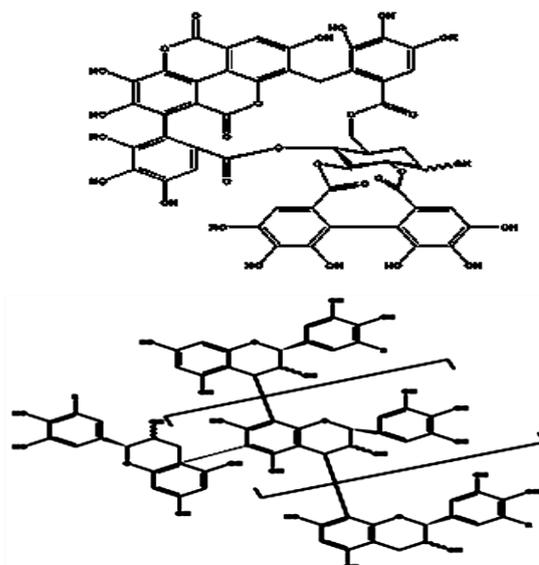
3.5.3.1. Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables (figure 17) (acides tanniques) sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation ; l'acide éllagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Ils peuvent diminuer la dégradation des parois dans le rumen et être hydrolysés dans l'intestin en libérant des produits toxiques pour le foie et le rein [184]. Comme leur nom l'indique, ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude.

3.5.3.2. Tanins condensés (proanthocyanidines ou procyanidines)

Les tanins condensés (figure 18) sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A [186]. Les tanins condensés sont présents dans les vacuoles d'un réseau de cellules spécialisées, situées sous l'épiderme des feuilles et des tiges de certaines légumineuses tempérées (sainfoin, loiercorniculé ou pédonculé) et tropicales herbacées (*Lespedeza sericea*, *des-modium intortum*) et arbustives, ainsi que dans les feuilles d'arbustes fourragers ...etc [186]. Ci-dessus est représenté le modèle de structure d'un tanin de type B

R=H procyanidine
 R=OH prodelfphinidine



3.6. Rôles et effets biologiques des polyphénols

Grâce à leurs propriétés les composés phénoliques peuvent avoir de nombreux rôles et effets bénéfiques chez les végétaux, les sols pollués et les êtres humains. Ils sont également utilisés comme additifs pour les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

3.6.1. Chez les plantes

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains:

- aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...)
- interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV); soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux
- critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par la transformation
- variations caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini.

Les composés phénoliques assurent la communication entre cellules, entre végétaux, entre végétaux et animaux [187].

3.6.2. Chez les êtres humains

Le rôle des composés phénoliques est amplement signalé dans la protection contre certaines maladies attribué à leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et à leurs propriétés antioxydantes. Ces composés montrent des activités anticancéreuses, antivirales, antibactériennes, antiallergique, antiathérogène, antioxydant, anti-inflammatoire, antithrombotiques, cardioprotecteur et les effets vasodilatateurs [187].

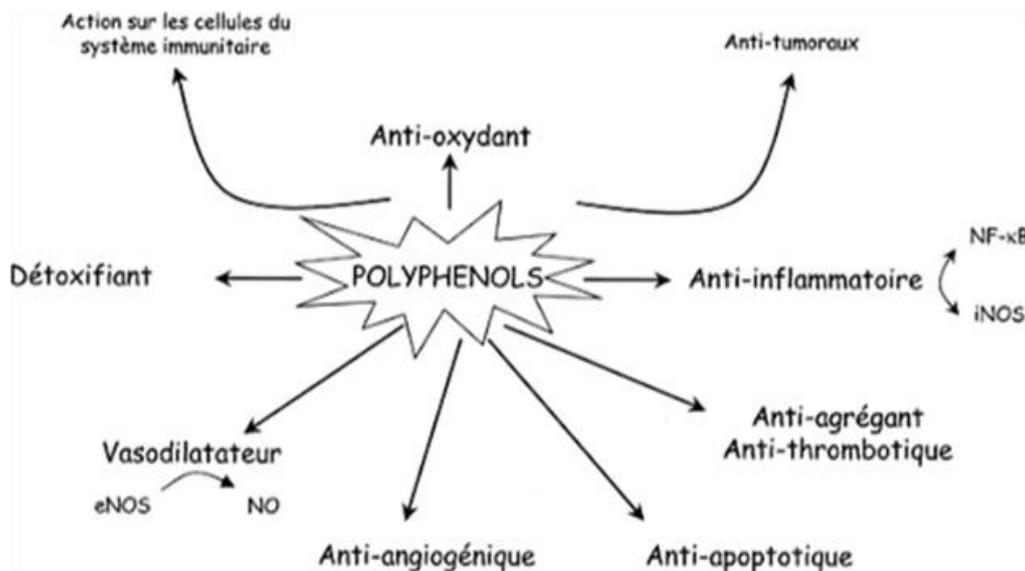


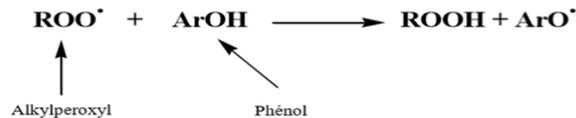
Figure 27: Rôle et effets biologiques des polyphénols

3.6.2.1. Activité antioxydant

Les composés phénoliques sont capables d'agir comme des antioxydants, grâce à leurs structures. Ils peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donateurs d'atomes d'hydrogènes. Ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu. Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite, ayant une plus grande stabilité chimique que le radical initial. L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons du noyau benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, le plus notamment la capacité à générer des radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation. Le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans

la production de radicaux libres. Cependant, les composés phénoliques peuvent agir comme des prooxydants [189]. Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes :

- Inhibition enzymatique
- Chélation des ions métalliques
- Piégeage des radicaux libres



3.6.2.1.1. Inhibition enzymatique

Les phénomènes d'interaction polyphénols-protéines ont été largement étudiés *in vitro*, particulièrement dans le cas des flavonoïdes. L'inhibition de la production des ROS par les polyphénols, particulièrement les flavonoïdes, peut procéder directement par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage directe des ROS [190]. Cette double action est bien illustré par le cas de la xanthine oxydase, cet enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Cos et al. [190] ont confirmé les résultats des relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité d'inhiber la formation de superoxyde par inhibition de la xanthineoxydase (formation de complexes enzyme-inhibiteur) et/ou par réduction du superoxyde produit. Les résultats de leur étude (1998) se résume dans ce qui suit :

- Les flavanones, les dihydroflavonols et les flavan-3-ols (cycle C non plan) ne sont pas inhibiteurs de la xanthine oxydase ;
- Les flavonols et les flavones (cycle C plan et conjugué avec les cycles A et B) ont la capacité d'inhiber l'enzyme.
- L'absence du groupe hydroxyle en C3 augmente légèrement l'activité inhibitrice. Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés. Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine.
- Les flavonoïdes présentant un cycle B de type catéchol (ortho-diphénol ou 1,2dihydroxybenzène) sont de bons pièges à superoxyde en raison de la stabilité desradicauxsemiquinones formés lors de la capture.

De nombreux flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs des métalloenzymes tels que lipoxygénase [191].

3.6.2.1.2. Chélation des ions métalliques

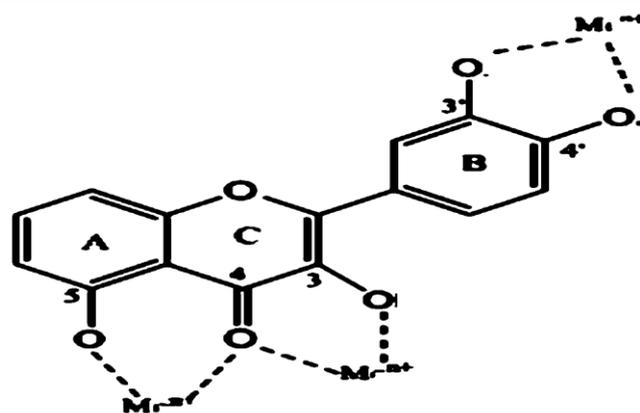
Les ions du fer et du cuivre sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils sont notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, les ions du fer pour la catalase, et ceux du cuivre pour le superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton :



En outre, l'autoxydation des ions Fe^{2+} et Cu^+ est une source de superoxyde et peroxyde d'hydrogène. Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydante. Divers polyphénols abondants dans les plantes et dans l'alimentation sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques [192]. La complexation des ions métalliques par les polyphénols induit typiquement un déplacement bathochrome de leur bande d'absorption dans le domaine UV-Visible. Certaines études menées sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques [193].

1. les groupes 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B
2. les groupes 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C,
3. les groupes 4-oxo et 5-hydroxy.

Ainsi, la quercétine qui combine tous ces substituants est un complexe anti-métallique particulièrement efficace.



3.6.2.1.3. Piégeage des radicaux libres

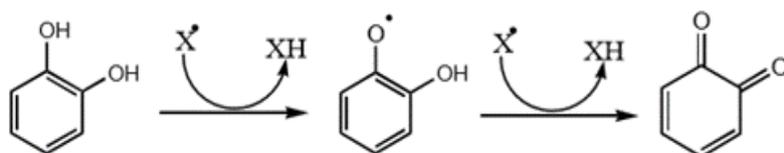
La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Grâce à leur faible potentiel redox [194] les polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes (Fl-OH), sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes (ROO•), alkoxydes (RO•) et hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Où :

X[•] représente l'un des EOR mentionnés ci-dessus.

Le radical aryloxyde (Fl-O[•]) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable.



Le radical aryloxyde peut réduire le dioxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde, cette réaction est responsable d'un effet prooxydant des flavonoïdes. Ainsi, la capacité antioxydante des polyphénols dépend non seulement du potentiel redox du couple Fl-O[•]/Fl-OOH mais aussi de la réactivité du radical Fl-O[•]. Plusieurs travaux ont établi des relations entre la structure chimique des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres. Les travaux 'é de Cuvelier menée sur l'activité antioxydante des acides phénoliques a retenu que :

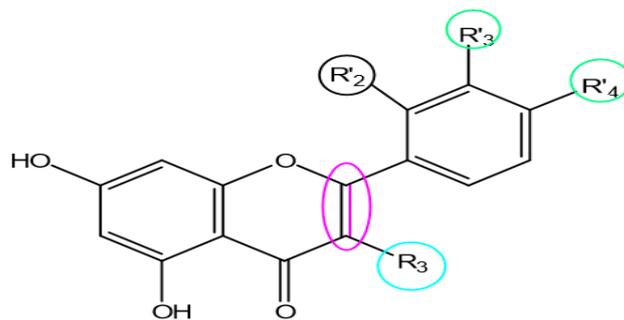
- Les acides cinnamiques ont une activité antiradicalaire supérieure à celle des acides benzoïques correspondants. Les acides caféique, sinapique, férulique et *p*-coumarique sont respectivement plus actifs que les acides protocatéchique, syringique, vanillique et *p*-hydroxybenzoïque. Ils sont plus actifs que les phénols simples: acide *p*-coumarique > phénol et acide caféique > pyrocatechol. Ainsi, le groupe CH=CH-COOH participe à la stabilisation du radical aryloxyde par résonance.
- Les acides benzoïques sont, moins actifs par rapport aux leurs homologues phénols, ce qui tend à démontrer le rôle négatif du COOH directement fixé sur le noyau benzénique.

- L'addition d'un second OH sur le cycle aromatique augmente fortement l'activité antioxydante des acides phénoliques, particulièrement quand le second OH est en ortho ou para du premier: ortho = para > méta ou para > ortho > méta.

- Un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant (ex: acide gallique).

En résumé, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- 1) la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupe catéchol),
- 2) la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo,
- 3) la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.



3.7. Propriétés thérapeutiques des polyphénols

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Cette activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux libres tel l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier. L'activité antioxydante des polyphénols peut s'exercer sur les transporteurs des lipides du sang. Les polyphénols empêchent ainsi la formation des LDL oxydés, formation qui rend place lors d'états pathologiques variés caractérisés par un stress oxydatif. Ils aident à combattre l'inflammation et réduisent la fragilité des capillaires, ils réduisent les effets du diabète. De nombreuses études épidémiologiques montrent qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque des maladies chroniques [195].

3.7.1. Polyphénols et cancer

Parmi les propriétés biologiques intéressantes des polyphénols, la prévention du cancer. En effet, un certain nombre de recherches menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que les polyphénols

pourraient être utilisés comme des agents de prévention des différentes maladies cancéreuses [196].

Des recherches plus récentes ont décrit les activités anti-cancérigènes de la curcumine, le resvératrol et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) pour le traitement du cancer du col [197]. Les effets inhibiteurs du thé vert et noir dans le traitement du cancer ont largement été étudiés. Les polyphénols du thé de type flavan-3-ol sont des composés bioactifs puissants qui interfèrent avec l'initiation, le développement et la progression du cancer par des processus critiques [198]. Ils ont la capacité d'interrompre ou inverser le processus de cancérogenèse en agissant sur les molécules de réseau de signalisation intracellulaires impliquées dans l'initiation et / ou la promotion d'un cancer pour arrêter ou inverser la phase de progression du cancer. Les polyphénols peuvent également déclencher l'apoptose dans les cellules cancéreuses à travers la modulation d'un certain nombre d'éléments principaux en signal cellulaire [199].

3.7.2. Polyphénols et maladies cardiovasculaires

Diverses études épidémiologiques ont montré l'existence d'une corrélation inverse entre la consommation de polyphénols ou d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement de maladies cardiovasculaires. Ainsi une méta-analyse basée sur 7 études cas-témoins et 10 études en cohortes suggère une réduction du risque d'infarctus du myocarde de 11% lors de la consommation de trois tasses de thé par jour [200]. Plusieurs études de cohortes ont montré que la prise de flavonols et de flavones était inversement corrélée aux taux de mortalité par maladies coronariennes [201]. Il s'avère notamment que de fortes prises de quercétine et de kaempférol réduisent le taux de mortalité due à des accidents cardiaques de type ischémie, dans lesquels peuvent être mises en cause les plaques d'athérome [202].

Les mécanismes d'action des polyphénols, impliqués dans la prévention de ce type de pathologies, incluent l'inhibition de l'oxydation des LDL, l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et l'inhibition de la formation de cellules spumeuses dans les aortes.

3.7.3. Polyphénols et inflammation

Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux

marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) dans le plasma [20.], que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines (IL-8, IL-13 et IFN- α) circulantes [204] ou encore que l'augmentation du pouvoir antioxydant du plasma dû à une consommation de jus de fruits concentré était associée à une diminution des cassures de brins d'ADN.

L'inflammation est la réponse immunitaire de l'organisme à une agression par des agents pro-inflammatoires d'origine virale, bactérienne ou autre (par exemple, les lipoprotéines oxydées, marqueurs du stress oxydant). L'inflammation est précisément régulée afin de limiter les altérations des biomolécules de l'hôte. Cependant, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique et la plupart des pathologies chroniques, citées précédemment, possèdent une composante inflammatoire.

Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que les polyphénols pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) μ phospholipase A2, cyclooxygénase et lipoxygénase. Ils agissent également sur la production de NO en modulant l'activité des NOS. Des travaux menés *in vitro* ont également montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibaient la production de cytokines telles que IL-4, IL-5 et IL-13, que la quercétine inhibait la production de TNF- α par des macrophages stimulés au lipopolysaccharide (LPS), que le kaempférol inhibait l'expression et la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β ou de l'IL-6 dans les mastocytes [120]. De plus, il est maintenant connu que les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant *in vitro* et *in vivo* sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B [205].

3.7.4. Polyphénols et maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer représentent un problème croissant lié aux pathologies du vieillissement cérébral, principalement car il ya une augmentation de la prévalence de la maladie d'Alzheimer à la fois et la maladie de Parkinson avec l'âge. Ceux-ci et d'autres maladies neurodégénératives semblent être déclenchées par des événements multi-factoriels dont la neuro-inflammation, une augmentation du stress oxydatif, de fer et / ou une déplétion des antioxydants endogènes. Par ailleurs, l'apport alimentaire régulière d'aliments riches en flavonoïdes et / ou de boissons a été associée à une réduction de 50 % du risque de démence, une préservation des performances cognitives avec l'âge, un retard dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer et une réduction du risque de développer la maladie de Parkinson. Les flavonoïdes peuvent agir pour protéger le

cerveau dans un certain nombre de façons, y compris par la protection des neurones vulnérables, le renforcement de la fonction neuronale existantes ou en stimulant la régénération neuronale [206]. De nombreuses études d'intervention alimentaire menées chez l'homme ou chez l'animal avec des aliments ou boissons issus du raisin, du thé ou de baies comme les myrtilles ont montré une amélioration de la mémoire et de la cognition. Il semblerait cependant que les seules propriétés antioxydantes des flavonoïdes contenus dans ces aliments ne soient pas suffisantes pour expliquer leurs effets bénéfiques au niveau cérébral, d'autant que la concentration de composés retrouvés à ce niveau est relativement faible [207]. Il a ainsi été suggéré que les polyphénols puissent agir en protégeant les neurones vulnérables, en stimulant le fonctionnement neuronal et le flux sanguin ainsi qu'en favorisant la neurogenèse.

3.7.5. Polyphénols et diabète

L'administration aiguë ou chronique de polyphénols chez des modèles animaux a montré des effets sur la glycémie : les polyphénols agissent par différents mécanismes dont l'inhibition de l'absorption du glucose au niveau intestinal. ou encore son assimilation dans les tissus périphériques (inhibition de la gluconéogenèse, de la stimulation adrénergique de l'absorption du glucose ou stimulation de la libération de l'insuline par les cellules β du pancréas) [208].

Les données portant sur les effets des polyphénols dans la prévention du diabète chez l'homme sont moins nombreuses que chez l'animal. Il a été montré que la consommation de 400ml de café décaféiné n'avait pas d'effet sur la glycémie lorsqu'il était ingéré avec du glucose ; cependant, il diminue la sécrétion du polypeptide insulino-tropique glucose-dépendant (GIP) et augmente la sécrétion du glucagon de manière à ce que l'absorption du glucose soit retardée [209]. Chez des patients atteints de diabète de type II, la consommation de 50 mg/j d'un complément alimentaire contenant des anthocyanes, des flavones et des acides phénoliques d'orange sanguine pendant 2 mois n'a pas d'effet sur la glycémie [210]. Cependant, certaines données épidémiologiques laissent penser que les polyphénols pourraient avoir tout de même un effet protecteur puisqu'il a été observé que la consommation de café (riche en acide chlorogénique) était associée à une diminution du risque de diabète de type II [211].

Chapitre IV

Méthodes d'évaluation *in vitro* des propriétés antioxydants des polyphénols

IV: Méthodes d'évaluation *in vitro* des propriétés antioxydantes des polyphénols

Le pouvoir antioxydant des méthodes *in vitro* peut refléter d'une manière étroite l'effet *in vivo*. Pour cette raison, les méthodes *in vitro* présentent des avantages par rapport aux méthodes adoptant des radicaux libres moins pertinents ou non pertinents dans les systèmes biologiques. Les polyphénols antioxydants peuvent neutraliser les radicaux par deux mécanismes majeurs, le transfert d'atome d'hydrogène (HAT) et le transfert d'électrons uniques (SET) [212]. Quel que soit le mécanisme, le résultat est le même, mais la cinétique et le potentiel des réactions secondaires diffèrent. Le transfert d'électrons couplés à des protons et les réactions HAT peuvent s'engendrer en parallèle [213]. Le mécanisme dominant dépend de :

- la structure et les propriétés antioxydantes du polyphénol à tester,
- la solubilité et le coefficient de partition,
- le solvant utilisé dans ce système.

De point de vue chimique, l'énergie de dissociation des liaisons (BDE) et le potentiel d'ionisation (PI) sont les deux facteurs majeurs qui déterminent le mécanisme et l'efficacité des antioxydants [215].

Plusieurs procédés sont proposés pour mesurer l'activité antioxydante dans les aliments et les systèmes biologiques. Mais comme les polyphénols ont de multiples activités, et l'activité dominante dépend du milieu et du substrat, il est nécessaire que le protocole sélectionné doit être adéquat et précis pour estimer une propriété antioxydante.

4.1. Les méthodes basées sur le mécanisme HAT

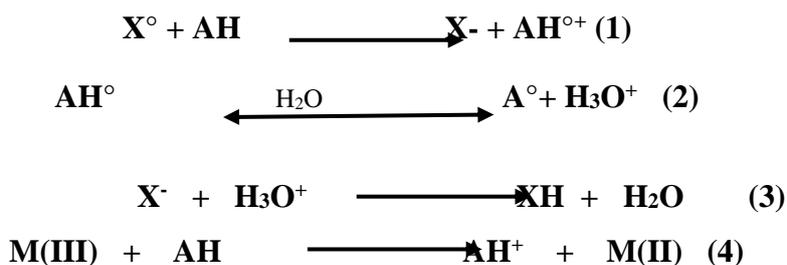
Les méthodes basées sur le mécanisme HAT évaluent la capacité classique d'un antioxydant à neutraliser les radicaux libres par n'importe quel donneur d'hydrogène (AH). La réactivité antioxydante est basée sur la compétition cinétique.



Les réactions HAT sont indépendantes des solvants et du pH et sont généralement assez rapides, généralement terminées en quelques secondes à quelques minutes. La présence des agents réducteurs, y compris les métaux, est un inconvénient et peuvent induire en une réactivité apparente erronée [215].

4.1. Les méthodes basées sur le mécanisme SET

Les méthodes basées sur le mécanisme SET détectent la capacité d'un antioxydant potentiel de transférer un électron pour réduire n'importe quel composé, y compris les métaux, les carbonyles et les radicaux [215].



Les mécanismes SET et HAT se produisent presque toujours ensemble dans tous les échantillons, avec un équilibre déterminé par la structure antioxydante et le pH. La réactivité relative dans les méthodes SET est basée principalement sur la déprotonation et le potentiel d'ionisation (PI) du groupe fonctionnel réactif, ce qui fait que les réactions SET dépendent du pH. D'une manière générale, les valeurs du potentiel d'ionisation (PI) diminuent avec l'augmentation du pH, reflétant ainsi une capacité de donner des électrons, proportionnelle avec la déprotonation. Le mécanisme antioxydant SET est dominant pour les composés ayant un IP > 45 kcal/mol [216].

4.3. Critères du choix d'une méthode.

La méthode choisie doit être normalisée et utilisée pour une période suffisante dans un maximum de laboratoires de telle sorte que ses avantages et ses inconvénients deviennent clairs et répond aux exigences suivants [214, 215]:

- (1) L'évaluation chimique se produit réellement dans des applications potentielles;
- (2) Elle utilise une source de radicaux biologiquement pertinente;
- (3) Elle est simple;
- (4) Elle a un critère d'évaluation défini et un mécanisme chimique précis;
- (5) Les instruments sont disponibles;

(6) Elle est adaptable aux dosages des antioxydants hydrophiles et lipophiles et utilisable pour les différentes sources radicalaires;

(7) Elle est adaptable pour être utilisée dans les analyses de contrôle qualité de routine.

4.4. Avantages des protocoles expérimentaux unifiés

L'unification et la normalisation des protocoles expérimentaux permet de :

- Prendre des directives pour l'application appropriée des tests
- Faire des comparaisons significatives entre les substances testées,
- Contrôler la variation à l'intérieur ou entre les produits
- Dégager des normes de qualité concernant les réglementations et les allégations liées à la santé

Le tableau 3 récapitule l'ensemble des méthodes utilisées dans les antioxydants *in vitro*. La comparaison entre ces différentes méthodes basée sur la simplicité, l'instrumentation nécessaire, la pertinence biologique, le mécanisme de la méthode et le temps nécessaire pour l'exécution sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 3 : Les méthodes d'évaluation *in vitro* [217].

I- Les méthodes basées sur le mécanisme HAT	
1	Capacité d'absorption radicale d'oxygène (ORAC) méthode
2	Capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique (LPIC)
3	Piégeage radical total Paramètre antioxydant de (TRAP)
4	Absorption d'oxygène inhibée (IOC)
5	Blanchiment de crocin Activité d'inhibition radicale de l'oxyde nitrique
6	Activité de récupération radicale hydroxyle par p-NDA (aniline p-butrisidunethyl)
7	Scavenging du radical of H ₂ O ₂
8	scavenging du radical ABTS scavenging
9	Scavenging of superoxide radical formation by alkaline SASA Scavenging de la formation du radicale superoxyde par alcalin SASA
II- Les méthodes basées sur le mécanisme SET	
1	capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC) décoloration
2	Puissance antioxydante de réduction de la ferrique (FRAP)
3	Test de piégeage des radicaux libres DPPH

4	Capacité de réduction du cuivre (II)
5	Test des phénols totaux par Folin-Ciocalteu
6	Test N,N-diméthyl-p-Phenylenediamine (DMPD)
III- Autres essais	
1	Capacité totale de scavenging oxydant (TOSC)
2	Inhibition de Briggs – Réaction d'oscillation de Rauscher
3	Chemiluminescence
4	4 Électrochemiluminescence
5	Analyse fluorométrique
6	Chemiluminescence améliorée (ECL)
7	Bioautographie TLC
8	Test Activité antioxydante cellulaire (CAA)
9	Méthode d'oxydation de substrat de colorant

4.5. Évaluation du pouvoir antioxydant (AOC)

4.5.1. Les méthodes AOC utilisant des mécanismes de réaction HAT

4.5.1.1. ORAC

Les méthodes ORAC sont basées sur les travaux de Ghiselli et al. [218] et Glazer [219], développés par la suite par Cao et al. [220]. L'ORAC mesure l'inhibition antioxydante des oxydations induites par le peroxy radical et reflète ainsi l'activité antioxydante classique de rupture de la chaîne radicale par transfert d'atome H [221]. Dans le test de base, le radical peroxy réagit avec une sonde fluorescente pour former un produit non fluorescent, qui peut être quantifié facilement par fluorescence. La capacité antioxydante est déterminée par la diminution du taux et de la quantité de produit formés avec le temps.

4.5.1.2. TRAP

Cette méthode contrôle la capacité des composés antioxydants à interférer avec la réaction entre les radicaux peroxy générés par AAPH ou ABAP [2,2'-azobis(2-aminopropane) dihydrochlorure] et une sonde cible [218, 222, 223]. Les variantes de cette méthode utilisent l'absorption d'oxygène [224], la fluorescence de R-phycoerythrine [225, 226], ou l'absorption

de 2,2 ϕ -azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) [227] comme réaction de la sonde. Les réactions de base la méthode TRAP ressemblent celles de l'ORAC. L'exigence d'ORAC relève de la sonde qui doit être réactive avec ROO $^{\circ}$ à de faibles concentrations, il doit y avoir un changement spectroscopique spectaculaire entre la sonde native et oxydée (pour maximiser la sensibilité), et non une réaction radicalaire en chaîne au-delà de l'oxydation de la sonde doit se produire. L'oxydation de la sonde est suivie optiquement [227] ou par fluorescence [218]. L'activité antioxydante se détermine par le temps de consommation de tout l'antioxydant, en d'autres termes par extension du délai d'apparition de la sonde oxydée lorsque les antioxydants sont présents, et en pourcentage de la réduction d'une réaction.

4.5.1.3. Chemiluminescence (CL):

Une amélioration de la sensibilité de TRAP utilise le suivi des réactions radicalaires avec CL. La chimie fondamentale des tests CL est basée sur la réaction des oxydants radicalaires avec des marqueurs pour produire des espèces d'état excité qui émettent la chemiluminescence (lumière induite chimiquement). Tous les composés qui réagissent avec les radicaux initiaux inhibent la production de lumière. En changeant l'initiateur, la réaction peut être adaptée pour différencier l'extinction d'oxydants spécifiques, par exemple, O $_2^{\circ-}$, HO $^{\circ}$, HOCl, LO(O) $^{\circ}$, OONO (42), et 1 O $_2$ [228]. Le marqueur le plus utilisé pour piéger les oxydants et convertir les faibles émissions en émissions lumineuses intenses, prolongées et stables sont le luminol [229], La lucigénine, les protéines bioluminescentes telles la pholasine [230]. Le rendement lumineux continu dépend de la production constante des intermédiaires radicalaires dérivés du p-iodophénol, du luminol et oxygène, et cette émission lumineuse est sensible aux interférences par antioxydants anti-radicaux, mais seront restaurés lorsque tous des antioxydants ajoutés soient consommés dans la réaction. Néanmoins, la méthode CL est plus sensible pour détecter des réactions de bas niveau car elle fournit une réponse détectable en dessous de la limite de détection de la plupart des dosages chimiques.

4.5.2. Les méthodes AOC utilisant des mécanismes de réaction SET

4.5.2.1. Pouvoir antioxydant Réducteur Ferrique (FRAP)

Le test FRAP a été initialement développé par Benzie et Strain [231] pour mesurer la réduction de la puissance dans le plasma, mais par la suite il a été adapté et utilisé pour les tests des antioxydants chez les plantes [232]. La réaction mesure la réduction de la ferrique 2,4,6-

tripyridyl-s-triazine (TPTZ) à un produit de couleur (figure 3) [233]. La réaction détecte des composés avec des potentiels redox de 0,7 V (le potentiel redox de Fe^{3+} -TPTZ), de sorte que FRAP reflète la capacité de maintenir le statut de redox dans les cellules ou les tissus. La réduction de la puissance semble être liée au degré d'hydroxylation et à l'étendue de la conjugaison chez les polyphénols [234].

4.5.2.2. Test de réduction du cuivre (CUPRAC)

Une des variantes du test FRAP, développées par la suite, est celle qui utilise le cuivre à la place du fer. Ces essais sont basés sur la réduction du cuivre de la forme Cu^{2+} à la forme Cu^+ par l'action combinée avec les antioxydants (les agents réducteurs) dans un échantillon. Dans certains protocoles on utilise le bathocuproïne (2,9-diméthyl-4,7-diphényle-1,10-phénanthroline) (figure 4) qui forme un complexe 2:1 avec Cu^+ , donnant un chromophore ayant une absorption maximale à 490 nm. Le taux, la réaction et la concentration des produits se suivent par la complexation du Cu(I) produite. Dans le test CUPRAC on utilise aussi la néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline) (figure 4), dont le complexe Cu^+ ainsi formé (I) absorbe à 450 nm [235].

4.5.2.3. Avantages/désavantages des tests de réduction du cuivre par rapport au fer.

Le cuivre a des avantages par rapport au fer dans tous les tests antioxydants en ce que toutes les classes d'antioxydants. les substances comprenant groupements de thiols présentent une interférence minimale des radicaux réactifs. Les cinétiques de la réaction du cuivre sont plus rapides que celles du fer. Le test CUPRAC s'accomplit en quelques minutes dans le cas de l'acide ascorbique, l'acide urique, l'acide gaulois et la quercétine, mais demande entre 30 à 60 minutes pour les molécules plus complexes. Ainsi, les tests basés sur la réduction du cuivre ont des problèmes semblables dans le cas des mélange des antioxydants complexes en termes de sélection d'un temps de réaction adéquate [236].

4.5.2.4. Sélection d'une méthode de dosage AOC *in vitro*

L'élément primordial à être pris en considération pendant la sélection d'une méthode est le mécanisme de réaction et sa relation avec ce qui pourrait se produire durant la réalisation d'un protocole expérimental. Concernant l'effet antioxydant des polyphénols, on préfère généralement un méthode basée sur un mécanisme HAT par rapport au mécanisme SET parce

que le radical peroxy est le radical libre dominant dans l'oxydation des lipides les aliments et des systèmes biologiques. Cependant, il est très intéressant de de développer des méthode utilisant d'autres sources tels le OH° , O_2° , qui sont actifs dans les différentes cellules animale et végétales, ainsi que polyphénols antioxydants ne se comportent pas de la même manière vis-à-vis les différentes espèces radicalaires. Nulle méthode appliquée d'une manière unique ne peut être considérée comme une méthode évaluant le pouvoir antioxydant totale, même si elle pourrait être réalisée à la fois dans une solution aqueuse et dans un environnement lipophile. Lors du dosage d'extraits par les méthodes AOC il faut prendre en considération que les antioxydants incluent une panoplie de polyphénols, d'agents réducteurs et nucléophiles qui se se distinguent selon 1) la solubilités et la phase de localisation, 2) le potentiel redox, 3) la spécificité et le mécanisme d'action [236].

Le tableau (4) compare les avantages et les inconvénients de certaines méthodes de dosage AOC *in vitro* basés sur des critères ayant trait à la simplicité, l'instrumentation requise, la pertinence biologique, aux mécanismes, au temps requis. D'autres critères tels la méthode de quantification, le potentiel d'évaluation AOC lipophile et hydrophile ne sont pas cités.

Tableau 4 : Comparaison entre Les différentes méthodes d'évaluation *in vitro* [237].

Antioxydant assays	Simplicité	Instrument requis	Pertinence biologique	Mécanisme	Temps requis
ORAC	++	+++	+++	HAT	++
TRAP	+++	--	--	HAT	+++
FRAD	+++	+++	--	SET	--
TEAC	++	++	-	SET	-
DPPH	+	+	-	HAT, SET	+
CUPRIC	+++	+++	-	HAT	+
Fluorimetric	++	++	+	HAT	+
Chemiluminescence (CL)	---	+++	+++	HAT	+++
ABTS ⁺⁺	+	+	+	HAT	+
+, ++, +++ : entre caractéristique désirable et caractéristique hautement désirable. -, --, --- : entre caractéristique moins désirable et caractéristique non désirable.					

4-5.3. Les méthodes AOC utilisant des mécanismes HAT et SET à la fois.

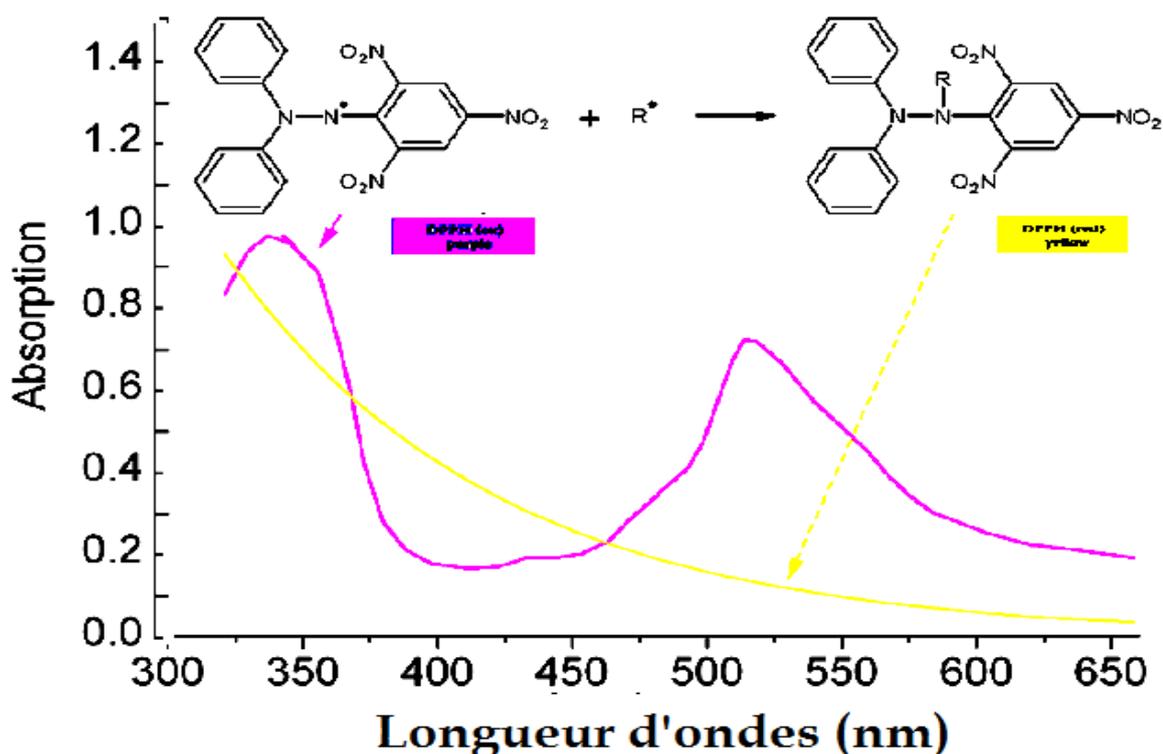
Bien que les tests TEAC et DPPH sont habituellement classés comme réactions SET, ces deux radicaux peuvent en fait être neutralisés soit par réduction directe par transfert d'électrons, soit par destruction radicalaire par transfert d'atome H [238]. Les modèles et les mécanismes de réactivité sont donc difficiles à interpréter sans avoir des informations détaillées sur la composition et les structures des antioxydants testées. L'interprétation devient plus difficile

lorsque les agents réducteurs des molécules tels que l'acide ascorbique sont présents dans les extraits des phénols.

4.5.3.1. Exemples sur les méthodes AOC utilisant des mécanismes HAT et SET à la fois

4.5.3.1.1. La méthode du radical 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°)

Le radical DPPH° est l'un des rares radicaux d'azote organique stable, il est d'une couleur pourpre foncé. Ce test est basé sur l'estimation du pouvoir des antioxydants à induire une réduction du radical le DPPH. Ce pouvoir peut être évaluée par résonance de spin électronique (EPR) ou en mesurant la diminution de son absorption. Le test de décoloration, largement utilisé, a d'abord été rapporté par Brand-Williams et ses collègues [239]. Les tests antioxydants sont basés sur la mesure de la perte de couleur de DPPH à 515-520 nm après sa réaction avec des composés à tester [240], et la réaction est suivie par spectrophotométrie.



Le test DPPH est considéré principalement basé sur une réaction SET, et l'abstraction hydrogène-atome est une voie de réaction secondaire [241]. Ceci permet de l'utiliser pour les composés qui contenant les groupements donneurs d'hydrogène tels R²-NH, R-OH et R-SH. Le test DPPH° est simple et rapide et n'a besoin que d'un spectrophotomètre UV-vis pour effectuer, ce qui explique probablement son utilisation répandue dans les dépistage antioxydant. Dans la littérature, il y a une panoplie de protocoles expérimentaux conçus pour l'application de ce test.

Le pourcentage du reste du DPPH non coloré est calculé selon la formule :

$$\% \text{ DPPH}^{\circ}_{\text{REM}} = 100 [\text{DPPH}^{\circ}]_{\text{REM}} / [\text{DPPH}^{\circ}]_{\text{T=0}}$$

4.5.3.1.1.1. Exemple d'un protocole expérimental du test DPPH°

Dans ce protocole expérimental, le DPPH est préparé dans une solution alcoolique (méthanol ou éthanol) à 1 ml de solution méthanolique de DPPH (0.012 g /100 ml) est ajouté à 1 ml de la solution d'extraits de différentes concentrations (0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; 0,1 mg/ml), le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à la température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes.

Le blanc est représenté par le méthanol, Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de méthanol, Le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique.

-Calcul des pourcentages d'inhibitions:

Le pourcentage d'inhibition ou réduction du DPPH° est calculé par la formule suivante :

$$I \% = ((A_c - A_t) / A_c) \times 100$$

A_c : absorbance du contrôle négatif.

A_t : absorbance de la substance testée.

-Calcul des concentrations efficaces IC₅₀ :

La concentration réductrice de 50 % (IC₅₀) (appelée EC₅₀ pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH°. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par des régressions liant le pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées. Dans le cas des polyphénols, plus une IC₅₀ est petite, plus l'antioxydant considéré comme avoir une activité plus importante. La capacité antioxydante est comparée à un antioxydant de référence tels l'acide ascorbique, le butyl-

hydroxy-toluène (BHT) ou le Trolox (acide-6-hydroxy 2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique) [243].

4.5.3.1.2. La méthode du radical 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+})

L'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est un radical libre et stable très utilisé pour l'évaluation du pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des mélanges complexes ou bien des composés purs. Ce radical est capable de réagir avec des antioxydants classiques de type phénols et thiols mais aussi avec tout composé donneur d'hydrogène ou d'électron [244].

Le test TEAC est également une méthode colorimétrique où une décoloration de la solution bleue-verte contenant ABTS^{•+} sera observée lors de la formation de ABTSH⁺ (couleur bleue à verte). L'activité antioxydant totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}, obtenu à partir de l'ABTS. L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine) [245] ou (horseradishperoxidase) [246] en présence de H₂O₂ ou d'un oxydant (dioxyde de manganèse) [247] ou persulfate de potassium [248]. Le radical ABTS^{•+}, en contact avec un donneur de H[•] conduit à l'ABTS⁺ et à la décoloration à 734 nm de la solution [249].

4.5.3.1.2.1. Exemple d'un protocole expérimental du test ABTS^{•+}

Dans le protocole expérimental de Mebrek et al. [250], une solution mère d'ABTS⁺ a été produite par l'oxydation de ABTS 7,0 mM dans l'eau et de 2,5 mM de persulfate de potassium pendant 16 h à l'obscurité à température ambiante, après quoi, la solution ABTS⁺ a été diluée avec de l'éthanol absolu pour une absorbance de 0,8-0,9 à 734 nm avant d'être utilisé dans l'essai. Ensuite, 160 µL de la solution ABTS⁺ a été ajoutée à 40 µL de β-glucanes dans le DMSO à différentes concentrations. Après 10 minutes, l'absorbance était à 734 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits. DMSO a été utilisé comme contrôle, tandis que le BHA a été utilisé comme norme. Résultats ont été exprimés selon la formule :

$$I \% = ((Ac - At)/Ac) \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle négatif.

At : absorbance de la substance testée.

4.5.3.1.3. La méthode du radical ($^{\circ}\text{OH}$) (Protocole Exemple)

Cette méthode implique l'autoxydation du complexe Fe^{2+} -EDTA dans un milieu aqueux pour former O°_2 , qui est rapidement dismuté en H_2O_2 à pH 7.4. Ce dernier est interagit avec Fe^{2+} pour former les radicaux $^{\circ}\text{OH}$ en présence de l'acide ascorbique comme catalyseur (réaction de Fenton) La dégradation du désoxyribose par $^{\circ}\text{OH}$ dégage certains produits estimés en malonal-déhyde (MDA), d'un chromogène rose lors du chauffage avec l'acide thiobarbiturique et dans un milieu acide. Le rôle d'ascorbate est la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et cela provoque la réaction de Fen-ton (Fe^{3+} -EDTA + ascorbate Fe^{2+} -EDTA + ascorbate oxydé). Le protocole expérimental exemple est delui de la méthode de désoxyribose ptoposée par Halliwell et al. [78]. Le mélange réactionnel contient les réactifs suivants : 0.4 ml de la solution tampon phosphate (50 mmol/ l, pH = 7.4), 0.1 ml de l'extrait à différentes concentrations, 0.1 ml de l'EDTA (1.04 mmol/l), 0.1 ml de FeCl_3 (1 mmol/l) et 0.1 ml de 2-désoxyribose (60 mmol/l). La réaction est commencée par l'addition de 0.1 ml de l'acide ascorbique (2 mmol/l) et 0.1 ml de H_2O_2 (10 mmol/l). Après l'incubation à 37°C pendant 1 heure, 1 ml de l'acide thiobarbiturique (TBA) (10 g/l) est ajouté dans le milieu réactionnel suivi par 1 ml de l'acide chlorhydrique (HCl) (25 %). Les mélanges sont placés au bain marie à 100°C pendant 15 min et puis sont refroidit avec de l'eau. L'absorbance des solutions est mesurée à 532 nm avec le spectrophotomètre contre le blanc. La capacité du piégeage du radical hydroxyle est évaluée avec le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de 2-désoxyribose par les radicaux hydroxyles. Le pourcentage du piégeage est calculé en basant sur la formule suivante :

$(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100$, où : A_0 : représente l'absorbance du contrôle sans extrait ; : représente l'absorbance après l'addition de l'extrait et de désoxyribose ; : représente l'absorbance de l'extrait sans dé-soxyribose.

V. CONCLUSION

5. CONCLUSION

Ce travail est une revue bibliographique qui vise à actualiser notre conception vis-à-vis le stress oxydant, les polyphénols et leurs mécanismes d'action antioxydant, ainsi que les méthodes évaluant leur pouvoir antioxydant *in vitro*.

Les antioxydants sont responsables du mécanisme de défense de l'organisme vis-à-vis les pathologies associées à l'attaque par les radicaux libres. Les polyphénols antioxydants peuvent être impliqués dans la prévention de différentes maladies provoquées par le stress oxydatif tels le cancer, la maladie Parkinson, l'Alzheimer ou l'athérosclérose.

Plusieurs méthodes et techniques sont développées et testées pour évaluer le pouvoir antioxydant des polyphénols, seulement les avantages et les limites de ces méthodes sont encore en débat. Il semble qu'il n'y a pas un consensus pour standardiser une méthode plus pratique et plus simple pour évaluer le pouvoir antioxydant total. Par exemple, les limites déterminant les antioxydants hydrophiles, les problèmes qui se produisent durant la détermination du point final de réaction, la sensibilité à la lumière, l'analyse dans le pH physiologique, l'interférence probable de certains composants alimentaires restent des obstacles qui méritent amplement de recherche pour arriver à une méthode standard.

L'analyse des données bibliographiques a montré que les méthodes d'évaluation des antioxydants *in vitro*, bien que sont d'une immense diversité, sont classifiées en trois groupes es se basant le sur le mécanisme d'action; 1) Les méthodes basées sur le mécanisme HAT, 2) Les méthodes basées sur le mécanisme SET, 3) Les méthodes basées sur le mécanisme HAT et SET.

Pour chaque mécanisme un protocole expérimental est sélectionné comme exemple clarifiant le principe chimique sur lequel est basé l'évaluation *in vitro*.

L'autre souci qui pourrait être majeur est celui revenant à l'utilisation de différentes normes exprimant les résultats, ce qui empêche de faire des comparaisons significatives.

La diversité des méthodes d'analyse *in vitro* des polyphénols nécessite de faire une réflexion sérieuse et concevoir d'autres investigations approfondies dans différents laboratoires ou instances de recherche pour arrêter des critères fondés aidant à normaliser une méthode standard.

VI. REFERENCES

VI. Références

- [1] Morena, M., Martin-mateo, M., Cristol, J. P., & Canoud, B. (2002). Stress oxydant, hémoincompatibilité et complication de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, 23 (5), 201 – 208.
- [2] Moon, J. K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J Agr Food Chem*, 57, 1655 – 1666.
- [3] Fernández S. A.M. (2009). Antioxidants and diseases: Obesity. In: Morales González J A, Fernández Sánchez A M, Bautista Ávila M, Vargas Mendoza N, Madrigal Santillán E O. (eds.) *Antioxidants and Chronic Degenerative Diseases*. México: Ciencia al Día; 2009. p.411-25
- [4] Santo A., Zhu H., Li Y. R. *Reactive Oxygen Species/Cell Med Press* .2016; 2(4):245–263, <http://dx.doi.org/10.20455/ros.2016.847>.
- [5] Laverse, X., Cosnes, J., Erny, P., & Hasselmann, M. (2001). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. 2ème édition. Edition Springer
- [6] **Favier**, A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108 – 115.
- [7] Delattre, J., Beaudoux, J. L., & Bonnefont-Rousselot. (2005). *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*. Edition Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales, Paris,
- [8] Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333
- [9] D'Archivio M , Filesi, C , Di Benedetto R , Gargiulo R , Giovannini C et Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità* .43(4) : 348-361.
- [10] Sanchez-Moreno, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* 2002, 8, 121-137.
- [11] Niki, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? *Nutrition* 2002, 18, 524-525
- [12] Frankel, E. N.; Meyer, A. S. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 1925-1941
- [13] Schiavone S., Jaquet V., Trabace L., Krause K.H. Severe Life Stress and Oxidative Stress in the Brain: From Animal Models to Human Pathology /*Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(12): 1475–1490. Doi: 10.1089/ars.2012.4720.
- [14] Barouki R. 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences*. 22 : 266-72
- [15] Baudin B. 2006. Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Revue Mt cardio*. 2 (1) : 43-52.
- [16] Kumar K., Pandey A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview/*The ScientificWorld Journal*. 2013: 16 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.
- [17] Magder, S. (2006). Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? *Critical Care Med Journal*, Vol 10, pp. 208-216.
- [18] Adwas A.A, Ata Elsayed S.I., Azab E.A., Quwaydir F.A.(2019). Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J Appl Biotechnol Bioeng*. 2019;6(1):43–47.

- [19] Pham-Huy L.A., Hua H. et Pham-Huy C. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*. 4 (2) : 89-96
- [20] Gonzalez-Vicente A. , Garvin J.L . Effects of Reactive Oxygen Species on Tubular Transport along the Nephron/Antioxidants (Basel). 2017;23;6(2). Doi: 10.3390/antiox6020023.
- [21] Cadet J., Douki T., Gasparutto D. & Ravanat J. L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res*. 531, 5-23.
- [22] Halliwell B., Gutteridge J.M.C., *Free radicals in biology and medicine*, Fourth Edition, New York, Oxford University Press, 2007, 851 p.
- [23] Human D. (2002). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Sci. Aging Knowl. Environ*, 37 ; 14
- [24] Beaudoux, J. L., & Geneviève, D. (2011). *Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives*. 2ème édition. Edition Lavoisier Chantal Arpino, p 130 , 131.
- [25] Traxer B., Huet., J. Poindexter, C. Pak, M. Pearle. (2003). Effect of ascorbic acid consumption on urinary stones risk factors. *J. Urol*, 17: 397-401
- [26] Davermann D, Martinez M, McKoy J, Patel N, Averbek D, Moore CW. Impaired mitochondrial function protects against free radical-mediated cell death. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33(9) : 1209-2
- [27] Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging*, 2007 ; 2(3) : 377-87
- [28] Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2007 ; 2(2) : 219–36
- [29] Thannickal, V. J.; Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol*. 279: L1005-L1028; 2000.
- [30] Alcaraz M. J., Gualillo O., Sánchez-Pernaute O. (2013). *Studies on Arthritis and Joint Disorders*. Springer New York
- [31] Bernard Sablonnière ; Hugue .C ; Jean .L. G ; Jean –Yves Le Gell . (2010) . *Chimie biochimie et biologie moléculaire* 2e Edition Omniscience ; P : 384-385
- [32] Boveris, A.; Oshino, N.; Chance, B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J*. 128: 617-630; 1972.
- [33] Hansford, R. G.; Hogue, B. A.; Mildaziene, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J. Bioenerg. Biomembr*. 29: 89- 95; 1997.
- [34] Korshunov, S. S.; Skulachev, V. P.; Starkov, A. A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. 416: 15-18; 1997.
- [35] Barja, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr*. 31: 347-366; 1999.
- [36] Liu, Y.; Fiskum, G.; Schubert, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain (2002). *J. Neurochem*. 80: 780-787.
- [37] Chen, Q.; Vazquez, E. J.; Moghaddas, S.; Hoppel, C. L.; Lesnefsky, E. J. (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem*. 278: 36027-36031.

- [38] Liu, Y.; Fiskum, G.; Schubert, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 80: 780-787; 2002.
- [39] St-Pierre, J.; Buckingham, J. A.; Roebuck, S. J.; Brand, M. D. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277: 44784-44790; 2002.
- [40] Wu, G., Y. Z. Fang, et al. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134(3): 489-492
- [41] Alcaraz M. J., Gualillo O., Sánchez-Pernaute O. (2013). *Studies on Arthritis and Joint Disorders.* Springer New Yor
- [42] Shiva, S.; Crawford, J. H.; Ramachandran, A.; Ceaser, E. K.; Hillson, T.; Brookes, P. S.; Patel, R. P.; Darley-Usmar, V. M. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J Pt:* 2004
- [43] Bohr, V. A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 32: 804-812; 2002a.
- [44] Echtay, K. S.; Esteves, T. C.; Pakay, J. L.; Jekabsons, M. B.; Lambert, A. J.; Portero-Otin, M.; Pamplona, R.; Vidal-Puig, A. J.; Wang, S.; Roebuck, S. J.; Brand, M. D. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J.* 22: 4103-4110; 2003
- [45] Porter T.D, Coon M.J. Cytochrome P450: Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 13469-13472
- [46] Henrotin Y. (2003). The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 11, (10), 747–755.
- [47] Krause KH. (2004). Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *J. pn J Infect Dis*, 57: S28-29
- [48] Roberts, C. K., Barnarda, R. J., Sindhub, R. K., Jurczak, M., Ehdaieb, A., & Vaziri, N.D. (2006). Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism Clinical and Experimental*, 55, 928-934, 1532-8600
- [49] Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., Núñez, M. J., Parajo, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 72: 145–171
- [50] Harrison R . (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now, *Free Radic-Bio-Med* 33, pp. 774-797
- [51] Thannickal, V. J.; Fanburg, B. L. (2000) .Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol.* 279: L1005-L1028.;
- [52] Martínez-Cayuela M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 77, 147-161.
- [53]Sutherland B. M, Harber LC, Kochevar IE. Pyrimidin dimer formation and repair in human skin.*Cancer Res.* 1980; 40:3181-5
- [54]Hink U., Li H., Mollnau H. (2001). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ.Res.* 88: 14-22
- [55]Edeas, M. (2005). *Les secrets de santé du thé : c'est naturel, c'est ma santé.* Alpen Editions s.a.m.,
- [56]Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functionand human disease. *Int j Biochem Cell Biol*, 39, 44 – 84

- [57] Prigent SVE., Gruppen H., Visser A., van Koningsveld GA., de Jong GAH., Voragen AGJ. (2003). Effects of non-covalent interactions with 5-0-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 5088-5095.
- [58] Jullian C., Moyano L., Yañez C., Olea-Azar C. (2007). Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A*. 67: 230–234.
- [59] Piechota-Polanczyk A., Fichna J. The role of oxidative stress in pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol J. Naunyn-Schmiedeberg*. 2014; 387 (7) ; 605-620.
- [60] Carriere A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona M.C, Penicaud L, Casteilla L. Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie. *Med. Sci.*, 2006,22, 47-53.
- [61] Aguilaniu B, Flore P, Page E, Maitre J, Lacour JR and Perrault H (1998). Effects of indomethacin and polyunsaturated fatty acid diet on exercise-induced hypoxaemia in master athletes. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 77(1-2) :81-88
- [62] Stief TW. (2003). The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth*, 60:567–572..
- [63] Hempel N, Ye H, Abessi B, Mian B and Melendez JÁ (2009). Altered redox status accompanies progression to metastatic human bladder cancer. *Free Radical Biology and Medicine*. 46 : 42–50.
- [64] Migdal C., Serres M. Reactive oxygen species and oxidative stress/*Med Sci*. 2011; 27 (4): 405 – 412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>.
- [65] Sorg, O.(2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. 327: 649-662.
- [66] Kruidenier L. and Verspaget H.W. (2002) Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous? *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 16, 1997-2015.
- [67] Gardès-Albert M. and Jore D. (2005). "Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène." *Radicaux libres et stress oxydant*. Paris, Lavoisier: pp 1-23.
- [68] Pal Yu, B. (1994) Cellular defences against damage from reactive oxygen species . *Physiopathological Reviews*. 74: 139-155.
- [69] Kohen, R., Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. 30: 620-650.
- [70] Ohia S.E., Opere C.A., Leday A.M., Pharmacological consequences of oxidative stress in ocular tissues, *Mutation Research* 579, 2005, 22 -36.
- [71] Wardman, P., & Candeias, L. P. (1996). Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res*, 145, 523 – 531.
- [72] Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases / *Indian J Clin Biochem* .2015; 30 (1): 11- 26.

- [73] Ognjanovic B.I., Markovic S.D., Pavlovic S.Z, Zikic R.V, Stajn A.S, Saicic Z.S. (2008). Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: protective effect of selenium. *Physiol. Res.* 57: 403-411.
- [74] Goto M, Ueda K, Hashimoto T, Fujiwara S, Matsuyama K, Kometani T and Kanazaw K (2008). A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine.* 45 :1318–1325.
- [75] Margaret E. Sears and Stephen J. Genuis(2012). Environmental Determinants of Chronic Disease and Medical Approaches: Recognition, Avoidance, Supportive Therapy, and Detoxification. *J Environ Public Health.* 35 :67-98.
- [76] Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., & Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège,* 62, 628 – 638.
- [77] Wiernsperger NF. (2003). Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab,* 29:579-85.
- [78] Halliwell B. (1995). Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol,* 49(10), 1341-1348
- [79] Droge, W. (2002). Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95
- [80] Halliwell B., J. M. C. Gutteridge (2008). *Free Radicals in Biology and Medicine.* Fourth Edition. Oxford University Press.
- [81] Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.-P., Hasselmann, M. & Lerverve, X. (2006). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte.* Edition Springer, p 255.
- [82] Lehucher-Michel, M.P. ; Lesgards, J.F. ; Delubac, O. ; Stocker, P. ; Durand, P et Prost, M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale.* 30:1076-1081
- [83] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med,* 2002 ; 33(3) : 337-49
- [84] Starkov A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. NY Acad. Sci.,* 2008, 1147, 37–52.
- [85] Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\circ-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.,* 1997, 272, 18515–18517.
- [86] Starkov A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. NY Acad. Sci.,* 2008, 1147, 37–52.
- [87] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 10 mars 2006;160(1):1-40.
- [88] Nomura K., Imai H., Koumura T., Kobayashi T. & Nakagawa Y. (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *J. Biochem,* 351: 183-193
- [89] Renuka B., Rajurkar Z.H., Govind T.G., 2003- Studies on levels of glutathione S-transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. *Current Science.* Vol. 85(9): 1355-1360.
- [90] Gersch C ; Palić sp ; Imaram W ; Kim KM; Karumanchi SA ; Angerholer ; Johnson RJ ; Henderson GN .(2009). Reaction Of peroxynitrite With uric acid of reactive intermediate , alkylated

products and triuret , and in vivo production of triuret under conditions of oxidative stress..
Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids: 118- 149

[90] Gérard-Monnier, D., & Chaudière, J. (1996). Métabolisme et fonction antioxydant du glutathion. *Path Biol*, 44, 77 – 85.

[91] Dickinson, D. A. and H. J. Forman (2002). "Cellular glutathione and thiols metabolism." *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 1019-1026

[92] Deaton C.H.M., Marlin D.J. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clin Tech Equine Pract*, 2(3) : 278-91.

[93] Marie–Claud Bourin. (2011). UE1, Atomes ,biomolécules, génome, bioénergétique, métabolisme. Edition Maloin; Volme : 02, p : 279

[94] Fain, O. (2004). Mise au point : Carences en vitamine C. *La revue de médecine interne* 25, 872–880.

[95] Naidu, K. A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An Overview. *Nutrition Journal* 2 (7), 1-10.

[96] Campbell, P.N., Smith, A.D.(2006). *Biochimie illustré*. Ed. Malloine. Paris. pp:234-311

[97] Palozza P, Simone R, Picci N, Buzzoni L, Ciliberti N, Natangelo A, Manfredini S, Vertuani S. Design, synthesis, and antioxidant potency of novel alpha-tocopherol analogues in isolated membranes and intact cells. *Free Radic Biol Med*, 2008 ; 44(7) : 1452-64

[98] Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*, 2007 ; 43(1): 4-15.

[99] Van Stijn MF, Ligthart-Melis GC, Boelens PG, Scheffer PG, Teerlink T, Twisk JW, Houdijk AP, Van Leeuwen PA. Antioxidant enriched enteral nutrition and oxidative stress after major gastrointestinal tract surgery. *World J Gastroenterol*, 2008 ; 14(45) : 6960-6969

[100] Stehbens WE. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Exp Mol Pathol*, 2003 ; 75(3) : 265-76

[101] Fitsanakis, V., Zhang, N., Garcia, S., Aschner, M. (2009). Manganese (Mn) and Iron (Fe): Interdependency of Transport and Regulation. *Neurotoxicity Research*, 18(2), .124-131.

[102] Chen, Q.; Vazquez, E. J.; Moghaddas, S.; Hoppel, C. L.; Lesnefsky, E. J. (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.*278: 36027-36031

[103] Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 10 mai 2011;283(2-3):65 87.

[104] Laliberté J, Labbé S (2008). The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast]. *Médecine Sci MS*. ,24(3):277 83.

[105] Del Corso L, Pastine F, Protti MA, Romanelli AM, Moruzzo D, Ruocco L, et al. (2000) Blood zinc, copper and magnesium in aging. A study in healthy home-living elderly. *Panminerva Med.*; 42(4): 273 277.

[106] Beaudoux, J. L., & Geneviève, D. (2011). *Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives*. 2ème édition. Edition Lavoisier Chantal Arpino, p 130 , 131.

[107] Di Mascio P., Murphy E. M. et Sies H. 1991. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr*. 53:194-200.

- [108] Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI, Fraga CG. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Arch Biochem Biophys*, 2010 ; 501(1) : 23-30
- [109] Pastre J., Priymenko N., (2007). Intérêt des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Rev. Méd. Vét.*, (4), P : 187.
- [110] Pincemail, J. & Defraigne, J.-O. (2003). Le coenzyme Q10 ou ubiquinone : un antioxydant particulier. *Vaisseaux, Coeur, Poumons* 18 (2), 55-60.
- [111] Das K., Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants/*Front. Environ. Sci.* 2014.
- [112] Nie B., Gan W., Shi F., Hu G., Chen L., et al. Age-Dependent Accumulation of 8-Oxoguanine in the DNA and RNA in Various Rat Tissues/*Oxid Med Cell Longev.* 2013.
- [113] Cadet J., Douki T., Gasparutto D. & Ravanat J. L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.* 531, 5-23.
- [114] Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. & Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut devenir toxique? *Actual. Chim.* 269-270, 91-96.
- [115] Alcaraz M. J., Gualillo O., Sánchez-Pernaute O. (2013). *Studies on Arthritis and Joint Disorders.* Springer New York.
- [116] Delattre J., Durant G., Jardillier C., (2003). *Biochimie pathologique, aspects moléculaires et cellulaires.* Édition Flammarion, pp 176.
- [117] Pryor W. A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48, 657-667.
- [118] Luxford C., Dean R. T. & Davies M. J. (2002) Induction of DNA damage by oxidised amino acids and proteins. *Biogerontology* 3, 95-102.
- [119] Cillard, J. et Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des antioxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(1) : 24-29.
- [120] Su, Z., Yan, X. D., Y.J. and Chen, X. (1993). Effects of hydrogen peroxide on membrane fluidity and Ca(2+) transporting ATP ase activity of rabbit myocardial sarcoplasmic reticulum. *Acta pharmacologica Sinica*, 14 (5): 393-396.
- [121] Hsieh, R.J. and Kinsella, J.E.(1989). Oxydation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with amphasis on fish. *Advances in Food and nutrition Research*, 33: 233-341.
- [121] Frankel, E.N. (1998). Photooxidation of unsaturated fats. In: Frankel, EN, ed. *Lipid oxidation, the oily press Dundee.* 43-54
- [122] Eymard, S. (2003) . Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. p: 28-38.
- [123] Simonov M., Petruh I., Vlizlo V. Processes of lipid peroxidation and antioxidant defense in dairy cows depending on lactation period and season/*Rocz. Nauk.Zoot.T.* 2015:107–115.
- [124] Venkataraman S., Schafer F. Q., Buettner G. R. (2004) Detection of lipid radicals using EPR. *Antioxidants and Redox Signaling* 6, (3), 631–638.
- [125] Dix T. A. & Aikens J. (1993) Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 2-18.

- [126] Bielski B. H., Arudi R. L. & Sutherland M. W. (1983) A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 258, 4759-4761.
- [127] Wagner B. A., Buettner G. R. & Burns C. P. (1994) Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* 33, 4449-4453
- [128] Gardner H. W. (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 65-86.
- [129] Porter N. A. (1986) Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated Lipids. *Acc. Chem. Res.* 19, 262-268.
- [130] Porter N. A., Caldwell S. E. & Mills K. A. (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277-290.
- [131] Girotti A. W. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.* 39, 1529-1542.
- [132] Buettner G. R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 535-543.
- [133] Kojo S. (2004) Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 11, 1041-1064.
- [134] Girotti A. W. (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 63, 103-113.
- [135] Paal J.V.D., Neyts E.C., Verlact C.C.W., Bogaerts A. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress/*Chem. Sci.* 2016; 7: 489–498. Doi: 10.1039/c5sc02311d
- [136] Al-Seeni M.N., Rabey H.A., Zamzam M.A., Alnefayee A.M. The hepatoprotective activity of olive oil and *Nigella sativa* oil against CCl₄ induced hepatotoxicity in male rats/*BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2016 ; 16: 438. Doi: 10.1186/s12906-016-1422-4.
- [137] Kheiri R., Koohi M.K., Sadeghi-Hashjin G., Nouri H., Khezli N. et al. Comparison of the Effects of Iron Oxide, as a New Form of Iron Supplement, and Ferrous Sulfate on the Blood Levels of Iron and Total Iron-Binding Globulin in the Rabbit/*Iran J Med Sci.* 2017 ;42(1):79-84.
- [138] Zhuo Z., Fang S., Hu Q., Huang D., Feng J. Digital gene expression profiling analysis of duodenum transcriptomes in SD rats administered ferrous sulfate or ferrous glycine chelate by gavage/*Sci Rep.* 2016; 6. Doi: 10.1038/srep37923.
- [139] Peña R.C., Silva V.O., Quina F.H., Bertotti M. Hydrogen peroxide monitoring in Fenton reaction by using a ruthenium oxide hexacyanoferrate/multiwalled carbon nanotubes modified electrode/*Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2012;686 :1–6.
- [140] Zhuang T., Han H., Yang Z. Iron, Oxidative Stress and Gestational Diabetes/*Nutrients.* 2014 ; 6(9): 3968–3980. Doi: 10.3390/nu6093968.
- [141] Hewawasam R.P., Jayatilaka K.A.P.W., Pathirana C. Protective effect of *Asteracantha longifolia* against carbon tetrachloride and paracetamol induced oxidative stress and lipid peroxidation in mice/*Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 2016; 5(5): 179-183
- [142] Al-Rasheed N., Faddah L., Sharaf I.A., Mohamed A.M., Al-Rasheed N., et al. Évaluation du rôle potentiel de la silymarine seule ou en association avec la vitamine E et / ou la curcumine sur la lésion hépatique induite par le tétrachlorure de carbone dans le rat/*Braz. cambre. Biol. Technol.* 2015; 58 (6). [Http://dx.doi.org/10.1590/S1516-891320150232](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-891320150232).

- [143] Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 : 720-73.
- [144] Bichis M., Huber A.R.(2000). Les maladies héréditaires de la membrane érythrocytaire: du tableau clinique aux mécanismes génétiques et moléculaires sous-jacents. *Annales de biologie clinique*, , 58 : 277 - 289.
- [145] Gerard Sebahoun (2006). *Hématologie clinique et biologique* 2e édition.
- [146] Michel Degenne, Christian Binet. Erythrocyte normal : morphologie, structure, composition chimique, métabolisme érythrocytaire. Cours novembre 2009.
- [147] Michel Vaubourdolle (2008). *Biochimie Hématologie* 3e édition. Le moniteur internat
- [148] Borg J, Reeber A. (2004) Le stress oxydant, In *biochimie métabolique, les cours du PCEM*. Coll Ellipse, pp 217-234.
- [149] Snyder L.M, Fortier N.L, Trainor J, Leb L, Lubin B, Chiu D, Shohet S, Mohandas N. (1985) Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J. Clin. Invest.* Volume 76, pp 1971-1977
- Mengel C.E, Kann H.E. (1966) Effects of *in vivo* hyperoxia on erythrocytes. III. *In vivo* peroxidation of erythrocyte lipid. *J.clin.invest*, vol 45, N°7. pp 1150-1158
- [150] Sarni-Manchado P et Cheynier V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Lavoisier: Paris,398.
- [151] Waksmundzka-Hajnos M et Sherma J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical ience. *Chromatographic Science Series*, 477-478.
- [152] Dai J et Mumper R. J. (2010). Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propreties. *Molecules*. 15(10) :7313-52.
- [153] Visioli F, Borsani L et Galli C. (2000). Diet and prevention of coronary heart disease: the potential role of Phytochemicals. *CardiovascularResearch*47,419–425.
- [154] Middleton E., Kandaswami C et Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839.
- [155] Bénard C. (2009). Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de Doctorat : Université de NANCY.
- [156] Chira K, Suh j. H, Saucier C et Teissédre P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6 : 75 – 82.
- [157] Ghasemzadeh A et Ghasemzadeh N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (31) : 6697-6703
- [158] Wilfred V et Nicholson R. L. (2008). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Edition, p 82.
- [159] Atta-ur-Rahman. (2003). *Studies in natural products chemistry, volume 28, Bioactive natural products (Part I)*. Edition Elsevier Science B. V. 652.
- [160] Hoffmann D. (2003). *Medical Herbalism : The Science and Practice of Herbal Medicine*. Edition Inner Traditions / Bear& Co . 90.
- [161] Dangles O et Dufour C. (2006). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, Eds O. Andersen and K. Markham, CRC Press, Boca Raton. Chapter. 9:443-469.

- [162] NKHILI, Ez-Z. (2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du fer et du cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de Doctorat : Université de Cadi Ayyad – MARRAKECH.
- [163] Rabasso N. (2006). Chimie organique : Généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques, Edition De Boeck Supérieur . 79.
- [164] Pincemail J, Degruene, F, Voussure S, Malherbe C, Paquot N et Defraigne J.O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme* 21 : 66–75.
- [165] Bruneton J. (2008). Acides phénols. In: *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. Ed: Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 198-260.
- [166] Macheix J. J, Fleuriet A et Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. *Edition Presses Polytechniques & Universitaires Romandes*, p Vii, 2 - 3.
- [167] Chanforan C. (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'Avignon et des Pays de Vaucluse.
- [168] Skerget M, Kotnik P, Hadolin B, Hras A.-R , Simonic M et Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*. 89: 191-198.
- [169] Belkheiri N. (2010). Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE
- [170] Imran M, Ahmad N, Anjum F. M, Kamran-Khan M, Mushtaq Z, Nadeem M et Hussain S. (2015). Potentiel protective properties of flax lignin secoisolaric iresinol diglucoside. *Nutrition journal* .14: 1 – 7.
- [171] Hopkins W. G. (2003). *Physiologie végétale*. 2ème édition. Edition de Boeck Université. 268, 280.
- [172] Edardes, J. P. (2008). *Coumarin Anticoagulant Research Progress*. Edition Nova Biomedical Books, p 100.
- [173] Collin S et Crouzet J. (2011). *Polyphénols et procédés*. Edition Lavoisier TEC & DOC . 5.
- [174] Kuete V. (2013). *Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry*. 1ère édition .Edition Elsevier Insights. 393 - 394.
- [175] Gongbo L, Stacey, T et Jeremy J .J. (2013). Polyphenols from the mangosteen (*Garciniamangostana*) fruit for breast and prostate cancer. *Frontiers in pharmacologie*, 4 (80) : 1 – 4.
- [176] Ghedira K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 3(4):162-169.
- [177] Descheemaeker K et Provoost C .(1999). L'impacte de la nutrition sur la santé, dveloppements recbts-1. Edition. Louvin-Garant. 95.
- [178] Fraga, C. G. (2009). *Plant phenolics and human health : Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology* John Wiley& Sons Edition, pp 5-13.
- [179] Tapas A. R , Sakarkar D. M et Kakde R. B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3) : 1089-1099.

- [180] Kong J.-M, Chia L.-S, Goh N.-K, Chia T.-F et Brouillard R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64 : 923–933.
- [181] Harbone J. B et Grayer R. J. (1988). The flavonoids, *Advances. Research science.* 1-20 .
- [182] Shipp J et Abdel-Aal El-S. M. (2010). Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal* 4: 7-22.
- [183] Gazengel J. M et Orecchioni A. M. (2013). *Le préparateur en pharmacie, Guide théorique et pratique.* 2^{ème} édition. Edition Lavoisier TEC & DOC, Paris . 1174.
- [184] Jarrige R et Ruckebusch, Y. (1995). *Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion.* Editions Quae. 57.
- [185] Dykes L et Rooney L. W. (2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of cereal Sciences* 44 :236 – 241
- [186] Jarrige R et Ruckebusch, Y. (1995). *Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion.* Editions Quae. 57.
- [187] Robert D et Catesson A. M. (2000). *Biologie végétale : caractéristiques et stratégie évolutives des plantes. Organisation végétative.* Wolters Kluwer France Edition, Volume2 . 320.
- [188] Babar M. A, Hahn E. J et Paek K. Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in panax ginseng bioreactor root suspension cultures. *Molecules.* 12 : 607 – 621.
- [189] Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2: 1231-1246.
- [190] Dangles O et Dufour C. (2008) . Recent advances in Polyphenol Research. Chapter .3: 67-87.
- [190] Cos P, Ying L, Calomme M , Hu J.P , Cimanga K , Van-Poel B, Pieters L, Vlietinck A.J, VandenBerghe . (1998) . *J. Nat. Prod.* 61 : 71 -76.
- [191] Dangles O et Dufour C. (2008). Recent advances in Polyphenol Research. Chapter.3 : 67-87.
- [192] Morris C.J, Earl J.R, Trenam C.W et Blake D.R.(1995) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27: 109-122. Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van
- [193] Morris C.J, Earl J.R, Trenam C.W et Blake D.R.(1995) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27: 109-122. Van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van
- [194] Jovanovic S.V , Steenken S, Tosic M, Marjanovic B et Simic M.G.,(1994). *J. Am. Chem. Soc.*, 116 :4846-4851.
- [195] Nève J. (2002). Nutrition et stress oxydant : Modulation de l’apport alimentaire en anti-oxydants. *Optimisation of dietary intake of anti-oxidants. Nutrition clinique et métabolisme* 16 :292–300.
- [196] Stagos D, Amoutzias G. D, Matakos A, Spyrou A, Tsatsakis A. M et Kouretas D. (2012). Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology* 50 : 2155–2170.
- [197] Di Domenico F, Foppoli C, Coccia R et Perluigi M. (2012). Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822: 737–747.
- [198] Yang C. S, Li G, Yang Z, Guan F, Chen A et Ju J. (2013). Cancer prevention by tocopherols and tea polyphenols. *Cancer Letters* 334: 79–85.

- [199] Link A, Balaguer F et Goel A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology* 80 :1771-1792.
- [200] Peters U, Poole C, Arab L. (2001). Does tea affect cardiovascular disease? A metaanalysis. *American Journal of Epidemiology*. 154: 495-503.
- [201] Hollman P.C et Katan M.B. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*. 37: 937-942.
- [202] Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A et al. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*. 76: 560-568.
- [203] Salas-Salvado J , Fernandez-Ballart J , Ros E et al. (2008). Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Archives of Internal Medicine*. 168 (22): 2449-2458.
- [204] Karlsen A, Retterstol L, Laake P et al. (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of proinflammatory mediators in healthy adults. *Journal of Nutrition*. 137: 1951-1954.
- [205] Santangelo C., Vari R., Scaccocchio B et al. (2007). Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*. 43(4): 394-405. [122] Spencer J.P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 69: 244–260.
- [206] Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha M. J et Spencer J. P. E. (2010). Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2 : 1106-1131.
- [207] Spencer J.P. (2010). Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 69: 244–260.
- [208] Dembinska-Kiec A , Mykkänen O, Kiec-Wilk B et Mykkänen H. (2008). Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*. 99: ES109-ES117.
- [209] Johnston K L , Clifford M.N et Morgan L.M. (2003). Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *American Journal and Clinical Nutrition*. 78: 728-733.
- [210] Bonina F.P, Leotta C, Scalia G et Puglia C. (2002). Evaluation of oxidative stress in diabetic patients after supplementation with a standardised red orange extract. *Diabetes Nutrition and Metabolism*.15: 14-19.
- [211] Van Dam R.M et Feskens E.J. (2002). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 360: 1477-1478.
- [212] Deepshikha Gupta (2014) Methods for determination of antioxidant capacity: a Review. *IJPSR*, 2015; Vol. 6(2): 546-566
- [213] Bayliak, M.M. Burdyliuk N.I., Lushchak V.I. (2016). Effects of pH on antioxidant and prooxidant properties of common medicinal herbs *Open Life Sci.*; 11: 298–307.
- [214] Wright, J.S.; Johnson, E.R.; DiLabio, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 1173-1183
- [215] Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffer, A. E. M. F.; Rietjens, I. M. C. M. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant

action of hydroxyflavones. *Free Radical Biol. Med.* 2001, 31, 869-881.

[216] Ou B, Huang D, Woodill-Hampsch M, Flanagan JA, Deemer EK (2002a) Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity. (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem* 50:3122. doi:10.1021/jf0116606

[217] Shalaby EA, Shanab SMM (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 7(10): 528-539.

[217] Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53(8):3101–3113.

[218] Ghiselli, A.; Serafini, M.; Maiani, G.; Azzini, E.; Ferro-Luzzi, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.* 1995, 18, 29-36.

[219] Glazer, A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol.* 1990, 186, 161-168.

[220] Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* 1993, 14, 303-311.

[221] Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4619-4926.

[222] Niki, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol.* 1990, 186, 100-108

[223] Ou, B.; Prior, R. L.; Huang, D. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1841-1856.

[224] Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Locke, S. J. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human plasma by controlled peroxidation of the

important contribution made by plasma proteins. *FEBS Lett.* 1985, 187, 33-37.

[225] DeLange, R. J.; Glazer, A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal. Biochem.* 1989, 28, 300-306.

[226] Sartor, V.; Henderson, P. T.; Schuster, G. B. Radical cation transport and reaction in RNA/DNA hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 11027-11033

[227] Bartosz, G.; Janaszewska, A.; Ertel, D.; Bartosz, M. Simple determination of peroxy radical-trapping capacity. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1998, 46, 519-528.

[228] Tanaka, K.; Miura, T.; Umezawa, N.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Nagano, T. Rational design of fluorescein-based fluorescent probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 2530-2536.

[229] Whitehead, T. P.; Thorpe, G. H. G.; Maxwell, S. R. J. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Anal. Chim. Acta* 1992, 266, 265-277.

[230] Muller, T.; Davies, E. V.; Campbell, A. K. Phorasin R chemiluminescence detects mostly superoxide anion released by activated human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 105

[231] Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996, 239, 70-76.

[232] Pellegrini, P.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 2003, 133, 2812-2819.

[233] Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996, 239, 70-76.

[234] Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3396-3402.

[235] Apak, R.; Güçlü, K. G.; Özyürek, M.; Karademir, S. E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7970-7981

[236] Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen

radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3273-3279.

[236] Frankel, E. N.; Meyer, A. S. The problems of using onedimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 1925- 1941.

[237] Reiter R.J. Tan D. Mayo J.C. Sainz R.M. Leon J, Czarnocki Z (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochemica polonica* 50(4):1129-1146.

[238] Jimenez, A.; Selga, A.; Torres, J. L.; Julia, L. Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction reactions in flavan-3-ols. *Org. Lett.* 2004, 6, 4583-4586.

[239] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1995, 28, 25-30

[240] Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1997, 30, 609-615.

[241] Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1997, 30, 609-615.

[242] Sanchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 1998, 76, 270-276

[243] Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarim J. Sci. Technol.* 26 :211 – 219.

[244] Miller, N. J.; Diplock, A. T.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 1993, 84, 407-412.

[245] Miller, N. J et Rice-Evans C. A.(1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} radical cation assay. *Free Radical Biol. Med.* 26: 195-199.

[246] Arnao, M. B.; Cano, A.; Hernandez-Ruiz, J.; Garcia-Canovas, F.; Acosta, M. Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Anal. Biochem.* 1996, 35, 255-261.

[247] Benavente-García O, Castillo J et Lorente J. (2000). Antioxidant activity of phenolic extracted from oleaeuropaea L leaves. *Food Chem.* 68: 457-462.

[248] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M et Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine.* 26 (9/10): 1231-1237.

Lien E. J, Ren S, Bui H. H , Wang R. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, 26: 285-294

[250] Mebrek S , Djeghim H , Mehdi, Meghezzi A , Sirajudheen A , Awadh A, A. Nasser, Benali M. *International Journal of Phytomedicine*, 2018, 10(1): 58-67

[251] Chung Y. C, Chang C. T, Chao W. W, Lin C. F et Chou S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 50 :2454 – 2458.

[252] Amarowicz R, Pegg R. B, Rahimi-Moghaddam P, Barl B et Weil J. A. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry.* 84 : 551 – 562.

Thème

L'effet antioxydant des polyphénols : Etude *in vitro*

Résumé

D'un jour à l'autre, les antioxydants deviennent une partie essentielle de notre vie. Les antioxydants aident à neutraliser ou à détruire les radicaux libres (ROS/RNS) élaborés durant un état physiologique normal ou issues d'un stress oxydant avant qu'ils ne puissent atteindre les biomembranes et endommager les organites cellulaires. Cette étude revoit les différents types des radicaux libres nocifs générés durant les processus métaboliques et donne également un aperçu de l'aspect mécaniste chimique des diverses méthodes évaluant *in vitro* le pouvoir antioxydant des polyphénols. Ces derniers, issues du métabolisme secondaire des différentes espèces végétales, ont fait l'objet d'un aperçu détaillé englobant leurs diversité structurale ainsi que leur mode d'action antioxydant vis-à-vis les différents types des radicaux libres. Cette étude a revu d'une manière détaillée les différentes méthodes d'évaluation *in vitro* basées sur les deux mécanismes d'action par lesquels les polyphénols antioxydants peuvent neutraliser les espèces radicalaires, à savoir, le transfert d'atome d'hydrogène (HAT) et le transfert d'électrons (SET). Malgré le nombre les méthodes développées et testées pour évaluer le pouvoir antioxydant des polyphénols *in vitro*, seulement les avantages et les limites de ces méthodes sont encore en débat. Il semble qu'il n'y a pas un consensus pour standardiser une méthode plus pratique et plus simple pour évaluer le pouvoir antioxydant total des polyphénols.

Mots clés: stress oxydant, antioxydant, polyphénols, HAT, SET

Abstract

Over time, antioxidants become an essential part of our life. Antioxidants help neutralize or destroy free radicals (ROS / RNS) produced during normal physiological conditions or resulting from oxidative stress before they can reach biomembranes and damage cell organelles. This study reviews the different types of harmful free radicals generated during metabolic processes and also gives an overview of the mechanistic aspect of the various methods evaluating *in vitro* the antioxidant power of polyphenols. The latter, resulting from the secondary metabolism of different plant species, have been the subject of a detailed overview encompassing their structural diversity as well as their antioxidant mode of action against the different types of free radicals. This study reviewed in detail the different *in vitro* assessment methods based on the two mechanisms of action by which antioxidant polyphenols can neutralize radical species, namely, hydrogen atom transfer (HAT) and electron transfer (SET). Despite the number of methods developed and tested to assess the antioxidant power of polyphenols in vitro, the advantages and limitations of these methods are still under debate. There appears to be no consensus to standardize a more convenient and simpler method for assessing total antioxidant power of polyphenols.

Key words: oxidative stress, antioxidant, polyphenols, HAT, SET.

Présenté et soutenu par :

BOUDJELAL ASMA

KEBAILI OUIAM

MEZIANI IMENE

Président du jury : BOULDJADJ Redoiane Docteur- UFM Constantine.

Rapporteur : MENAD Ahmed. Professeur - UFM Constantine

Examineurs : BOULKANDOUL Ramzi Docteur - UFM Constantine

Année universitaire
2019- 2020