



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

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 :

---

# **Les polyphénols : Structure, pouvoir antioxydant et méthodes *in vitro* de l'évaluation de l'activité antioxydante**

---

**Présenté et soutenu par :**

**Le : 17 /09/2020**

- HEROUAL Khadidja
- FILALI Sara
- MEGUELLATI Sara

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** MENAD Ahmed

Pr. Université Mentouri Constantine 1

**Rapporteur :** BOULDJADJ Redouane

MAA. Université Mentouri Constantine 1

**Examineur :** BOULKANDOUL Ramzi

MAA. Université Mentouri Constantine 1

*Année universitaire*

**2019-2020**

# **Remerciements**

*Merci à Dieu le tout puissant qui nous a doté du courage, de volonté, de persévérance, de patience et de foi en nous-même ainsi que le souffle de vie qu'il renouvelle en nous afin que la réalisation de ce travail soit possible.*

*Ce mémoire n'aurait jamais vu le jour sans la contribution de nombreuses personnes que nous tenons à remercier et auxquelles nous rendons hommage par ces quelques lignes ci-dessous.*

*Nous remercions très singulièrement notre encadreur Monsieur BOULDJADJ Redouane pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'il nous a témoigné tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nous tenons aussi à remercier profondément les membres du jury :*

*Monsieur MENAD Ahmed professeur à l'université de Constantine et Monsieur BOULKANDOUL Ramzi maitre-assistant à l'université de Constantine qui Nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*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.*

*Et enfin nous remercierons toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Tout d'abord, louange à **Allah** Tout-Puissant qui m'a donné courage, santé et patience sans lesquels ce travail aurait été définitivement impossible à accomplir.*

*A mes très chers **Parents**... en hommage à tous les sacrifices que vous m'avez consenti durant ces longues années d'études. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis devenu... merci de m'avoir appris à vivre dans l'honneur et la dignité. Mes mots sont limités, mes sentiments sont denses, mon amour est profond, mon respect et ma vive gratitude sont sans fin... rien ne semble suffire pour vous estimer à votre juste valeur. Merci pour toute la confiance et tous les encouragements... Merci d'avoir toujours été là quand j'avais besoin de vous... merci de m'avoir toujours donné la force pour aller de l'avant. Je mets aujourd'hui entre vos mains le fruit de votre patience et votre confiance. Chaque mot et chaque lettre est une reconnaissance pour votre amour... Papa maman, la dette est lourde! ... comment vous rendre hommage.*

*Ce travail est également dédié à ma première amie, gardienne de mes secrets, mon unique petite sœur « **Imène** » ... Merci d'avoir toujours été là... Merci simplement d'être toi... Je t'aime très fort.*

*Un grand hommage est également dédié à un être très cher, que j'ai toujours considéré comme un soutien et une source d'énergie ... à toi tante **Nadia**, ma seconde mère, ou « **Nana** » comme j'ai l'habitude de t'appeler, je te dédie ce travail et te souhaite santé et prospérité.*

*À toute ma grande famille sans exception. Je vous aime Tous.*

*À La mémoire de mes grands-mères **Aïcha** et **Fatima Zohra**, mon oncle **Brahim** « **Nacer** », qu'Allah vous accueille dans son vaste paradis.*

*À mes chères amies "**Malak, Hiba, Randa, Rania, Hanine** et **Yasmine**" ... merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours encouragé ... merci pour les années inoubliables que nous avons passées ensemble... Merci tout simplement d'être mes amies ... Je vous aime.*

*Enfin à mon trinôme "**Khadija** et **Sara**" merci de ne pas avoir lâché prise, et d'avoir tenu bon jusqu'au bout ... ce n'était pas facile, mais on y est quand même arrivé !!*

*SARA Meguellati*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mon très cher père pour tous ce qu'il a fait pour moi durant toutes mes années d'étude, pour ses encouragements et ses orientations.  
Ma très chère mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa patience.*

*Mes chères sœurs « Soumia, Hiba »*

*Mes chers frères « Mouhamed , Abde rahmane , Youcef et Islam »*

*Mon cher neveu « Zaid »*

*Mes très chères amies « Soumia, Bouchra et Hiba »*

*Mon trinôme « Khadidja et Sara »*

*Mes enseignants qui m'ont suivi tout au long de mon cursus universitaire.*

*Tous les étudiants de master de la promotion 2020.*

*SARA Filali*

# *Dédicaces*

*C'est avec un grand honneur que je dédie ce modeste travail aux deux personnes qui se sont sacrifiées pour que je grandisse avec un savoir-faire et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras....*

## *A mes très chers parents*

*Je ne pourrai jamais assez-vous dire merci pour les conseils, le soutien, les encouragements et pour les prières qui m'ont accompagnés tout au long de mes études. Ce travail est le fruit de tous vos sacrifices, que mieux que des mots, ils traduisent tout l'amour que je ressens pour vous.*

*Que Dieu vous garde longtemps près de nous*

## *Je dédie ce travail également :*

*À ma chère grand-mère, pour l'amour qu'elle m'apporte et son soutien.*

*À mon cher unique frère « mohamed lamine »*

*À mes chères sœurs « Soumia , meriem, khawla et Doua »*

*À mon trinôme « Sara et Sara » qui ont partagé avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.*

*À tous ceux qui me sont chers*

*Que dieu les protège tous*

*KHADJJA Heroual*

# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

*Page*

INTRODUCTION..... 1

## RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

I. LES POLYPHENOLS..... 3

I.1. Définition..... 3

I.2. La biosynthèse..... 3

I.2.1. Voie du shikimate..... 3

I.2.2. Voie de l'acétate / malonate..... 3

I.3. Les classes principales des polyphénols..... 4

I.3.1. Les acides phénoliques..... 4

I.3.1.1. Les acides hydroxybenzoïques..... 5

I.3.1.2. Les acides hydroxycinnamiques..... 5

I.3.2. Les flavonoïdes..... 6

I.3.2.1. Classification des flavonoïdes..... 6

I.3.3. Les tanins..... 8

I.3.3.1. Les tanins hydrolysables..... 9

I.3.3.2. Les tanins condensés (proanthocyanidines)..... 9

I.3.4. Les coumarines..... 9

I.3.5. Les stilbènes..... 10

I.3.6. Les lignines..... 10

II. LES RADICAUX LIBRES, LE STRESS OXYDANT ET LES ANTIOXYDANTS..... 11

II.1. Les radicaux libres..... 11

II.1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)..... 11

II.1.1.1. Les espèces oxygénées radicalaires..... 12

II.1.1.2. Les espèces oxygénées non radicalaires..... 12

II.1.2. Espèces réactives azotées (ERN)..... 13

II.1.2.1. Espèce radicalaire azotées..... 14

<b>II.2. Principales sources des espèces réactives d'oxygène</b> .....	14
<b>II.2.1. Les Sources endogènes</b> .....	14
<b>II.2.1.1. La mitochondrie</b> .....	14
<b>II.2.1.2. Le réticulum endoplasmique</b> .....	15
<b>II.2.1.3. NADPH oxydase</b> .....	15
<b>II.2.1.4. Xanthine oxydase</b> .....	15
<b>II.2.2. Les sources exogènes</b> .....	15
<b>II.3. Le stress oxydant</b> .....	16
<b>II.3.1. Définition</b> .....	16
<b>II.3.2. Effets sur l'organisme du stress oxydant</b> .....	16
<b>II.3.2.1. Effet moléculaire</b> .....	16
<b>II.3.2.2. Affections liées au stress oxydant</b> .....	18
<b>II.4. Antioxydants</b> .....	18
<b>II.4.1. Généralité</b> .....	18
<b>II.4.2. Mécanisme d'action des antioxydants</b> .....	19
<b>II.4.3. Le système de défense antioxydant</b> .....	19
<b>II.4.3.1. Le système antioxydant endogène</b> .....	19
<b>II.4.3.2. Le système antioxydant exogène</b> .....	21
<b>III. L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES POLYPHENOLS</b> .....	24
<b>III.1. Activité antioxydante des polyphénols dans les aliments</b> .....	24
<b>III.2. Pouvoir antioxydant des polyphénols chez les Humains</b> .....	25
<b>III.2.1. Biodisponibilité des polyphénols</b> .....	25
<b>III.2.1.1. Absorption</b> .....	25
<b>III.2.1.2. La conjugaison</b> .....	26
<b>III.2.1.3. Elimination</b> .....	28
<b>III.2.2. Mécanismes antioxydants des polyphénols</b> .....	28
<b>III.2.2.1. Piégeage des radicaux libres</b> .....	28
<b>III.2.2.2. Chélation des ions métalliques</b> .....	30
<b>III.2.2.3. Inhibition des enzymes</b> .....	32
<b>III.3. Les polyphénols : une action pro-oxydante</b> .....	32
<b>IV. POLYPHENOLS ET SANTE</b> .....	34
<b>IV.1. Généralités</b> .....	34
<b>IV.2. Polyphénols et microbes</b> .....	34
<b>IV.3. Polyphénols et inflammation</b> .....	35
<b>IV.4. Polyphénols et cancers</b> .....	36
<b>IV.5. Polyphénols et maladies cardiovasculaires</b> .....	36
<b>IV.6. Polyphénols et diabètes</b> .....	37
<b>IV.7. Polyphénols et autres pathologies</b> .....	37

<b>V. METHODES <i>IN VITRO</i> DE L'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE TOTALE DESPOLYPHENOLS.....</b>	<b>39</b>
<b>V.1. Généralité.....</b>	<b>39</b>
<b>V.2. Techniques spectrophotométriques de l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols.....</b>	<b>39</b>
<b>V.2.1. Test au DPPH.....</b>	<b>40</b>
<b>V.2.1.1. Présentation du test au DPPH.....</b>	<b>40</b>
<b>V.2.1.2. Protocole du test au DPPH.....</b>	<b>40</b>
<b>V.2.2. Test de ABTS.....</b>	<b>41</b>
<b>V.2.2.1. Présentation du test de ABTS.....</b>	<b>41</b>
<b>V.2.2.2. Protocole du test de ABTS.....</b>	<b>42</b>
<b>V.2.3. Test FRAP.....</b>	<b>42</b>
<b>V.2.3.1. Présentation du test de FRAP.....</b>	<b>42</b>
<b>V.2.3.2. Protocole du test de FRAP.....</b>	<b>43</b>
<b>V.2.4. Test de ORAC.....</b>	<b>43</b>
<b>V.2.4.1. Présentation du test de ORAC.....</b>	<b>43</b>
<b>V.2.4.2. Protocole du test de ORAC.....</b>	<b>44</b>
<b>V.2.5. Test de PFRAP.....</b>	<b>44</b>
<b>V.2.5.1. Présentation du test de PFRAP.....</b>	<b>44</b>
<b>V.2.5.2. Protocole du test de PFRAP.....</b>	<b>44</b>
<b>V.2.6. Test de CUPRAC.....</b>	<b>44</b>
<b>V.2.6.1. Présentation du test de CUPRAC.....</b>	<b>44</b>
<b>V.2.6.2. Protocole du test de CUPRAC.....</b>	<b>45</b>
<b>V.3. Techniques électrochimiques de l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols.....</b>	<b>46</b>
<b>V.3.1. Voltampérométrie cyclique.....</b>	<b>46</b>
<b>V.3.2. Méthode des biocapteurs.....</b>	<b>46</b>
<b>V.3.3. La méthode biamperométrique.....</b>	<b>47</b>
<b>V.3.4. La méthode ampérométrique.....</b>	<b>47</b>
<b>V.4. Méthodes chromatographiques de l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols.....</b>	<b>47</b>
<b>V.4.1. Chromatographie en phase gazeuse.....</b>	<b>47</b>
<b>V.4.2. HPLC.....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>50</b>



# Liste des abréviations

**%** : Pourcentage

**μL** : Microlitres

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>**: Oxygène singulet

**ABTS** : 2,2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique]

**AChE** : L'acétylcholine estérase

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique

**CAT** : Catalase

**Cl<sup>-</sup>** : Ion chlore

**CCl<sub>4</sub>** : Tétrachlorure de carbone

**CoQ10** : CoenzymeQ10

**COX**: Cyclo-oxygénase

**Cu<sup>+</sup>**: Cuivre I

**CUPRAC** : Capacité antioxydante par réduction du cuivre

**DPPH**: 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl

**DT2** : Diabète de type 2.

**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène

**ERN** : Espèces réactives de l'azote

**ET** : Transfert d'électrons

**Fe<sup>2+</sup>**: Ion ferreux

**Fe<sup>3+</sup>**: Ion ferrique

**FRAP** : Pouvoir antioxydant réducteur du fer

**g**: Gramme

**GC** : Chromatographie en phase gazeuse

**GPX** : glutathion peroxydase

**GR** : Glutathion réductase

**GSH** : Glutathion

**GSSG** : Glutathion oxydé

**H<sup>+</sup>**: Proton

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**HAT** : Transfert d'atomes d'hydrogène

**HO•**: Radical hydroxyle

**HOCl:** Acide hypochloreux  
**HPLC :** Chromatographie Liquide Haute Performance  
**HT-29 :** Human colon cancer cell line  
**LDL :** Lipoprotéines de densité légère  
**LPO:** Lipooxygénase  
**MDA :** Malondialdéhyde  
**ml :** Millilitre  
**mM :** Millimole  
**N<sub>2</sub> :** Azote  
**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:** Trioxyde d'azote  
**NADH :** Nicotinamide adénine dinucléotide d'hydrogène  
**NADPH:** Nicotinamide-Adenine-dinucleotide-Phosphate  
**NF-κB :** Nuclear factor-kappa B  
**NO<sup>•</sup> :** Oxyde nitrique  
**NO :** Monoxyde d'azote  
**NO<sub>2</sub> :** Dioxyde d'azote  
**NOS :** Oxyde nitrique synthèse  
**O<sub>2</sub> :** Oxygène  
**O<sub>2</sub><sup>-•</sup> :** Anion superoxyde  
**ONOO<sup>-</sup> :** Peroxynitrite  
**ONOOH:** Nitroperoxyde  
**ORAC:** Capacité antioxydante du radical oxygène  
**PFRAP :** Pouvoir réducteur du ferricyanure de potassium  
**pH:** Potentiel hydrogène  
**PPO :** Polyphénol oxydase.  
**R<sup>•</sup> :** Radical alkyles  
**RE :** Réticulum endoplasmique  
**ROO<sup>•</sup> :** Radical peroxyde  
**ROOH:** Radical hydroperoxyde  
**ROS :** Espèces réactives de l'oxygène  
**SOD :** Superoxyde dismutase  
**SGLT1 :** Transporteur sodium-glucose  
**TPTZ :** Tripyridyltriazine ferrique  
**UV :** Ultra-violet

# Liste des figures

	<i>Page</i>
<b>Figure 1</b> : Biosynthèse des composés phénolique.....	4
<b>Figure 2</b> : Structure chimique générale des flavonoïdes.....	6
<b>Figure 3</b> : Exemple d'unité structurale de base des tanins condensés.....	9
<b>Figure 4</b> : Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote intervenant dans le phénomène du stress oxydant.....	13
<b>Figure 5</b> : Mode d'action des antioxydants phénoliques.....	29
<b>Figure 6</b> : La géométrie octaédrique de coordination prévue du complexe général du fer polyphénol. ....	30
<b>Figure 7</b> : Coordination de $Fe^{2+}$ par des polyphénols suivant la réaction de transfert d'électron en présence de l'oxygène conduisant à la génération du Complexe $Fe^{3+}$ -polyphénol.....	31
<b>Figure 8</b> : Coordination de $Fe^{3+}$ par des polyphénols conduisant à la réduction du fer et à la formation d'une semiquinone, et la réduction de $Fe^{3+}$ forme une espèce de quinone et $Fe^{2+}$ .....	31
<b>Figure 9</b> : Réaction du radical DPPH avec d'autres radicaux.....	40
<b>Figure 10</b> : Formation d'un radical ABTS ( $ABTS^+$ ) stable à partir d'ABTS avec du persulfate de potassium.....	41
<b>Figure 11</b> : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique $Fe(III)$ - TPTZ et un antioxydant (AH) .....	43
<b>Figure 12</b> : La réaction du test CUPRAC.....	45

# Liste des tableaux

	<i>Page</i>
<b>Tableau 1:</b> Principaux acides hydroxybenzoïques.....	5
<b>Tableau 2:</b> Principaux acides hydroxycinnamiques.....	5
<b>Tableau 3:</b> Les principales flavones.....	6
<b>Tableau 4:</b> Les principales isoflavones.....	7
<b>Tableau 5:</b> Les principales flavanones.....	7
<b>Tableau 6:</b> Les principaux flavanols.....	7
<b>Tableau 7:</b> Les principaux flavonols .....	8
<b>Tableau 8:</b> Les principaux anthocyanines.....	8
<b>Tableau 9 :</b> Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques	11
<b>Tableau 10 :</b> Principales affections liées au stress oxydant.....	18

## Résumé

De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. L'utilisation thérapeutique des plantes est partie intégrante des traditions de toutes les cultures. La valorisation médicinale de ces pratiques passe notamment par l'isolement et l'identification de nouvelles molécules. Les études des métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vitro* et *in vivo* des tissus végétaux. C'est le cas notamment des composés phénoliques qui font l'objet de notre étude, composés largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydant et anti radicalaires.

Le but de cette étude consiste non seulement à renforcer les données phytochimiques des polyphénols, mais aussi à mettre en évidence l'activité antioxydante, antiradicalaire et d'autres activités biologiques des polyphénols et leur intérêt sur la santé.

L'activité antioxydante et antiradicalaire des polyphénols pourra être évaluée par plusieurs méthodes par exemple des méthodes spectrophotométrique, tels que le test au radical libre DPPH, le test au radical libre ABTS, la FRAP...Etc, des techniques électrochimiques ainsi que par des méthodes chromatographiques tel que la chromatographie sur phase gazeuse et l'HPLC.

Ce travail a fourni de nouvelles connaissances ethnopharmacologiques et phytochimiques au sujet des plantes médicinales et constitue une contribution à l'étude du rôle des polyphénols naturels dans la régulation du stress oxydatif.

**Mot clé :** Stress oxydant, radicaux libres, antioxydante, polyphénols, flavonoïde DPPH, ABTS.

## Abstract

Nowadays, natural products are an important source for the research of new compounds active against many diseases. The therapeutic use of plants is an integral part of the traditions of all cultures. The medicinal use of these practices includes the isolation and identification of new molecules. Studies of secondary metabolites are the subject of numerous research projects based on *in vitro* and *in vivo* cultures of plant tissues. This is notably the case of the phenolic compounds that are the subject of our study, compounds widely used in therapy as vasculoprotectors, anti-inflammatory drugs, enzyme inhibitors, antioxidants and antiradicals.

The aim of this study is not only to strengthen the phytochemical data of polyphenols, but also to highlight the antioxidant, antiradical and other biological activities of polyphenols and their relevance to health.

The antioxidant and antiradical activity of polyphenols can be assessed by several methods, for example spectrophotometric methods such as the DPPH free radical test, ABTS free radical test, FRAP...Etc, electrochemical techniques as well as chromatographic methods such as gas chromatography and HPLC.

This work has provided new ethnopharmacological and phytochemical knowledge about medicinal plants and is a contribution to the study of the role of natural polyphenols in the regulation of oxidative stress.

**Keyword:** Oxidative stress, free radicals, antioxidant, polyphenols, flavonoid DPPH, ABTS.

## الملخص

اليوم، المنتجات الطبيعية هي مصدر مهم للبحث عن مركبات نشطة جديدة ضد العديد من الأمراض. الاستخدام العلاجي للنباتات هو جزء لا يتجزأ من تقاليد جميع الثقافات. ويشمل التحسين الطبي لهذه الممارسات عزل وتحديد الجزيئات الجديدة. دراسات المستقبل الثانوية هي موضوع الكثير من البحوث على أساس في المختبر وفي الثقافات الأنسجة النباتية في الجسم الحي. هذا هو الحال بشكل خاص بالنسبة للمركبات الفينولية التي هي موضوع دراستنا، والمركبات المستخدمة على نطاق واسع في العلاجات مثل الأدوية الوعائية، والأدوية المضادة للالتهابات، ومثبطات الانزيم، ومضادات الأكسدة ومضادات الجذور.

الهدف من هذه الدراسة ليس فقط لتعزيز البيانات النباتية من البوليفينول، ولكن أيضا لتسليط الضوء على مضادات الأكسدة، ومكافحة التطرف والأنشطة البيولوجية الأخرى من البوليفينول واهتمامهم بالصحة.

يمكن تقييم النشاط المضاد للأكسدة ومكافحة التطرف من البوليفينول من خلال عدة طرق مثل أساليب المطياف المطييف، مثل اختبار DPPH الراديكالية الحرة، واختبار ABTS الراديكالية الحرة، و FRAP... الخ، والتقنيات الكهروكيميائية، فضلا عن أساليب الكروماتوغرافيا مثل الكروماتوغرافيا مرحلة الغاز و HPLC.

وقد وفر هذا العمل معارف جديدة في علم الأعشاب الكيميائي النباتي عن النباتات الطبية، وهو مساهمة في دراسة دور البوليفينول الطبيعي في تنظيم الإجهاد التأكسدي.

**الكلمات المفتاحية:** الإجهاد التأكسدي، الجذور الحرة، مضادات الأكسدة، البوليفينول، الفلافونويد DPPH،

ABTS

# **Introduction**



## INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) ou sont des dérivés de produits naturels (Newman *et al.*, 2003 ; Boldi, 2004).

Les composés phénoliques ou polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal et sont les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes. Ces métabolites comprennent de nombreuses classes de composés allant des acides phénoliques simples aux flavonoïdes complexes (Nawaz *et al.*, 2006). Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactériennes, anti-cancérigène, anti-inflammatoire, antioxydante etc...) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques (Japon-Lujan *et al.*, 2008).

Le stress oxydatif se produit lorsque l'équilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et la quantité des antioxydants est interrompu. Il est lié à de nombreuses pathologies, par exemple le cancer, le diabète de type 2, l'asthme, le vieillissement prématuré et les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et inflammatoires (Subedi *et al.*, 2014). C'est pour cela que la recherche sur les antioxydants s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de permettre de trouver les meilleurs antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir ces différentes maladies.

D'autre part, l'alimentation joue un rôle très important dans l'apport en antioxydants exogènes qui vont venir soutenir l'effet des antioxydants endogènes. Les antioxydants sont principalement apportés par les végétaux, on y retrouve notamment les polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, lignanes, stilbènes), les vitamines (vitamine E, vitamine C et vitamine A) ainsi que les oligoéléments (cuivre, manganèse, sélénium et zinc).

Les polyphénols présentent des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Ces antioxydants agissent en bloquant ou inhibant à la fois la formation et la propagation des radicaux libres (Shah *et Modi*, 2015). Ces substances suscitent beaucoup d'intérêts dans plusieurs domaines, celui de la nutrition par leur caractère préventif à l'égard de diverses maladies citées précédemment, en cosmétologie et surtout dans les industries agroalimentaires par leurs implications, en particulier, sur la valeur des aliments et leur incidence

sur la conservation des produits alimentaires. Ainsi, ils pourraient constituer une alternative à l'utilisation des additifs alimentaires synthétiques, buthylhydroxyanisol (BHA) et buthylhydroxytoluène (BHT), qui ont montré des effets nuisibles (effet carcinogène) (Achat et al., 2013).

C'est en ce sens que l'étude de l'activité antioxydante des polyphénols est aujourd'hui devenue importante. Une grande partie de notre revue de bibliographie est présentée sur les polyphénols : structures et propriétés, capacité antioxydante, biodisponibilité et effet sur la santé.

L'activité antioxydante des polyphénols peuvent-être évaluées *in vitro* et *in vivo* au moyen de simples expériences, et en même temps, l'éventuel effet pro-oxydant sur différentes molécules peut être évalué. L'activité antioxydante ne peut pas être mesurée directement, mais elle est déterminée par les effets de l'antioxydant pour contrôler le degré d'oxydation. Il existe diverses méthodes pour évaluer l'activité antioxydante. Certaines méthodes impliquent une étape d'oxydation différente suivie par la mesure de la réponse, qui dépend de la méthode utilisée pour évaluer l'activité (Francenia Santos-Sánchez et al., 2019).

C'est pourquoi, et afin de mieux situer sur le contexte dans lequel s'inscrit cette présente recherche, nous nous sommes intéressés dans une partie de notre recherche bibliographique aux différentes méthodes *in vitro* de l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols.

Dans ce mémoire, nous avons pour objectif de réaliser une recherche bibliographique afin de donner un aperçu sur les dernières recherches dans le domaine des polyphénols, de mettre en relation l'activité antioxydante de ces polyphénols avec leurs intérêts sur la santé et de présenter les différentes méthodes *in vitro* qui permettent l'évaluation de leur activité antioxydante.

Notre travail sera présenté par 5 chapitres : Le premier chapitre vise l'étude des composés phénoliques, leurs biosynthèses et leurs principales classes. Le second chapitre est consacré à un rappel sur le stress oxydant, les principales sources des radicaux libres et leurs implications physiologiques et pathologiques suivi par la détermination des principaux antioxydants notamment leurs mécanismes d'actions. Nous avons ensuite abordé un troisième et un quatrième chapitre sur l'activité antioxydante des polyphénols ainsi que leurs intérêts sur la santé. Nous avons enfin dans le cinquième chapitre abordé les différentes méthodes *in vitro* de l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols.

# **Recherches bibliographiques**

**Chapitre I :**  
**Les polyphénols**

## **I- LES POLYPHENOLS :**

### **I-1- Définition :**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui constituent un des groupes les plus représentés et largement distribués dans le monde végétal avec plus de 8000 structures phénoliques (Bruneton, 2015 ; Šaponjac et al., 2016). Ces composés sont d'une importance physiologique et morphologique considérable chez les végétaux, ils jouent un rôle important dans leur croissance, leur reproduction, leur pigmentation et dans leur mécanisme de défense contre les rayonnements ultraviolets et les agents pathogènes (Hu et Luo, 2016). La qualité et la quantité des polyphénols dans les plantes peuvent varier considérablement en fonction de différents facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que le génotype des plantes, la composition du sol, le degré de maturité et l'état des cultures (Faller et Fialho, 2010).

Structurellement, les composés phénoliques comprennent un ou plusieurs cycles aromatiques, portant un ou plusieurs groupements hydroxyle ( $^-\text{OH}$ ), et vont de simples molécules phénoliques à des composés hautement polymérisés. La plupart des composés phénoliques d'origine naturelle sont présents sous formes conjuguées ; des mono- et des polysaccharides liés à un ou plusieurs groupes phénoliques, et peuvent également se produire sous forme de dérivés fonctionnels, tels que des esters et des esters méthyliques (Molino et al., 2016).

Ils sont divisés en plusieurs classes, en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et les fonctions chimiques liées à ces cycles (Pérez-Pérez et al., 2013) à savoir : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les coumarines (Luthria et al., 2006).

### **I-2- La biosynthèse :**

Les phénols des plantes sont synthétisés à partir de deux voies principales :

#### **I-2-1- Voie du shikimate :**

Cette voie permet la transformation des monosaccharides, issus du métabolisme primaire, en acides aminés aromatiques (phényalanine et tyrosine) par désamination. Ces acides aminés conduisent à la formation des acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques, les lignines et les coumarines (Bruneton, 1999).

#### **I-2-2- Voie de l'acétate / malonate :**

La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl-CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que 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 (Akroum, 2011).

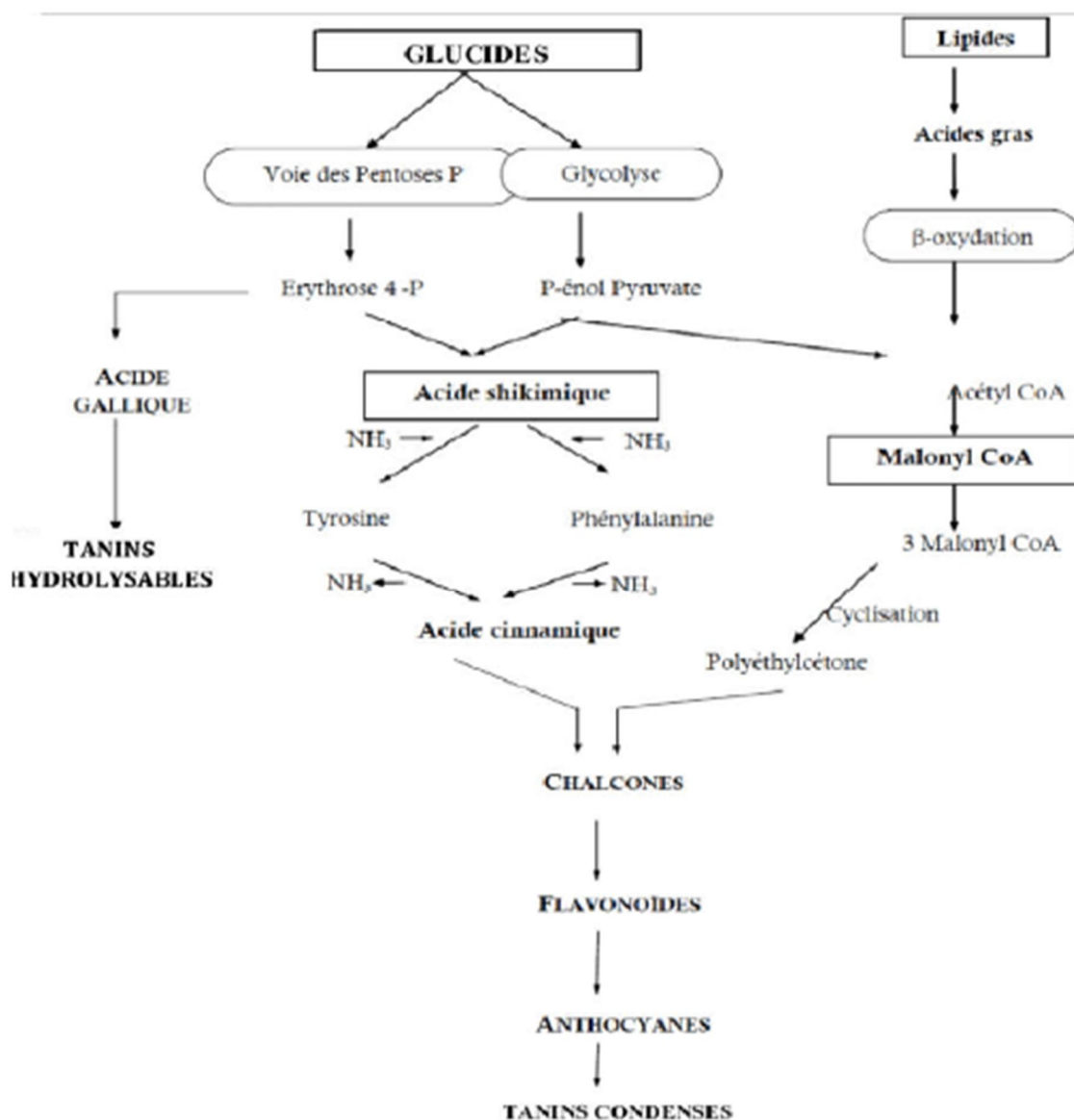


Figure 01 : Biosynthèse des composés phénoliques (Akroum, 2011).

### I- 3- Les classes principales des polyphénols :

#### I-3-1- Les acides phénoliques :

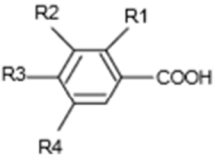
Les acides phénoliques sont des substances phytochimiques ayant au moins un groupe carboxyle et un groupe hydroxy-phénolique (Chanforan, 2010). Ils sont nécessaires pour les fonctions normales des plantes, où ils jouent un rôle important dans la résistance des plantes aux agents pathogènes et les herbivores, la croissance des plantes, la couleur et les caractéristiques organoleptiques des plantes et la prévention du stress oxydatif (Kawsar et al., 2008 ; Challacombe et al., 2012). Ces composés existent principalement sous forme d'acides hydroxybenzoïques et d'acides hydroxycinnamiques qui peuvent se produire soit sous leur forme libre ou conjuguée (Martins et al., 2011 ; Garrido et Borges, 2013).

**I-3-1-1- Les acides hydroxybenzoïques :**

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque, et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les hydroxybenzoïques incluent plusieurs molécules et les plus fréquentes sont ; L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoïque.

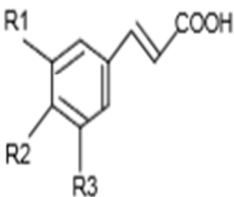
**Tableau 1 : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).**

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

**I-3-1-2- Les acides hydroxycinnamiques :**

Ils dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, induisent une réactivité chimique importante de ces molécules, par exemple on cite l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide sinapique (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

**Tableau 2 : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).**

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	OH	OCH3	Acide sinapique

**I-3-2- Les flavonoïdes :**

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005). Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbone (figure 2) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (Tapas et al., 2008).

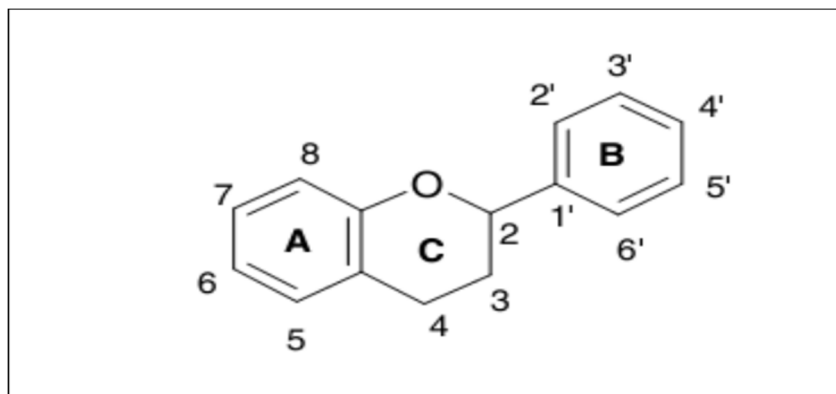


Figure 2 : Structure chimique générale des flavonoïdes (Kumar et Pandey, 2013).

**I-3-2-1-Classification des flavonoïdes :**

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

**A- 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. 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 (Fraga, 2009).

Tableau 3 : Les principales flavones (Heim et al., 2002).

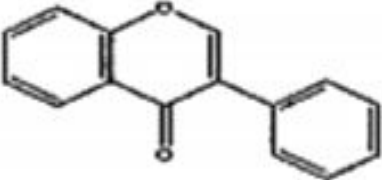
Classe	Structure générale	Flavonoïde	Substituant
Flavone		chrysine apigénine rutine lutéoline	5,7-OH 5, 7, 4'-OH 5, 7, 3', 4'-OH, 3-rutino 5, 7, 3', 4'-OH



**B- Les isoflavones :**

Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoides (**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. Elles ont une distribution très limitée dans le règne végétal (**Fraga, 2009**).

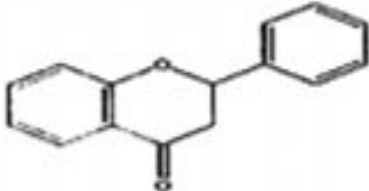
**Tableau 4 :** Les principales isoflavones (**Heim et al., 2002**).

Classe	Structure générale	Flavonoïde	Substituant
Isoflavone		genistine genisteine daidzine daidzeine	5, 4'-OH, 7-glucose 5, 7, 4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7, 4'-OH

**C- 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. Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée (**Portet, 2007**).

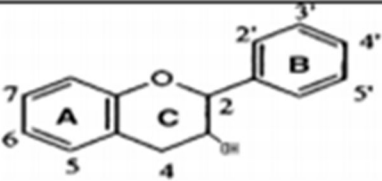
**Tableau 5 :** Les principales flavanones (**Heim et al., 2002**).

Classe	Structure générale	Flavonoïde	Substituant
Flavanone (dihydroflavone)		naringene naringenine taxifoline	5,4'OH,7rhamnoglucose 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH

**D- Les flavanols :**

Les flavanols sont toujours hydroxylés en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Ils sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondant dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins, ... etc (**Fraga, 2009**).

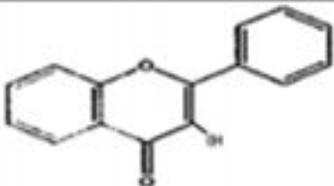
**Tableau 6 :** Les principaux flavanols (**Heim et al., 2002**).

Classe	Structure générale	Flavonoïde	Substituant
Flavanol		catéchine epicatéchine	3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3',4'-OH

**E- Les flavonols :**

Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3. Ils sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, ils sont essentiellement représentés par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjuguée glycosylée (Fraga, 2009).

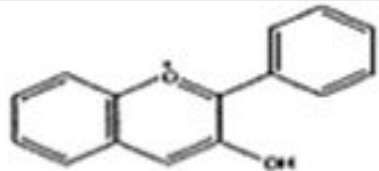
**Tableau 7 :** Les principaux flavonols (Heim et al., 2002).

Classe	Structure générale	Flavonoïde	Substituant
Flavonole		kaempférol quercétine myricétine tamarixétine	3, 5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4'-OH 3, 5, 7, 3', 4', 5'-OH 3, 5, 7, 3'-OH, 4-OMe

**F- Les anthocyanines :**

Les anthocyanines sont des composés phénoliques d'origine naturelle responsable de couleur de nombreuses fleurs, fruits et baies. Ils sont glycosylés, polyhydroxylés et ont une large distribution dans le règne végétal (Longo et al., 2005 ; Currie et al., 2006 ; Qin et al., 2010). L'intérêt pour ce type de pigment à augmenter essentiellement en raison de leur possible utilisation comme colorant naturel. A cause de leur hydrosolubilité (les anthocyanes sont le plus grand groupe de pigments solubles dans l'eau), ils peuvent être en effets bénéfiques pour la santé comme agents anti-inflammatoires (Longo et al., 2005) et agents antioxydants (Ghosh et Konishi, 2007).

**Tableau 8 :** Les principaux anthocyanines (Heim et al., 2002).

Classe	Structure générale	Flavonoïde	Substituant
Anthocyanidines		apigénidine cyanidine	5, 7, 4'-OH 3, 5, 7, 4'-OH, 3, 5-OMe

**I-3-3- Les tanins :**

Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Les tanins sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et à de nombreux éléments minéraux (Alkurd, 2008).

Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toute les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991).

On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique :

### I-3-3-1- Les tanins hydrolysables :

Ces tanins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosyle. Ils sont divisés en ellagitanins et en gallotanins. Ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent aussi sous l'action enzymatique et de l'eau chaude (Conrad *et al.*, 1998).

### I-3-3-2- Les tanins condensés (proanthocyanidines) :

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tanins condensés sont des polyphénols de masse molaire élevées. 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 pro anthocyanidines 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 (Wollgast *et al.*, 2000 ; Dykes et Rooney, 2006). Ils jouent un rôle dans la protection contre les rayons ultraviolets, la sécheresse et contre les prédateurs naturels (insectes et herbivores) (Aufreere *et al.*, 2012).

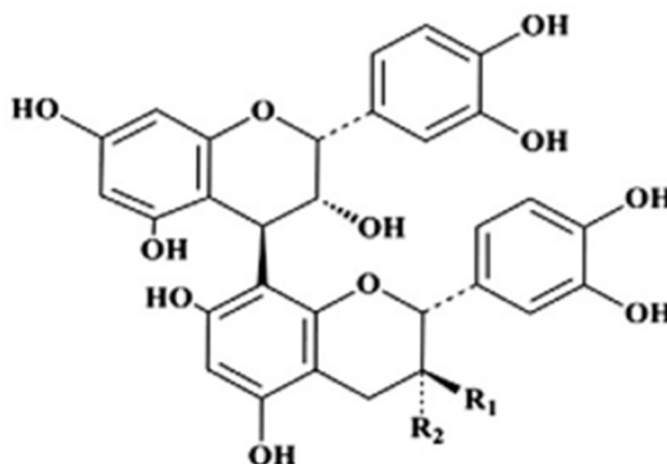


Figure 3 : Exemple d'unité structurale de base des tanins condensés (Garrido et Borges, 2013).

### I-3-4- Les coumarines :

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (Iwueke, 2008).

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyyles, superoxydes et peroxydes (Madhavi, 1996).

### **I-3-5- Les stilbènes :**

Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C2-C6 comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (**Crozier et al., 2006**).

Les stilbènes agissent comme agents protecteur naturels pour défendre la plante contre les attaques virales et microbiennes et l'exposition aux ultraviolets excessive (**Roupe et al., 2006**).

### **I-3-6- Les lignines :**

Ce sont les composants majeurs de la paroi cellulaire. Les lignines (du latin lignum, bois) sont les polymères les plus abondants après la cellulose (forme la paroi végétale) (**Ralston et al., 2005**). Ils forment une structure hétérogène et agissent à la fois sur le maintien de l'intégrité structurale de la paroi cellulaire, ainsi qu'un échafaudage pour les polysaccharides.

Les polysaccharides augmentent le caractère hydrophobe de la structure de la lignine, ce qui facilite le transport de l'eau dans les tissus, en empêchant l'absorption d'eau. Cette structure hydrophobe est cruciale pour l'action capillaire, ce qui permet à l'eau de passer à travers les capillaires de lignine doublé sans être absorber dans la cellule végétale (**Holderness et al., 2008**).

## **Chapitre II :**

# **Les radicaux libres, le stress oxydant et les antioxydants**

## II- LES RADICAUX LIBRES, LE STRESS OXYDANT ET LES ANTIOXYDANTS :

### II-1- Les radicaux libres :

Les radicaux libres sont connus dans la chimie depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle. Ils ont été initialement utilisés pour décrire des composés intermédiaires en chimie organique et inorganique (Rochette et al., 2013). Ce sont des molécules ou fragment de molécules très réactives, puisqu'ils contiennent des électrons non appariés dans leur orbite extérieure (Penna et al., 2009), ils cherchent donc à atteindre un état stable en s'appropriant les électrons des molécules proches qui à leur tour deviennent instables (Capasso, 2013). Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour des radicaux libres et initient ainsi une chaîne de réaction (Lev et al., 2007). Un radical libre est le plus souvent instable ayant une durée de vie très courte (de l'ordre d'une micro à une nanoseconde (benaissa, 2012)).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et le radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $NO^{\cdot}$ . D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

#### II-1-1- Espèces réactives de l'oxygène (ERO) :

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant : les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent. Leurs constantes de vitesse réactionnelle sont très élevées (Delattre et al., 2005).

**Tableau 9** : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Bartosch, 2003).

Nom	Symbole
<b>Espèces radicalaires</b>	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\cdot}$
<b>Espèces non radicalaires</b>	
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	$^1O_2$
Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot-}$

### **II-1-1-1- Les espèces oxygénées radicalaires :**

#### **A- Radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) :**

Le radical superoxyde est l'espèce réactive la plus fréquente dans l'organisme (Sayre et al., 2005), elle est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène.

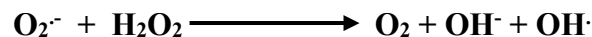
Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome C ( $Fe^{3+}$ ), l'ascorbate et surtout le superoxyde dismutase (Hennebelle, 2006).

#### **B- Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) :**

Le radical hydroxyle est un des oxydants les plus réactifs du système biologique, toutefois, sa courte demi vie (10-9 secondes) en réduit considérablement sa potentialité (Sayre et al., 2005; Goto et al., 2008). Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) est formé principalement par la dégradation de l' $H_2O_2$  en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi l' $H_2O_2$  associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton.



L' $H_2O_2$  peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production du  $OH^{\cdot}$ , ce mécanisme réactionnel est appelé réaction d'Haber et Weiss (Sorg, 2004).



D'autres voies de formation du  $OH^{\cdot}$  sont : la décomposition de l'acide peroxonitrique et la réaction de l'acide hypochloreux avec  $O_2^{\cdot-}$  (Bartosz, 2003).

### **II-1-1-2- Les espèces oxygénées non radicalaires :**

#### **A- Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) :**

Le peroxyde d'hydrogène est obtenu à partir de l'anion superoxyde par dismutation spontanée ou par l'enzyme superoxyde dismutase (Deby et al., 2007).

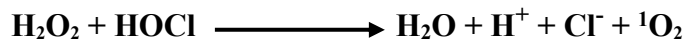
L' $H_2O_2$  est métabolisé par le glutathion peroxydase et la catalase. S'il existe une modification de ces enzymes antioxydantes, on peut observer l'arrivée d'un stress oxydatif (Afonso et al., 2007).

L' $H_2O_2$  n'est pas un radical au sens propre mais permet la formation du radical hydroxyle en présence de métaux de transition (réactions de Fenton et d'Haber-Weiss). Le radical hydroxyle est très toxique car il est très réactif et présente une grande probabilité de réagir à proximité immédiate de son lieu de production (Belkheiri, 2010).

**B- L'oxygène singulier ( $^1\text{O}_2$ ) :**

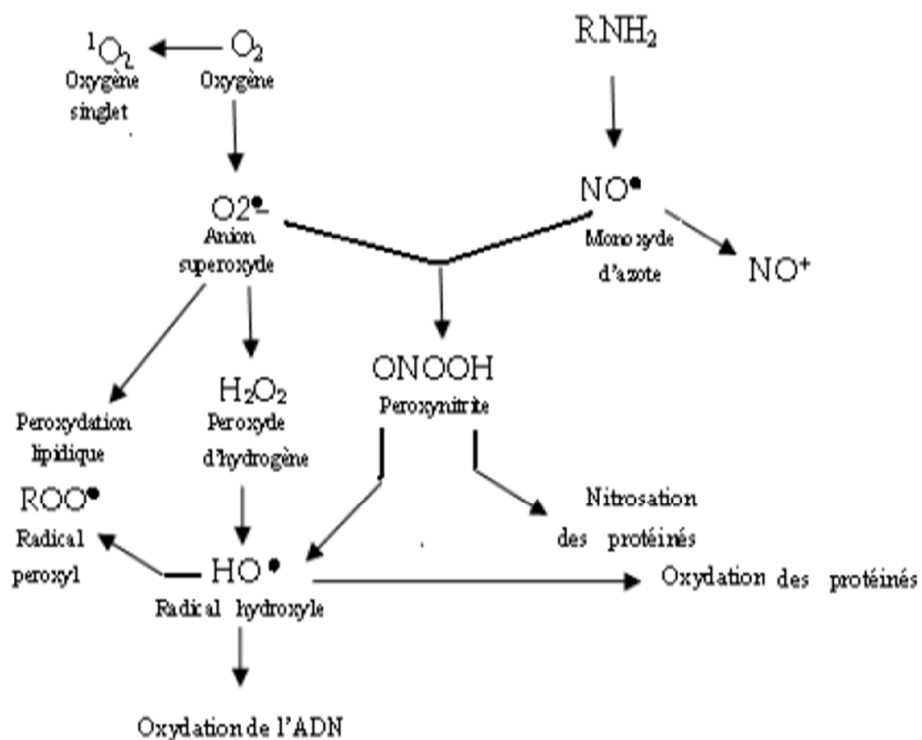
L'oxygène singulier n'est qu'une forme activée de l'oxygène (Favier, 2003). Il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipooxygénase, par la réaction entre divers EOR ou en présence de la lumière, d'oxygène et de photosensibilisateur comme la porphyrine, tel est le cas de la porphyrie erythropoétique-congénitale (Sorg, 2004).

Il se forme probablement au cours de l'attaque du peroxyde d'hydrogène par la myéloperoxydase qui est une enzyme hémique présente en concentrations importantes ( $\pm 5\%$  en poids) dans les granules primaires des cellules polymorphonucléaires neutrophiles, durant la phagocytose. (Par réaction du peroxyde d'hydrogène avec l'acide hypochloreux (HOCl) (Belkheiri, 2010).



**II-1-2- Espèces réactives azotées (ERN) :**

Les espèces réactives azotées ERN ont été définies comme un sous-groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO) (figure 4) comme le radical monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ), l'anion peroxydite ( $\text{ONOO}^-$ ) et le radical dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ) (Simon et al., 2000).



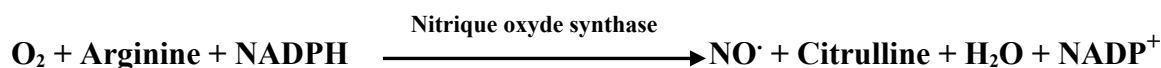
**Figure 4 :** Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote intervenant dans le phénomène du stress oxydant (Favier, 1997).



### **II-1-2-1- Espèce radicalaire azotées :**

#### **A- Le monoxyde d'azote (NO·) :**

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) (Sorg, 2004) selon la réaction suivante :



Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans la neurotransmission, régulation de la pression sanguine, mécanisme de défense, relaxation des muscles lisses, régulation immunitaire (Valko et al., 2007). Mais à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le O<sub>2</sub><sup>-</sup> pour former un puissant oxydant le peroxyde d'azote (ONOO·) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO<sub>2</sub> et le OH· (Densiov et Afanas'ev, 2005).

#### **B- Espèce non radicalaire azotées :**

Caractérisé par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) (2 NO· + O<sub>2</sub> → 2NO<sub>2</sub>), lequel peut donner du trioxyde d'azote (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (NO· + NO<sub>2</sub> → N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O → 2 NO<sub>2</sub> + 2H<sup>+</sup>). De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>) (NO· + O<sub>2</sub><sup>-</sup> → ONOO<sup>-</sup>), moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) (Rezaire, 2012).

### **II-2-Principales sources des espèces réactives d'oxygène :**

#### **II-2-1-Les Sources endogènes :**

##### **II-2-1-1- La mitochondrie :**

La mitochondrie est la source majeure de la production cellulaire de l'anion superoxyde, principalement due à la réduction partielle de NADH déshydrogénase et à la réduction partielle de l'ubiquinone/ubisemiquinone /ubiquinol par le complexe I et III respectivement (Roede et Jones, 2010). Durant la respiration, quatre électrons sont ajoutés à l'oxygène par le complexe IV de la chaîne respiratoire, cependant l'oxygène peut être réduit en formant des espèces réactives de l'oxygène telles que O<sub>2</sub><sup>-</sup> et OH·. La production de ces espèces réactives est nettement accélérée lors de la réduction du flux respiratoire notamment au cours de maladies génétiques (Lacolley, 2007).

Les ERO libérés par les mitochondries peuvent être balayés par les systèmes antioxydants cellulaires ou causer des dommages oxydatifs des acides gras polyinsaturés dans les membranes biologiques, des protéines et des acides nucléiques (Venditti et al., 2013).

#### **II-2-1-2- Le réticulum endoplasmique :**

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'endroit où les protéines se replient et se rassemblent dans des complexes dans la voie de production des protéines et c'est un site de production des ERO dans les cellules (Donaghy et al., 2015). Les systèmes enzymatiques réticulaires P450 représentent une source significative des ERO dans laquelle les électrons sont transférés du NADPH par l'intermédiaire de la NADPH-cytochrome P450 réductase (Manoj et al., 2010).

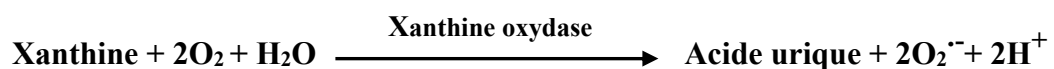
#### **II-2-1-3- NADPH oxydase :**

La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase) est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction mono-électronique de l'oxygène en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons entraînant la formation des radicaux superoxydes selon la réaction suivante (Bedard et Krause, 2007 ; Maghzal et al., 2012) :



#### **II-2-1-4- Xanthine oxydase :**

Le système enzymatique Xanthine/Xanthine oxydase intervient aussi dans la production du superoxyde au cours de l'oxydation de la Xanthine en acide urique selon la réaction suivante (Bartosz, 2003) :



#### **II-2-2- Les sources exogènes :**

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme. Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérigènes non-génotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes ...).

Les rayonnements UV induisent la synthèse de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  l'intermédiaire d'agents photosensibilisants (Sumaya Martinez, 2004).

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ) sont présents dans notre mode de vie tel que le tabagisme, les radiations ionisantes, les champs électriques et les polluants industriels (Mena et al., 2009).

Certains métaux (chrome, cuivre, fer, vanadium) génèrent des radicaux hydroxyles très réactifs. Les polluants de l'air, comme le goudron, la fumée des cigarettes et les contaminants

industriels (Amiante, silice) (Koren, 1995). D'autres toxiques agissent par transfert d'électrons, tels que le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) dont la toxicité s'exerce par l'intermédiaire du radical CCl<sub>3</sub> (Kanter et al., 2003).

### **II-3- Le stress oxydant :**

#### **II-3-1- Définition :**

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et les pro-oxydants (Meda et al., 2013), que ce soit par un déficit dans les mécanismes de défense comprenant des composés et des enzymes antioxydantes (Albayrak et al., 2013) ou une surproduction des radicaux libres (Duran- bedolla et al., 2013).

Un état de stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes se présente (Abidi et Nahal, 2016) :

- ✓ Défenses insuffisantes (endogènes et exogènes) ;
- ✓ Excès des ERO, de N<sub>2</sub> ou de Cl<sub>2</sub> ;
- ✓ Mécanismes de réparation insuffisants.

Evaluer le stress oxydant chez un individu consiste donc à estimer la production d'oxydants, à évaluer les mécanismes de défense et à analyser les produits secondaires qui peuvent en résulter (Morena et al., 2002).

#### **II-3-2- Effets sur l'organisme du stress oxydant :**

##### **II-3-2-1- Effet moléculaire :**

###### **A- Effet biochimique :**

Il s'agit des modifications des macromolécules cellulaires comme les lipides, les membranes, les protéines et les acides nucléiques. Ces altérations peuvent modifier les fonctions des cellules et conduire à la mort cellulaire (Ma et al., 2013).

- **L'action sur l'ADN :**

L'ADN est constamment attaqué par des espèces réactives qui peuvent affecter sévèrement sa structure et sa fonction. Les modifications structurales de l'ADN résultent essentiellement à des modifications de ses bases, la coupure des brins d'ADN et l'altération de nombreuses protéines qui sont en contact avec l'ADN (Jena, 2012). Ces modifications peuvent conduire à des mutations génétiques affectant les oncogènes et les gènes suppresseurs des tumeurs (Borrego et al., 2013).

La guanine, par exemple, peut réagir avec OH<sup>•</sup> pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OdG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine,

entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Haleng et al., 2007).

- **Action sur les lipides :**

Le stress oxydatif cause la peroxydation lipidique dans les membranes cellulaires quand les radicaux libres réagissent avec les constituants membranaires essentiellement les acides gras polyinsaturés et les LDL. Les interactions entre les ERO et les lipides se déroulent en trois étapes: l'initiation, la propagation et la terminations (Ahmed et al., 2013).

La peroxydation des lipides implique la destruction des lipides membranaires, des troubles métaboliques et inflammatoires, la formation et la propagation des radicaux lipidiques avec de nombreux effets délétères (Zhao et al., 2013) comme le malondialdéhyde (MDA) qui est un produit caractéristique de ce processus (Rofi et al., 2013).

- **Action sur les protéines :**

Les protéines sont facilement attaquées par les ERO et les ERN (Xiang et al., 2013), leur oxydation est définie comme une modification induite soit directement par les interactions avec les radicaux libres ou indirectement par la réaction avec des sous-produits secondaires du stress oxydatif. Les dommages protéiques causés par les radicaux libres impliquent plusieurs réactions chimiques comme l'oxydation des chaînes latérales d'acide aminé, fragmentation des chaînes de polypeptides et les changements de conformation des protéines. Ces modifications peuvent conduire à diverses conséquences fonctionnelles telles que l'inhibition des activités enzymatiques, une susceptibilité accrue à l'agglomération et la protéolyse, l'augmentation ou la diminution de l'absorption cellulaire (Shacter, 2000 ; Kuka et al., 2012).

- **Action sur les glucides :**

Le radical OH<sup>•</sup> est capable de couper les molécules de sucres (désoxyribose, mannose, glucose) et de susciter ainsi des liaisons entre sucres et protéines provoquant des épaissements membranaires. La cataracte diabétique serait une conséquence de cette liaison. Les radicaux libres de l'oxygène provoquent aussi une fragmentation des polymères de glucides comme l'acide hyaluéonique. L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane constitué de répétitions d'unités d'acide glucuronique-N-ace- tylglucosamine (Pasquier, 1995).

### **B- Effet biologique :**

Elles sont extrêmement variables selon la concentration des ERO :

- ✓ Des légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines.
- ✓ Des stress moyens faciliteront l'apoptose.
- ✓ Des forts stress provoqueront une nécrose.



contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire (Goudable et Favier, 1997).

#### II-4-2- Mécanisme d'action des antioxydants :

Les antioxydants peuvent protéger l'organisme contre les effets néfastes des espèces réactives comme suit :

- ✓ Inhibition de la formation des radicaux libres ;
- ✓ Neutralisation des radicaux libres ;
- ✓ Augmentation du système de défense du corps ;
- ✓ Réparation des dommages résultants de radicaux libres (Lamina et al., 2013 ; Liochev, 2013).

#### II-4-3- Le système de défense antioxydant :

Il existe deux classes d'antioxydants : les endogènes et les exogènes. Les antioxydants endogènes sont principalement les enzymes superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase. La deuxième partie permet d'appréhender les antioxydants exogènes qui sont, par définition, apportés de l'extérieur par exemple par l'alimentation (Belkheiri, 2010).

##### II-4-3-1- Le système antioxydant endogène :

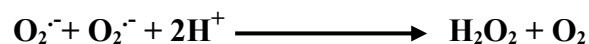
La défense endogène est caractérisée par deux systèmes différents : le système enzymatique et le système non enzymatique.

##### A- Le système enzymatique :

Les systèmes enzymatiques sont au nombre de trois et ils fonctionnent en complémentarité.

##### • Les superoxydes dismutases (SOD) :

Les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes (ce sont des enzymes utilisant des métaux comme cofacteurs). Il s'agit d'une des premières lignes de défense contre les ERO. Leur cible privilégiée est l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) qu'elle transforme en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Belkheiri, 2010).



Il existe trois types de SOD à savoir, la Cu/Zn-SOD cytosolique, la Mn-SOD mitochondriale et la Cu/Zn-SOD extracellulaire (Zelko et al., 2002). Ces trois types diffèrent par la nature du métal du site actif, la composition en acides aminés, les cofacteurs et d'autres caractéristiques (Rahman, 2007). L'activité antioxydante des SOD est incomplète, car en éliminant l'anion superoxyde, elle produit du peroxyde d'hydrogène (Baudin, 2006).

Le peroxyde d'hydrogène formé peut être à son tour éliminé par deux autres enzymes : la catalase et la glutathion peroxydase (Zerarghi, 2015).

- **La catalase (CAT) :**

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes (Ratnam *et al.*, 2006). Elle se produit en abondance dans le corps, avec la plus grande activité dans le foie, suivi par les érythrocytes, puis les poumons (Zerarghi, 2015). Elle catalyse la réaction de détoxification de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (généralement produit par la SOD). Elle est surtout présente au niveau des globules rouges et des hépatocytes (Ratnam *et al.*, 2006).



- **La glutathion peroxydase (GPx) :**

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélélocystéine (dans laquelle l'oxygène du groupement hydroxyle de la sérine est remplacé par le sélénium). La glutathion peroxydase est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries (Chaudière, 1983).

La GPx utilise le glutathion comme un donneur de proton (H<sup>+</sup>), et le GSH sera oxydé en glutathion oxydé (GSSG). La régénération du GSH est catalysée par la glutathion réductase (GR) (Serdar *et al.*, 2006).

La GPX catalyse la réduction d'une variété d'hydroperoxydes organiques (ROOH) ou inorganique (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en utilisant le glutathion (Matés, 2000) :



### **B- Système non enzymatique :**

Ce système comprend plusieurs molécules tels que le glutathion, l'acide urique et les protéines de stockage des métaux de transition (ferritine, transferrine, lactoferrine, céruloplasmine) (Savini *et al.*, 2013).

- **Le glutathion (GSH) :**

Le glutathion est un tripeptide, composé de glutamate, de glycine et de cystéine, cette dernière lui apporte le groupement soufré caractérisant cette molécule (Gardès-Albert *et al.*, 2003). Le glutathion réduit (GSH) est généré à partir de glutathion oxydé (GSSG) par la glutathion réductase en présence de NADPH (Baudin, 2006). Le GSH élimine directement les ERO ou intervient comme cofacteur dans réactions catalytiques de la glutathion peroxydase (Baudin, 2006; Houée-Levin *et al.*, 2005), et il régénère également les principaux antioxydants tels que la vitamine C et la vitamine E (Houée-Levin *et al.*, 2005).

- **L'acide urique :**

L'acide urique est l'un des meilleurs antioxydants du plasma, il couvre 35-60% de la capacité antioxydante totale (Johnson et al., 2009). L'acide urique est un piègeur de  $^1O_2$ , des radicaux peroxydes et hydroxydes ( $RO_2^{\cdot}$  et  $HO^{\cdot}$ ) et de HClO. La réaction de l'acide urique avec ces EOR génère des radicaux moins réactifs que  $HO^{\cdot}$  (Belkheiri, 2010). L'acide urique peut être oxydé en différents produits dont le prédominant est l'allantoïne qui augmente également dans les muscles en cas d'effort (Hellsten et al., 2001), puis régénéré par la vitamine C (Vasconcelos et al., 2007).

- **Les protéines de stockage de métaux de transition :**

Les protéines telles que la ferritine et la céruléoplasmine jouent un rôle important dans le système de défense antioxydant comme agents chélateurs de métaux de transitions libres (fer, cuivre) en les rendant inactifs à la formation des ERO (Curtay et Robin, 2000 ; Pincemail et al., 2002).

#### **II-4-3-2- Le système antioxydant exogène :**

Les antioxydants naturels comme la vitamine C et E, les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement considérés comme des composants bénéfiques. Leurs propriétés antioxydantes sont souvent prétendu être responsables des effets protecteurs de ces composants alimentaires contre les maladies cardiovasculaires, le cancer et le vieillissement (Poljsak et Milisav, 2013).

##### **A- La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) :**

La vitamine E est le terme générique utilisé pour décrire la famille des huit antioxydants liposolubles avec deux types de structures ; les tocophérols ( $\alpha$ -tocophérol,  $\beta$ -tocophérol,  $\gamma$ -tocophérol et  $\delta$ -tocophérols) et tocotriénols ( $\alpha$ -tocotriénol,  $\beta$ -tocotriénol,  $\gamma$ -tocotriénol,  $\delta$ -tocotriénol) (Liu, 2007).

L' $\alpha$ -tocophérol est la forme la plus abondante dans la nature et la plus active (Berset, 2006), son caractère liposoluble lui confère une possibilité de s'insérer entre les acides gras des phospholipides constituant les membranes et les lipoprotéines et de les protéger des radicaux libres (Gardès-Albert et al., 2003).

##### **B- La vitamine C (L'acide ascorbique) :**

La vitamine C est considérée comme le plus important antioxydant hydrophile étant efficace dans le piégeage des anions superoxydes, les radicaux hydroxydes, le peroxyde d'hydrogène, les espèces réactives de l'azote et l'oxygène singulet (Du et al., 2012 ; Oroian et Escriche, 2015). Elle intervient également dans la régénération de la vitamine E (Gardès-Albert et



*al.*, 2003). Elle protège également les phospholipides membranaires des dommages peroxydantes (Pisoschi et Pop, 2015).

### **C- Les caroténoïdes :**

Les principaux caroténoïdes présents dans le régime alimentaire quotidien sont : les carotènes ( $\alpha$ -carotène,  $\beta$ -carotène, lycopène) et les hydroxy-caroténoïdes (xanthophylles zéaxanthine, lutéine).

Les caroténoïdes sont importants non seulement pour leur activité de provitamine A, mais également pour d'autres actions dans les systèmes biologiques y compris leurs propriétés antioxydantes (Nowicka et Kruk, 2012). Elles sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles OH $\cdot$  et peroxyles RO $\cdot$ . Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. Les caroténoïdes peuvent aussi capter l'oxygène singulet, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

### **D- Les polyphénols :**

Au-delà de 8000 structures phénoliques ont été signalés et ils sont largement dispersés dans tout le règne végétal et donc dans l'alimentation humaine (Oroian et Escriche, 2015). Les polyphénols peuvent fournir une protection significative contre le stress oxydatif *in-vitro* à des concentrations beaucoup plus faibles que ce qui serait nécessaire pour une protection antioxydante chimique (Weichselbaum et Buttriss, 2010). Ils peuvent exercer un effet antioxydant indirect, en protégeant les enzymes antioxydantes endogènes dans le corps humain (Pradeep et Sreerama, 2015).

### **E- Les oligoéléments :**

Les oligo-éléments sont des cofacteurs enzymatiques impliqués dans toutes les grandes voies métaboliques, notamment dans la protection contre les espèces radicalaires.

- **Le sélénium :**

C'est un oligoélément essentiel, son importance chez l'homme est bien établie, et son déficit a causé de graves effets sur la santé (Tinggi, 2008).

- **Le zinc :**

Le rôle du zinc dans le système de défense d'antioxydant a été largement examiné. Car il agit comme un régulateur pour plus de 200 enzymes, c'est un cofacteur pour les SOD. Donc ce minéral protège les cellules contre des dégâts oxydatifs (Marreiro et *al.*, 2017).

- **Le cuivre :**

A concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement des

réactions de production des ROS (réactions de Fenton), et peut lorsque sa concentration est élevée devenir pro - oxydant (Haleng et *al.*, 2007).

**F- Coenzyme Q10 (CoQ10) :**

Le coenzyme Q10 est un antioxydant puissant qui confère la résistance aux dommages mitochondriaux provoqués par les ROS ou RNS et qui peut supprimer la production de substances pro-inflammatoires, tel que l'expression du gène codant le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) et la production des cytokines pro-inflammatoires (Maes et *al.*, 2011).

## **Chapitre III :**

# **L'activité antioxydante des polyphénols**

### III- L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES POLYPHENOLS :

Les composés phénoliques ont reçu beaucoup d'attention pour leurs propriétés antioxydantes efficaces et leurs effets bénéfiques. Ces antioxydants naturels ont la capacité d'améliorer la qualité et la stabilité des aliments et peuvent également agir comme nutraceutiques de mettre fin à des réactions en chaîne des radicaux libres dans les systèmes biologiques. Donc ils peuvent offrir des avantages supplémentaires pour la santé humaine et aider à réduire le risque de nombreuses pathologies (Zhao et al., 2014).

L'effet protecteur global des polyphénols est principalement dû à leur large gamme d'actions biologiques, tels que les capacités de piégeage des radicaux libres, de chélation des métaux et de modulation des enzymes (Rodrigo et al., 2011).

#### III-1- Activité antioxydante des polyphénols dans les aliments :

L'auto-oxydation (oxydation non enzymatique par O<sub>2</sub>) est un des principaux phénomènes de dégradation des lipides polyinsaturés présents dans divers produits alimentaires (Khan et al., 2017). Ce phénomène intervient typiquement au cours des traitements industriels et domestiques : procédés thermiques, conditionnement, stockage et cuisson. Globalement, ce processus conduit à la formation des produits lipidiques oxydés (aldéhydes, époxydes, hydroperoxydes) qui à leur tour, réagissent avec d'autres ingrédients alimentaires (vitamines, protéines et autres lipides) en diminuant :

- *Les propriétés organoleptiques des aliments* : Apparition de saveurs et odeurs désagréables rendant les aliments difficilement acceptables par le consommateur ;
- *La valeur nutritionnelle des aliments* : Les acides gras polyinsaturés sont essentiels à la composition des membranes cellulaires et pourraient exercer une action protectrice contre le développement des maladies cardiovasculaires. Par contre, certains de leurs produits d'oxydation sont oxydants et/ou électrophiles donc potentiellement toxiques.

L'oxydation des acides gras polyinsaturés des aliments peut intervenir dès le digestif, c'est-à-dire immédiatement après ingestion des aliments. Le compartiment gastrique, en raison de son acidité, de sa teneur en dioxygène et de la présence éventuelle de fer héminique d'origine alimentaire (Exp ; la viande rouge) est un site où l'oxydation des acides gras polyinsaturés peut être rapide (Sánchez-Alonso et al., 2007).

Une voie pour inhiber les évolutions oxydatives des lipides consiste à ajouter aux préparations alimentaires des antioxydants capables de piéger rapidement les radicaux peroxydes lipidiques propagateurs des chaînes radicalaires et/ou les espèces initiatrices de l'oxydation (Yilmaz, 2006 ; Schepens et al., 2006). De ce point de vue, les antioxydants naturellement présents

dans les plantes d'intérêt alimentaire, voire certains de leurs dérivés amphiphiles, présentent un grand intérêt, notamment depuis la mise en évidence de problèmes d'allergie alimentaire induits par certains additifs d'origine synthétique (Ha et al., 2004). Par exemple, le propylgallate, l'octylgallate a été testé pour l'inhibition de la lipoxygénase-1 du soja et inhibé la peroxydation lipidique autoxydante (Ha et al., 2004) et le dodecylgallate (Kubo et al., 2002).

Le pouvoir antioxydant des polyphénols peut s'exprimer à deux niveaux :

- *Soit dans l'aliment* : En protégeant les lipides alimentaires de l'oxydation avant leur ingestion.
- *Soit après ingestion* : En protégeant les lipides alimentaires lors du tractus gastro-intestinal, ou en limitant les phénomènes associés au stress oxydatif (oxydation des LDL, des membranes cellulaires...) (Dupas, 2009).

### **III-2- Pouvoir antioxydant des polyphénols chez les Humains :**

Les effets des polyphénols sur la santé sont indissociables de la notion de biodisponibilité, qui intègre un grand nombre de paramètres comme : l'absorption intestinale, l'excrétion des métabolites dans la lumière intestinale, le métabolisme par la microflore, le métabolisme intestinal et hépatique, les propriétés des métabolites circulants (structures, cinétiques d'apparition et d'élimination, liaison au sérum-albumine et autres protéines du plasma), la captation cellulaire, le métabolisme dans les tissus cibles, la sécrétion biliaire et l'excrétion urinaire.

#### **III-2-1- Biodisponibilité des polyphénols :**

La biodisponibilité de chaque polyphénol diffère, mais il n'y a pas de relation entre la quantité de polyphénols dans les aliments et leur biodisponibilité dans le corps humain (Pandey et Rizvi, 2009). Les principales données de la biodisponibilité des polyphénols de l'alimentation sont résumées comme suit :

##### **III-2-1-1- Absorption :**

###### **A- Absorption au sein de l'estomac :**

Seuls les anthocyanes et quelques acides hydroxycinnamiques sous forme liée tels que l'acide chlorogénique peuvent être absorbés directement à partir de l'estomac (Manach et al., 2005).

###### **B- Absorption à partir de l'intestin grêle :**

Les aglycones et les O- $\beta$ -D-glucosides peuvent être notablement absorbés dans le petit intestin, les premiers par diffusion passive, les seconds selon deux mécanismes: une absorption directe des glucosides *via* le transporteur de glucose sodium-dépendant, suivie par une hydrolyse des glucosides dans le cytosol par une  $\beta$ -glucosidase cytosolique, ou en impliquant la lactase phloridzine hydrolase, une glucosidase de la bordure en brosse de l'intestin qui catalyse l'hydrolyse

extracellulaire des glucosides, suivi par l'absorption de l'aglycone ainsi libéré par diffusion passive (Almeida *et al.*, 2018).

### **C- Absorption à partir du côlon :**

Les polyphénols non absorbés au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle atteignent le côlon, puis sont catabolisés par la microflore colique, ayant des activités enzymatiques diverses, avant d'être absorbés. En particulier, la rutine, un flavonol commun de l'alimentation (quercétine(3-O-β-D-(L-rhamnosyl-α-1,6-D-glucoside)), doit être hydrolysée par les enzymes bactériennes avant d'être absorbée au niveau du côlon et atteindre la circulation sanguine sous forme de conjugués de quercétine avec un retard notable par rapport aux cas des glucosides de quercétine (abondants dans l'oignon), absorbés dès le petit intestin. D'une manière générale, le catabolisme de la microflore colique peut produire des métabolites biodisponibles, en concentration de l'ordre de 1mM, comme l'acide benzoïque, l'acide phénylacétique et l'acide phénylpropionique (Williamson et Clifford, 2010).

### **III-2-1-2- La conjugaison :**

Au cours de l'absorption, les polyphénols subissent d'importantes modifications ; en fait, ils sont conjugués dans les cellules intestinales et plus tard dans le foie par méthylation, sulfatation et/ou glucuronidation (Day et Williamson, 2001). En conséquence, les formes atteignant le sang et les tissus sont différentes de celles présentes dans les aliments et il est très difficile d'identifier tous les métabolites et d'évaluer leurs activités biologiques (Setchell *et al.*, 2003). Il est important de noter que c'est la structure chimique des polyphénols et non sa concentration qui détermine le taux et l'étendue de l'absorption et la nature des métabolites circulant dans le plasma. Les polyphénols les plus courants dans notre alimentation ne sont pas nécessairement ceux qui présentent la plus forte concentration de métabolites actifs dans les tissus cibles ; par conséquent, les propriétés biologiques des polyphénols diffèrent considérablement d'un polyphénol à l'autre. La preuve, bien qu'indirecte, de leur absorption à travers la barrière intestinale est donnée par l'augmentation de la capacité antioxydante du plasma après la consommation d'aliments riches en polyphénols (Duthie *et al.*, 1998 ; Young *et al.*, 1999).

Les polyphénols diffèrent également par leur site d'absorption chez l'homme. Certains des polyphénols sont bien absorbés dans le tractus gastro-intestinal tandis que d'autres dans l'intestin ou une autre partie du tube digestif. Dans les aliments, tous les flavonoïdes, à l'exception des flavanols, existent sous formes glycosylées. Le sort des glycosides dans l'estomac n'est pas encore clair (Pandey et Rizvi, 2009). La plupart des glycosides résistent probablement à l'hydrolyse acide dans l'estomac et arrivent ainsi intacts dans l'intestin où seuls les aglycones et peu de glucosides peuvent être absorbés. Des études expérimentales menées chez le rat ont montré que l'absorption

au niveau gastrique est possible pour certains flavonoïdes, comme la quercétine, mais pas pour leurs glycosides. De plus, il a été récemment montré que, chez le rat et la souris, les anthocyanes sont absorbés par l'estomac (**Pandey et Rizvi, 2009**).

Il a été suggéré que les glucosides pourraient être transportés dans les entérocytes par le transporteur de glucose dépendant du sodium SGLT1, puis hydrolysés par une  $\beta$ -glucosidase cytosolique. Cependant, l'effet de la glucosylation sur l'absorption est moins clair pour les isoflavones que pour la quercétine (**Manach et al., 2004**). Les proanthocyanidines diffèrent de la plupart des autres polyphénols végétaux en raison de leur nature polymérique et de leur poids moléculaire élevé. Cette caractéristique particulière devrait limiter leur absorption à travers la barrière intestinale, et les oligomères plus gros que les trimères sont peu susceptibles d'être absorbés dans l'intestin grêle dans leurs formes natives (**D'archivio et al., 2007 ; Halliwell et al., 2000**).

Il a été observé que les acides hydroxycinnamiques, lorsqu'ils sont ingérés sous forme libre, sont rapidement absorbés par l'intestin grêle et sont conjugués sous forme de flavonoïdes (**Clifford, 2000**). Cependant, ces composés sont naturellement estérifiés dans les produits végétaux et l'estérification nuit à leur absorption car les muqueuses intestinales, le foie et le plasma ne possède pas d'estérases capables d'hydrolyser l'acide chlorogénique pour libérer l'acide caféique, et l'hydrolyse ne peut être effectuée que par la microflore présente dans le côlon (**Olthof et al., 2001**). Ces polyphénols atteignent le côlon, où la microflore hydrolyse les glycosides en aglycones et métabolise largement ces aglycones en divers acides aromatiques (**Kuhnau, 1976**).

Les aglycones sont divisés par l'ouverture de l'hétérocycle à différents points en fonction de leur structure chimique, et produisent ainsi différents acides qui sont ensuite métabolisés en dérivés de l'acide benzoïque. Après absorption, les polyphénols passent par plusieurs processus de congestion. Ces processus comprennent principalement la méthylation, la sulfatation et la glucuronidation, représentant un processus de détoxification métabolique, commun à de nombreux xénobiotiques, qui facilite leur élimination biliaire et urinaire en augmentant leur hydrophilie (**Lee et al., 2002**).

La méthylation des polyphénols est également assez spécifique, elle se produit généralement en position C3 du polyphénol, mais elle pourrait se produire en position C4 (**Lee et al., 2002**). Des enzymes comme les sulfo-transférases catalysent le transfert d'une fraction sulfate pendant le processus de sulfonation. La sulfatation se produit principalement dans le foie, mais la position de sulfatation des polyphénols n'a pas encore été clairement identifiée (**Falany, 1997**). La

glucuronidation se produit dans l'intestin et dans le foie, et le taux de conjugaison le plus élevé est observé en position C3 (Spencer et al., 1999).

Les mécanismes de conjugaison sont très efficaces et les aglycones libres sont généralement soit absents, soit présents à de faibles concentrations dans le plasma après consommation d'une dose nutritionnelle (Hollman et al., 1997). Il est important d'identifier les métabolites circulants, y compris la nature et les positions des groupes de conjugaison sur la structure du polyphénol, car les positions peuvent affecter les propriétés biologiques des conjugués (Dangles et al., 2001).

Certains métabolites des polyphénols circulent dans le sang sous forme liés aux protéines sanguins ; en particulier l'albumine qui joue un rôle important dans la biodisponibilité des polyphénols. L'affinité des polyphénols pour l'albumine varie selon leur structure chimique (Dangles et al., 2001). La liaison à l'albumine peut avoir des conséquences sur le taux de clairance des métabolites et sur leur libération dans les cellules et les tissus. Il est possible que l'absorption cellulaire des métabolites soit proportionnelle à leur concentration non liée. Enfin, on ne sait toujours pas si les polyphénols doivent être sous forme libre pour exercer leurs activités biologiques, ou les polyphénols liés à l'albumine peuvent exercer une certaine activité biologique (D'archivio et al., 2007 ; Dufour et al., 2007).

### **III-2-1-3- Elimination :**

L'excrétion des polyphénols avec leurs dérivés se produit par l'urine et la bile. Il a été observé que les métabolites largement conjugués sont plus susceptibles d'être éliminés dans la bile, tandis que les petits conjugués, tels que les monosulfates, sont préférentiellement excrétés dans l'urine. La quantité de métabolites excrétés dans l'urine est à peu près corrélée avec les concentrations plasmatiques maximales. Le pourcentage d'excrétion urinaire est assez élevé pour les flavanones d'agrumes et diminue des isoflavones aux flavonols (D'archivio et al., 2007).

### **III-2-2- Mécanismes antioxydants des polyphénols :**

Les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via trois mécanismes :

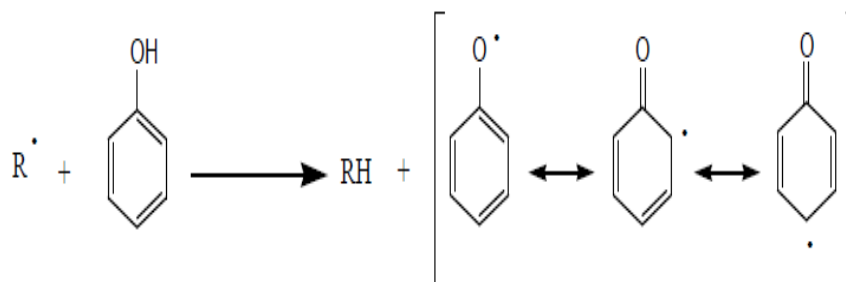
- Le piégeage direct des ERO ;
- La chélation des ions de métaux de transitions, responsables de la production des ERO ;
- L'inhibition des enzymes génératrices d'EOR.

#### **III-2-2-1- Piégeage des radicaux libres :**

Les composés phénoliques ont des propriétés antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène, le processus est radicalaire (Sökmen et al., 2012). Ils interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par la donation rapide



d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres selon un mécanisme proposé dès 1976 par Sherwin : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire. Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (Sökmen et al., 2012).



**Figure 5** : Mode d'action des antioxydants phénoliques (Portes, 2008).

Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent :

- Des groupes phénoliques hydroxyles qui sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- Un système aromatique stabilisé par la résonance (Dai et Mumper, 2010).

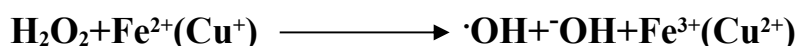
Les flavonoïdes comme la catéchine ou la quercétine peuvent directement piéger les ERO, tels que l'O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou le HOCl. La quercétine, la myricétine et le kaempférol, sont les flavonoïdes avec la plus grande activité de neutralisation des radicaux libres.

Les polyphénols peuvent également agir directement en capturant les électrons non appariés des ERO, générant ainsi des espèces moins réactifs. Les flavonoïdes piègent les radicaux libres pour générer le radical flavine, qui est beaucoup moins réactif (Quiñones et al., 2013).

Les flavonoïdes en général et les flavan-3-ols en particulier sont de bons piègeurs des radicaux libres (Fraga, 2011). A cause la présence de 3',4'-dihydroxy et la présence du groupe o-dihydroxy (structure des catéchol) sur le noyau aromatique B ; ils possèdent la propriété de donneur d'électrons. En outre, la présence du 3-OH du cycle C est également bénéfique pour l'activité antioxydante des flavonoïdes. La présence de la double liaison C2-C3 conjuguée avec le groupe 4-céto est responsable de la délocalisation des électrons du noyau B, ce qui améliore encore l'activité antiradicalaire (Amic et al., 2003).

### III-2-2-2- Chélation des ions métalliques :

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le cuivre ( $\text{Cu}^+$ ), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et des cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant ( $\text{Fe}^{2+}$  pour la catalase et  $\text{Cu}^+$  pour la superoxyde dismutase). Cependant, ils peuvent aussi être responsables de la production du radical  $\cdot\text{OH}$  par la réduction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  lors de la réaction de Fenton (Pietta, 2000 ; Heim et al., 2002).

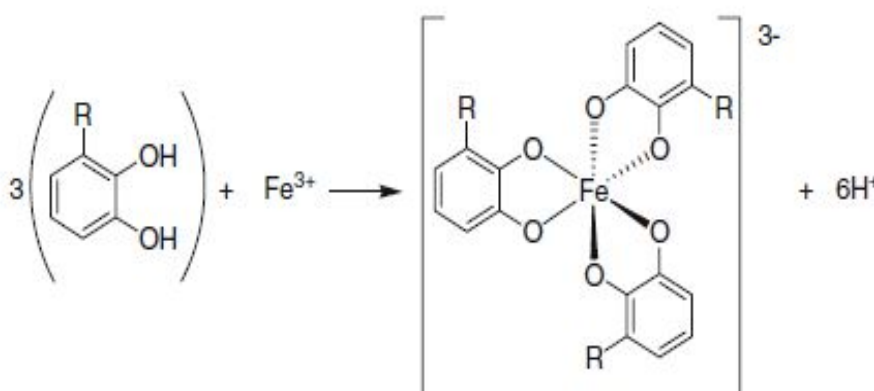


La chélation des ions métalliques par les flavonoïdes nécessite trois sites principaux :

- Noyau catéchol sur le cycle B.
- Les groupe 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C.
- Le groupe 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Pietta, 2000 ; Heim et al., 2002).

#### A- Attachement du fer par les ligands catecholates, gallate et semiquinone :

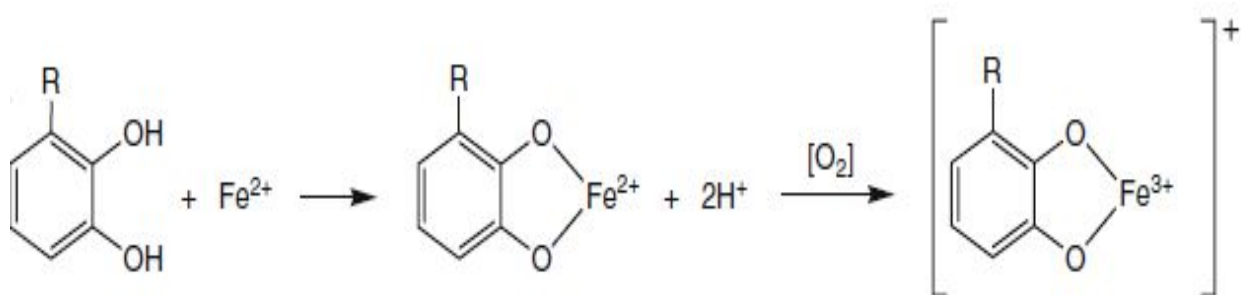
Il est bien connu que le catéchol et le gallol et plusieurs dérivés fonctionnalisés (incluant la plupart des composés polyphénoliques) sont des chélateurs efficaces des métaux. Lorsqu'ils sont déprotonés pour former un attachement avec le métal, les fonctions catéchols et gallols sont référés en groupes de catécholates et de gallates, respectivement. Les ions métalliques qui préfèrent la géométrie octaédrique telle que les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  peuvent coordonner jusqu'à trois groupes de catecholates ou de gallates ( figure 6) (Perron et Brumaghim, 2009).



**Figure 6:** La géométrie octaédrique de coordination prévue du complexe général du fer polyphénol. Gallols, R=OH ; catéchols, R=H. La Coordination exige la déprotonation des ligands des polyphénols.

Pour cette raison, on pourrait prévoir que les polyphénols avec les groupes catéchols ou les groupes gallols se seraient toujours avec le fer selon le mode de 3:1 (figure 6). Cependant, puisque

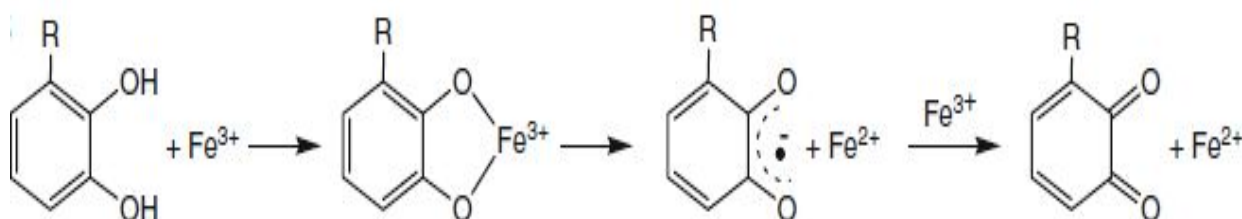
les polyphénols possèdent une grande variabilité structurale, donc ils peuvent exposer différents modes de coordination. La valeur de la constante pKa est l'intervalle de 7 à 9 pour la plupart des hydrogènes acides des polyphénols, les polyphénols sont facilement déprotonés en présence du fer et forment des complexes très stables. Puisque les ligands de polyphénol stabilisent fortement les ions  $Fe^{3+}$  plus que les ions  $Fe^{2+}$ , les complexes catécholates et gallates des ions  $Fe^{2+}$  sont rapidement oxydés en présence de l'oxygène  $O_2$  pour former le complexe  $Fe^{3+}$ -polyphénol, le processus généralement désigné sous le nom de l'autooxydation (**figure 7**) (**Perron et Brumaghim, 2009**).



**Figure 7 :** Coordination de  $Fe^{2+}$  par des polyphénols suivant la réaction de transfert d'électron en présence de l'oxygène conduisant à la génération du Complexe  $Fe^{3+}$ - polyphénol.

### B- Réduction du $Fe^{3+}$ par les ligands des polyphénols :

Lors de l'attachement d'un ligand de catécholate ou de gallate au  $Fe^{3+}$ , le polyphénol peut réduire le fer en  $Fe^{2+}$ . Pendant ce processus, le polyphénol est oxydé à une semiquinone (**figure 8**) (**Perron et Brumaghim, 2009**).



**Figure 8 :** Coordination de  $Fe^{3+}$  par des polyphénols conduisant à la réduction du fer et à la formation d'une semiquinone, et la réduction de  $Fe^{3+}$  forme une espèce de quinone et  $Fe^{2+}$ . R= H, OH.

Au bas pH, le ligand de semiquinone est protoné pour donner un ligand neutre. Une fois la forme de semiquinone du polyphénol est produite, elle est capable de réduire un autre équivalent de  $Fe^{3+}$ , simultanément la semiquinone s'oxyde en quinone. Néanmoins, ce processus de réduction de fer est souvent attribué à l'activité antioxydante et pro-oxydante des composés phénoliques (**Perron et Brumaghim, 2009**).

### **III-2-2-3- Inhibition des enzymes :**

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété des protéines (**Havsteen, 2002 ; Dangles et Dufour, 2008**), via des interactions de van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques). Par exemple, les aglycones des flavonoïdes, essentiellement les flavones et les flavonols (noyaux tricycliques plans et polarisables), ont une capacité de se lier avec beaucoup de protéines globulaires, notamment des enzymes, des récepteurs et transporteurs (**Dangles, 2012**).

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant pour les polyphénols. Plusieurs travaux ont rapporté que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet (**Nagao et al., 1999 ; Lin et al., 2002**) par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ERO (**Dangles et Dufour, 2006 ; Dangles et Dufour, 2008**). Cette double action est bien mise en évidence dans le cas de la xanthine oxydase, enzyme du foie impliquée dans la maladie de la goutte, et qui catalyse une réaction du catabolisme des purines, en transformant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (**Dangles et Dufour, 2008**). Cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde (**Day et al., 2000**).

De nombreux flavonoïdes sont aussi de puissants inhibiteurs des métalloenzymes lipoxigénase, myéloperoxydase et NADPH oxydase (**Dangles et Dufour, 2008 ; Dangles, 2012**).

Afin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice des flavonoïdes, des études ont été réalisées sur l'effet de la quercétine sur l'oxydation de l'acide linoléique par une lipoxigénase. Ces auteurs ont constaté que le mécanisme d'inhibition des lipoxigénases par la quercétine ne serait pas dû à une complexation ou à une oxydation du  $Fe^{2+}$ , mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy) (**Chebil, 2006**).

Des enzymes comme les sulfo-transférases catalysent le transfert d'une fraction sulfate pendant le processus de sulfonation. La sulfatation se produit principalement dans le foie, mais la position de la sulfatation pour les polyphénols n'a pas encore été clairement identifiée (**Pandey et Rizvi, 2009**).

### **III-3- Les polyphénols : une action pro-oxydante :**

Les polyphénols peuvent avoir un effet pro-oxydant par chélation des métaux de telle manière qu'ils maintiennent ou augmentent leur activité catalytique, de même l'activité pro-oxydante des polyphénols est le résultat de leur capacité à réduire les métaux (comme le  $Fe^{3+}$  pour

donner  $\text{Fe}^{2+}$  lequel réagira avec  $\text{O}_2$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ce qui augmente leur pouvoir de génération des radicaux libres (**Pereira et al., 2009**).

A des fortes concentrations, les flavonoïdes peuvent agir comme pro-oxydants. A titre d'exemple la quercétine à des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{M}$  provoque chez les rats une cytotoxicité des muscles lisses de l'aorte par production des ERO qui induisent l'apoptose (**Bisht et al., 2010**).

Une étude clinique menée par **Knekt et al., (1997)**, dans laquelle 9959 hommes et femmes ont été suivis pendant 24 ans, a montré une relation inverse entre la prise de flavonoïdes (par exemple, quercétine) et le cancer du poumon. Une possible explication de ces données contradictoires est que les flavonoïdes sont toxiques pour les cellules cancéreuses ou aux cellules immortalisées, mais ne sont pas toxiques ou sont moins toxiques pour les cellules normales. Si cela est vrai, les flavonoïdes pourraient jouer un rôle dans la prévention du cancer (**Nijveldt et al., 2001**).

# **Chapitre IV :**

## **Polyphénols et santé**

## **IV- POLYPHENOLS ET SANTE :**

### **IV-1- Généralités :**

Des effets protecteurs de la consommation d'aliments riches en polyphénols vis-à-vis de différentes pathologies (maladies cardiovasculaires, cancers, diabète...) ont été mis en évidence tant d'un point de vue épidémiologique qu'expérimental. De nombreuses études se sont penchées sur l'analyse du mode d'action des polyphénols dans la prévention de ces pathologies, qui met en cause les propriétés réductrices des polyphénols et/ou leur affinité pour une grande variété de protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription).

Les mécanismes généraux d'action des polyphénols peuvent être identifiés, néanmoins chaque polyphénol peut exercer un rôle physiologique différent, selon sa constitution chimique, disponibilité biologique et son métabolisme (Savini *et al.*, 2013).

Les polyphénols possèdent de multiples propriétés biologiques tels que l'effet antioxydant, antimicrobien, anti-thrombotique, anti-allergique, anti-inflammatoire (Arribas *et al.*, 2013).

Les polyphénols ont également des propriétés contre les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, divers types de cancer et le diabète (Krook *et al.*, 2012 ; Abdulla *et al.*, 2013).

La signification de ces effets biologiques dans le domaine de la nutrition humaine est encore loin d'être établie d'autant qu'ils mettent presque toujours en jeu les formes natives ou aglycones de polyphénols et non pas les formes conjuguées circulantes. Pour progresser dans la démonstration *in vivo* des effets santé des polyphénols, une meilleure connaissance de la biodisponibilité des polyphénols (leur devenir après absorption éventuelle au travers de la paroi intestinale) et une combinaison d'études cliniques pertinentes sont indispensables. Le développement récent de nouveaux outils et méthodes pourrait permettre des avancées importantes dans les années à venir. C'est notamment le cas de la nutriginomique qui vise à mettre en évidence les gènes dont l'expression est régulée (à la hausse ou à la baisse) par les composants de l'alimentation. La difficulté réside ensuite dans l'analyse et l'interprétation de ces données biologiques complexes (Achat *et al.*, 2013).

### **IV-2- polyphénols et microbes :**

Les polyphénols, des flavonoïdes, des acides phénoliques et des tanins ont reçu plus d'attention en raison de leurs activités antimicrobiennes. La plupart de ces composés sont capables de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbiens comme l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhérence ligands-hôte et la neutralisation des toxines bactériennes et montrent un synergisme avec des antibiotiques (Daglia, 2012).

L'activité des flavonoïdes est considérée comme étant due à leurs capacité de former des complexes avec les protéines extracellulaires solubles, ainsi qu'avec les parois cellulaires bactériennes, bien que les flavonoïdes hauts lipophiles puissent perturber les membranes microbiennes (Guil-Guerrero *et al.*, 2016).

Les acides phénoliques possèdent également une activité antimicrobienne qui est due principalement à la diffusion des acides non dissociés à travers la membrane, conduisant à l'acidification du cytoplasme et dans certains cas à la mort cellulaire et que les facteurs liés au caractère lipophile tels que le pH, les substitutions cycliques (groupes hydroxyle et méthoxyle) et la saturation de la chaîne latérale sont déterminantes pour l'activité de ces composés (Guil-Guerrero *et al.*, 2016).

L'activité antimicrobienne des tanins hydrolysables est bien connue, ils sont capables de précipiter des protéines et/ou supprimer des cofacteurs métalliques à travers leur forte affinité pour les ions métalliques, agissant comme une barrière microbienne (Yamaguchi *et al.*, 2011 ; Daglia, 2012). Les effets antimicrobiens des tanins condensés, sont expliqués par plusieurs mécanismes, telle que la déstabilisation de la membrane cytoplasmique, la perméabilisation de la membrane cellulaire, l'inhibition des enzymes microbiennes extracellulaires, des actions directes sur le métabolisme microbien, la privation des substrats nécessaires à la croissance microbienne, en particulier les micronutriments minéraux essentiels tels que le fer et le zinc (par la chélation des métaux) (Daglia, 2012 ; Guil-Guerrero *et al.*, 2016).

Les polyphénols sont connus aussi pour leurs propriétés inhibitrices de la croissance bactérienne (Karou *et al.*, 2005). Cependant, les mécanismes d'actions de ces composés sur les microorganismes ne sont pas totalement élucidés.

#### **IV- 3- Polyphénols et inflammation :**

Les anti-inflammatoires sont définis comme étant des substances qui agissent sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogène. Elles bloquent la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (comme les prostaglandines) et donc diminuent la sensation de douleur mais aussi l'inflammation (Orliaguet *et al.*, 2013 ; Hajjaj, 2017).

L'activité anti-inflammatoire des composés phénoliques a été démontrée dans de nombreuses études *in-vitro* et *in-vivo* (Santangelo *et al.*, 2007). Le stress oxydatif provoque une augmentation des activités des enzymes telles que la cyclo-oxygénase (COX) et la lipo-oxygénase (LPO) qui sont impliquées dans la libération des facteurs tels que les interleukines et les chimiokines (Quiñones *et al.*, 2013). Les polyphénols expriment une activité anti-inflammatoire en



modulant l'expression de ces gènes pro-inflammatoires (COX, LPO, NO synthase et plusieurs cytokines) (Capiralla et al., 2012).

Les flavonoïdes peuvent inhiber différentes étapes de la réponse inflammatoire, depuis l'accroissement de la perméabilité vasculaire qui existe dans les étapes initiales jusqu'à la formation de tissu de granulation. Ils peuvent inhiber la libération des médiateurs pro-inflammatoires (histamine, dérivés de l'acide arachidonique, enzymes lysosomales, basophiles, cellules mastocytaires et neutrophiles). Quelques-uns semblent modifier la fonction lymphocytaire et par conséquent la repense immunologique (Hajjaj, 2017).

#### **IV-4- Polyphénols et cancers :**

Les polyphénols pourraient jouer un rôle important comme anticancéreux. Les effets anticancéreux des polyphénols ont été observés au niveau de la bouche, de l'estomac, du duodénum, du côlon, du foie, du poumon, de la glande mammaire ou de la peau. De nombreux polyphénols, tels que les proanthocyanidines, les flavonoïdes, le resvératrol, les tanins, l'épigallocatechine-3-gallate, l'acide gallique et l'anthocyanine, ont été testés ; tous ont montré des effets protecteurs dans certains modèles, bien que leurs mécanismes d'action aient été différents (Johnson et al., 1994).

Les polyphénols naturels pourraient avoir un meilleur effet protecteur sur le cancer du sein métastatique (Mantena et al., 2006). À l'exception de l'acide gallique, les flavones pourraient également prévenir la carcinogenèse du côlon. Wenzel et al., (2000) ont étudié comment la 2-phényl-4H-1-benzopyran-4-one, la structure de base des flavones, affecte les cellules cancéreuses humaines du colon HT-29 pour comprendre les bases moléculaires de l'activité anticancéreuse putative des flavonoïdes.

#### **IV- 5- Polypénols et maladies cardiovasculaires :**

La consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaires (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguin et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués) (Yamanaka, 1996). Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (Rein et al., 2000).

D'après de récentes données probantes, certains polyphénols sous forme purifiée, y compris le resvératrol, et la naringénine, ont des effets bénéfiques sur la dyslipidémie chez les

modèles humains ou animaux. Un traitement à la naringénine atténuait l'athérosclérose en corrigeant la dyslipidémie (Mulvihill et Huff, 2000).

#### **IV-6- Polyphénols et diabète :**

Les polyphénols ont un effet contre le diabète de type 2 (DT2) par inhibition des disaccharidases ( $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase) dans la lumière intestinale. Cela peut limiter la digestion des polysaccharides dans l'alimentation, ce qui réduit donc l'absorption des sucres simples. Les polyphénols peuvent également exercer des effets antidiabétiques importants en améliorant l'absorption du glucose dans les muscles et les adipocytes (Hanhineva et al., 2010 ; Anhé et al., 2013). Par exemple, la catéchine, qui a un effet hypoglycémiant dû à une inhibition de la  $\alpha$ -glucosidase, la  $\alpha$ -amylase et la sucrase (Rodrigo et al., 2011). Les polyphénols peuvent également protéger les cellules  $\beta$  pancréatiques de la glucotoxicité et peuvent améliorer la sécrétion d'insuline, minimisant ainsi le DT2 (Anhé et al., 2013).

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 (Achat et al., 2013). 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 (Achat et al., 2013).

#### **IV-7- Polyphénols et autres pathologies :**

Les polyphénols présentent plusieurs autres effets bénéfiques pour la santé. Les polyphénols alimentaires exercent des effets préventifs dans le traitement de l'asthme. Dans l'asthme, les voies respiratoires réagissent en se rétrécissant ou en s'obstruant lorsqu'elles sont irritées. Il est alors difficile pour l'air d'entrer et de sortir. Ce rétrécissement ou cette obstruction peut provoquer un ou plusieurs symptômes tels que la respiration sifflante, la toux, l'essoufflement et l'oppression thoracique. Les preuves épidémiologiques que les polyphénols pourraient protéger contre les maladies pulmonaires obstructives proviennent des études qui ont rapporté des associations négatives de la consommation de pommes avec la prévalence et l'incidence de l'asthme, et une association positive avec la fonction pulmonaire. Une consommation accrue de l'isoflavone de soja, la génistéine, a été associée à une meilleure fonction pulmonaire chez les patients asthmatiques (Pandey et Rizvi, 2009).

La consommation des polyphénols est également signalée comme bénéfique dans l'ostéoporose (**Pandey et Rizvi, 2009**). Dans une étude portant sur les effets de la consommation du thé sur la densité minérale chez les femmes âgées, il a été montré que les femmes qui buvaient du thé avaient une densité minérale osseuse plus élevée par rapport à celles qui ne buvaient pas de thé. Il a été suggéré que les flavonoïdes présents dans le thé pourraient être responsables de la prévention de l'ostéoporose (**Nijveldt et al., 2001**).

Les polyphénols et en particulier les flavonoïdes comme les xanthonés, la quercétine, la gossypétine, la myricétine et l'epicatechin-3-gallate ont été révélés comme des inhibiteurs efficaces de l'acétylcholine estérase (AChE) qui est l'enzyme cible dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (**Brühlmann et al., 2004**). Ces produits naturels agissent en inhibant l'AChE ce qui va corriger le déficit de l'acétylcholine et améliorer son niveau dans le cerveau. Ainsi, l'augmentation du niveau de l'acétylcholine est le premier précurseur du traitement de la maladie d'Alzheimer (**Heinrich et Theoh, 2004**).

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. La naringine et la quercétine exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol. Il a été suggéré que la quercétine exerce ses effets cytoprotecteurs grâce à un complexe impliquant la stimulation de la prostaglandine et l'inhibition de la production de leucotriènes via la production de mucus et ses propriétés antioxydantes. Par ailleurs, il a été établi que la quercétine inhibe la croissance d'*Helicobacter Pylori* ainsi que la formation d'acide par les cellules pariétales en réponse à une stimulation par l'histamine et l'AMPc dibutyrique (**Ghedira, 2005**).

Certains flavonoïdes agissent sur la réplication intracellulaire des virus, tandis que d'autres inhibent les propriétés infectieuses des virus. Jusqu'à présent, la plupart des études sur les effets des virus ont été réalisées *in vitro* et on sait peu de choses sur l'effet antiviral des flavonoïdes *in vivo* (**Nijveldt et al., 2001**).

## **Chapitre V :**

# **Méthodes *in vitro* de l'évaluation de l'activité antioxydante totale des polyphénols**

## **V- METHODES IN VITRO DE L'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE TOTALE DES POLYPHENOLS :**

### **V-1- Généralité :**

Depuis ces dernières décennies, les tests d'activité antioxydante ont été largement développés pour évaluer l'efficacité de nouveaux composés (Desmier, 2016).

L'activité antioxydante n'est pas conclue sur la base d'un seul modèle de test antioxydant. Il existe plusieurs procédures de test *in vitro* pour évaluer les activités antioxydantes avec les échantillons d'intérêt. Un autre aspect est que les modèles de tests antioxydants varient à différents égards. Il est donc difficile de comparer pleinement une méthode à une autre. En général, les tests antioxydants *in vitro* utilisant des pièges à radicaux libres sont relativement simples à réaliser.

Parmi les méthodes de piégeage des radicaux libres, la méthode 1,1-diphényl-2picrylhydrazyl (DPPH) est en outre rapide, simple (c'est-à-dire qu'elle ne nécessite pas beaucoup d'étapes et de réactifs) et peu coûteuse par rapport à d'autres modèles de test. Par ailleurs, le test de décoloration du sel de diamonium du 2,2-azinobis (acide 3-éthyl benzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) est applicable aux antioxydants tant hydrophiles que lipophiles (Gupta, 2015).

### **V-2- Techniques spectrophotométriques de l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols :**

Les techniques spectrométriques reposent sur la réaction d'un radical, cation radicalaire ou complexe avec une molécule antioxydante capable de donner un atome d'hydrogène (Pisoschi et Negulescu, 2011).

Sur la base de la réaction chimique impliquée entre les composés antioxydants et les radicaux libres, les tests de capacité antioxydante sont classés en deux grandes catégories :

- **Essais basés sur la réaction de transfert d'atomes d'hydrogène (HAT) :** Ces essais mesurent/quantifient la capacité de donner d'atomes d'hydrogène des composés antioxydants par une réaction ET couplée aux protons, où l'on mesure la capacité antioxydante de rupture de chaîne. Ces essais sont basés sur la réaction entre un générateur synthétique de radicaux libres, une sonde moléculaire oxydable et un oxydant dont la cinétique de réaction est dérivée de la courbe cinétique (Sunitha, 2016).
- **Essais basés sur la réaction de transfert d'électrons (ET) :** Ces essais mesurent la capacité de réduction des composés antioxydants. Ils sont basés sur la réaction redox simple, où les composés antioxydants réduisent les radicaux libres et s'oxydent. La réduction par les composés antioxydants entraîne un changement de couleur du réactif, qui est en corrélation

avec la capacité antioxydante, qui est mesurée par le changement d'absorbance (Sunitha, 2016).

### V-2-1- Test au DPPH :

#### V-2-1-1- Présentation du test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) :

La DPPH est un radical organique azoté avec un électron délocalisé, et cette caractéristique lui donne une coloration violette, avec une absorbance maximale à 515 nm. Le test est basé sur la mesure de la capacité des antioxydants à réduire la DPPH. Cette réduction peut être mesurée par la décoloration de la couleur violette dans son absorbance (San Miguel-Chávez, 2017).

Lorsque les antioxydants réagissent avec la DPPH, le radical libre stable devient apparié en présence d'un donneur d'hydrogène (par exemple, un antioxydant piégeant les radicaux libres) est réduit en DPPH-H et en conséquence, les absorbances ont diminué à partir du radical DPPH par rapport à la forme DPPH-H, il en résulte une décoloration (jaune) (Sunitha, 2016).

Dans ce test, une solution de radical est décolorée après réduction avec un antioxydant (AH) ou un radical (R) selon l'équation suivante (Sunitha, 2016) :

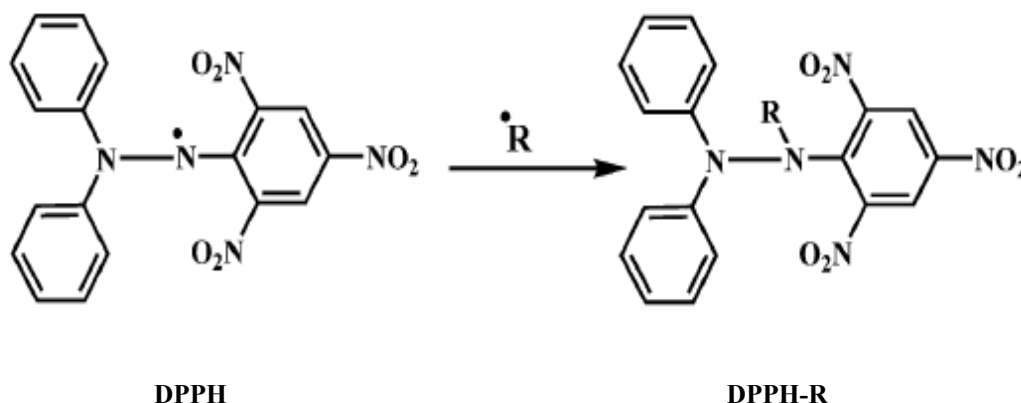


Figure 9 : Réaction du radical DPPH avec d'autres radicaux (Nimse et Pal, 2015).

Un inconvénient de la méthode DPPH est le fait que de nombreux antioxydants qui réagissent rapidement avec le peroxyde radical sont presque ou entièrement inertes à la DPPH.

La DPPH est stable, elle est disponible dans le commerce et ne doit pas être générée avant d'effectuer des tests comme l'ABTS. Pour ces raisons, elle est considérée comme une méthode spectrophotométrique facile et utile pour le dépistage ou la mesure de l'activité antioxydante (Sunitha, 2016).

#### V-2-1-2- Protocole du test au DPPH :

Ce test a été rapporté par Brand-Williams *et al.*, (1995) et selon Manzocco *et al.*, (1998), pour le réaliser, il est nécessaire de diluer 200 µL d'échantillon dans du méthanol et mélanger avec

2 ml de 0,5 mM de DPPH. Après 30 min, l'absorbance est mesurée à 515 nm dans un spectrophotomètre. Le pourcentage d'élimination des radicaux DPPH est calculé avec l'expression:

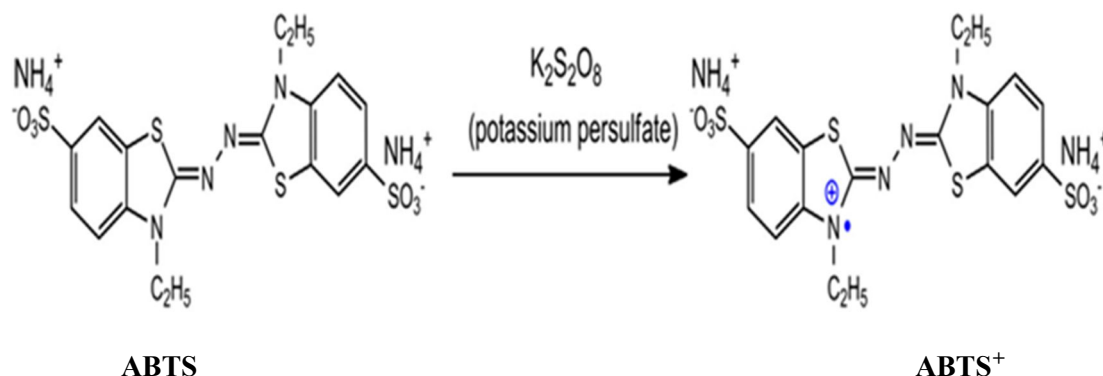
$$\% \text{ d'inhibition du radical DPPH} = ((\text{Abr} - \text{Aar}) / \text{Abr}) \times 100$$

Où Abr est l'absorbance avant la réaction et Aar est l'absorbance après la réaction (San Miguel-Chávez, 2017).

**V-2-2-Test de ABTS (sel d'ammonium de l'Acide 2,2'-azinobis-(3 éthylBenzo Thiazoline -6-Sulfonique)) :**

**V-2-2-1- Présentation du test de ABTS :**

L'ABTS est une molécule cible utilisée pour évaluer la réactivité des échantillons d'antioxydants en présence de peroxydes. L'ABTS est d'abord soumis à une réaction d'oxydation avec du permanganate de potassium, du persulfate de potassium ou du 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane), produisant le cation radical de l'ABTS (ABTS<sup>+</sup>) de couleur bleu verdâtre qui absorbe à des longueurs d'onde de 415, 645, 734 et 815 nm. L'ABTS<sup>+</sup> est stable pendant plusieurs minutes (Francenia Santos-Sánchez et al., 2019).



**Figure 10 :** Formation d'un radical ABTS (ABTS<sup>+</sup>) stable à partir d'ABTS avec du persulfate de potassium (Xiao et al., 2020).

L'ABTS est soluble à la fois dans les eaux et dans les solvants organiques est donc utile pour évaluer l'activité antioxydante d'échantillons dans différents milieux. Il est couramment utilisé dans des solutions qui simulent un sérum ionique (pH 7,4) basé sur un tampon phosphate (PBS) contenant 150 mM de NaCl. Lorsqu'un milieu de PBS est utilisé, les échantillons réagissent dans un intervalle de temps d'environ 30 min, alors que dans l'alcool, ils nécessitent des temps de réaction plus longs. Le niveau de peroxyde est déterminé par l'absorbance à certaines des longueurs d'onde mentionnées ci-dessus. La CI50 est calculée en traçant le pourcentage d'inhibition contre de différentes concentrations de l'échantillon d'antioxydants (Francenia Santos-Sánchez et al., 2019).

Le test ABTS est avantageux car il réduit le temps de travail, le coût des matériaux et le volume des échantillons. Certains de ces tests sont adaptés pour un dépistage de masse plus pratique en utilisant un spectrophotomètre quantitatif et sont appliqués dans l'agriculture et l'industrie alimentaire. Bien que cette méthode ait été signalée et commercialisée par CAYMAN, elle n'intègre pas d'échantillons blancs, ce qui pourrait entraîner d'autres inexactitudes dans les mesures (Sunitha, 2016).

#### **V-2-2-2- Protocole du test de ABTS :**

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, l'ABTS est diluée avec de l'éthanol (96 %) pour obtenir une absorbance de 0,700 ( $\pm 0,020$ ) à 734 nm. 2 ml de solution ABTS sont mélangés à 100  $\mu$ l de la solution d'échantillon dans une cuvette et la diminution de l'absorbance est mesurée après 6 minutes. Le blanc de réactif est préparé en ajoutant 100 ml d'éthanol au lieu de l'échantillon. L'acide ascorbique est utilisé à différentes concentrations (0-100 mg/L) préparé dans 96 % des éthanol et analysé selon une procédure similaire à celle appliquée pour les échantillons dont la moyenne des trois valeurs est exprimée en mg d'acide ascorbique équivalents /100 g (Perron et Brumaghim, 2009).

#### **V-2-3- Test FRAP (Pouvoir antioxydant réducteur du fer) :**

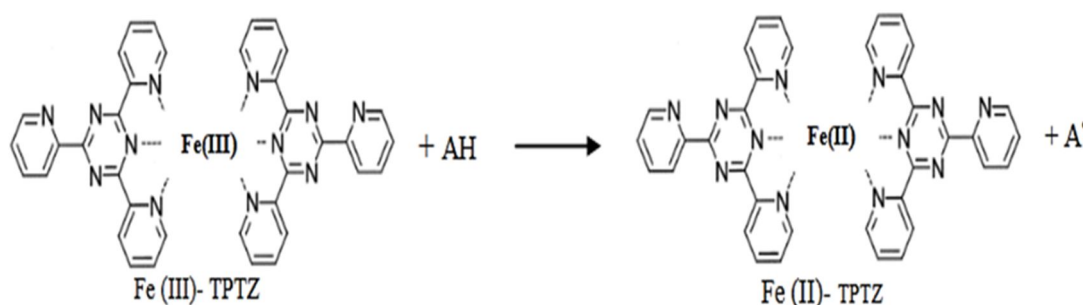
##### **V-2-3-1- Présentation du test de FRAP :**

La FRAP est une autre méthode utilisée pour la détermination de l'activité antioxydante totale. Elle a été utilisée principalement pour déterminer l'activité antioxydante du plasma, puis appliquée avec succès pour mesurer l'activité antioxydante d'un certain nombre d'échantillons biologiques et de substances pures. Comme les propriétés antioxydantes et antiradicalaires sont principalement attribuées à la présence de composés phénoliques, on s'attend à ce que l'efficacité d'une fraction soit proportionnelle à ses concentrations phénoliques (Sunitha, 2016).

Cette méthode est basée sur le pouvoir réducteur du fer qui fait partie du composé Fe (TPTZ)<sup>3+</sup>. Lorsque ce composé est réduit en Fe (TPTZ)<sup>2+</sup>, une couleur bleue apparaît, et son absorbance peut être mesurée à 593 nm (San Miguel-Chávez, 2017). L'absorbance peut être mesurée pour tester la quantité de fer réduite et peut être corrélée avec la quantité d'antioxydants. Le trolox ou l'acide ascorbique sont utilisés comme références (Pisoschi et Negulescu, 2011).

La réaction doit être réalisée dans des conditions acides (pH 3,6) pour préserver la solubilité du Fe. Le pouvoir réducteur est lié au degré d'hydroxylation et à la conjugaison dans les phénols (Francenia Santos-Sánchez et al., 2019).





**Figure 11** : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)- TPTZ et un antioxydant (AH) (Djahra, 2013).

L'avantage du cuivre par rapport au fer est que chaque classe d'antioxydant, y compris les thiols, sera détectée avec très peu d'interférence des radicaux libres réactifs, et la cinétique de la réaction lors de l'utilisation du cuivre est plus rapide que celle du fer (FRAP). Un inconvénient qui peut survenir est que la phénanthroline n'est pas miscible à l'eau, et qu'elle doit donc être mélangée à des solvants organiques tels que le méthanol à 95 % (Sunitha, 2016).

#### V-2-3-2- Protocole du test de FRAP :

Le test FRAP utilise les antioxydants comme réducteurs dans une méthode colorimétrique liée à l'oxydoréduction, employant un système oxydant facilement réduit et présent en excès stœchiométrique. Les solutions de test sont mélangées avec un réactif de FRAP (10 mM de solution de TPTZ dans 40 mM de HCl, 20 mM de FeCl<sub>3</sub>, et un tampon d'acétate 0,3 M à pH 3,6), puis l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée par spectrophotométrie après incubation à 37°C pendant 10 minutes à 593 nm par rapport au blanc. Les résultats finaux peuvent être exprimés comme la concentration d'antioxydants ayant un pouvoir réducteur ferrique équivalent à celui du FeSO 1mM utilisé comme solution étalon (Sunitha, 2016).

#### V-2-4- Test de ORAC :

##### V-2-4-1- Présentation du test de ORAC :

La méthode ORAC est une analyse spectrofluorimétrique, qui permet de déterminer le pouvoir antioxydant d'une substance en solution par comparaison à un analogue de la vitamine E (trolox). Le principe de la méthode est basé sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine (protéine fluorescente extrêmement sensible au stress oxydatif) en présence d'AAHP (2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride), un radical libre stable, donneur de radicaux peroxydes. La cinétique de dégradation de la fluorescéine est directement liée à la concentration de radicaux libres présents dans le milieu réactionnel ; La présence des antioxydants empêche ou ralentit la décomposition de la fluorescéine (Zeghad, 2018).

#### **V-2-4-2- Protocole du test de ORAC :**

Le test ORAC est appliqué aux extraits présentant un caractère hydrophile en suivant la méthode développée par **Ou et al, (2001)**. Il en existe une variante qui consiste à introduire la  $\beta$ -cyclodextrinéméthylée pour permettre la solubilisation d'antioxydants lipophiles en solution aqueuse par formation de complexes d'inclusion (**Huang et al., 2002**).

Le test consiste à mélanger, directement dans les cuves en verre, 200  $\mu$ l d'extrait dilué ou de méthanol avec 2000  $\mu$ l de solution FINa. Les cuves sont alors placées dans le passeur d'échantillon sous agitation mécanique à 37°C. Deux cents  $\mu$ l de solution d'AAPH sont, ensuite, ajoutés au milieu pour déclencher la génération de radicaux libres. Une mesure de fluorescence ( $\lambda$  excitation = 485 nm et  $\lambda$  émission = 520 nm) est effectuée toutes les minutes pendant 30 min.

#### **V-2-5- Test de PFRAP :**

##### **V-2-5-1- Présentation du test de PFRAP :**

La méthode de PFRAP est basée sur la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), ce qui est accompli en présence d'antioxydants. Les substances ayant un potentiel de réduction réagissent avec le ferricyanure de potassium formant du ferrocyanure de potassium qui réagit en outre avec  $\text{FeCl}_3$  pour former un complexe bleu de Prusse intense ayant une absorbance maximale à 700 nm. La quantité du complexe formé est directement proportionnel au pouvoir réducteur de l'échantillon d'essai (**Gupta, 2015**).

##### **V-2-5-2- Protocole du test de PFRAP :**

La méthode de mesure du pouvoir réducteur des échantillons est adaptée à la microplaque 96 puits. Une dilution méthanolique de l'extrait (ou de l'acide ascorbique comme standard) (10  $\mu$ l), un tampon de phosphate (30  $\mu$ l ; 0,2 M, pH 6,6), et 1% de ferricyanure de potassium (30  $\mu$ l) sont ajoutés. La plaque sera incubée à 50°C pendant 20 minutes et 30  $\mu$ l d'acide trichloroacétique à 10% sera ajoutés à chaque puits. L'absorbance sera mesurée à 700 nm après addition de 100  $\mu$ l d'eau distillée et de 20  $\mu$ l de chlorure ferrique à 0,1 %. Les résultats seront exprimés en mg d'équivalent d'acide ascorbique par g d'extrait sec (mg AA/g) Tous les échantillons ont été analysés en trois exemplaires dans au moins trois expériences différentes (**Xiao et al., 2020**).

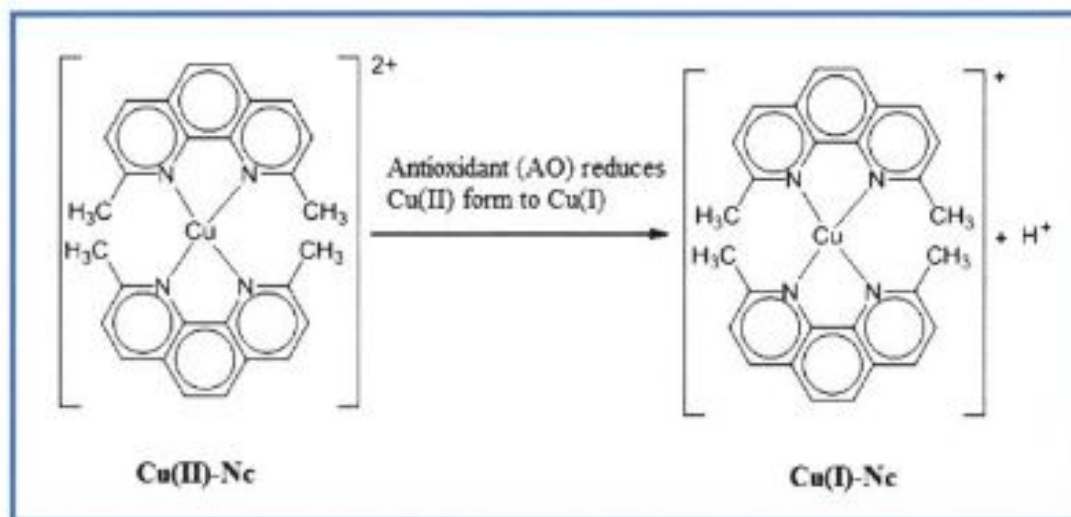
#### **V-2-6- Test de CUPRAC :**

##### **V-2-6-1- Présentation du test de CUPRAC :**

Le CUPRAC est un test basé sur le transfert d'électrons (ET) qui est une méthode largement et populairement utilisée pour déterminer le piégeage complet des radicaux libres, c'est-à-dire la capacité antioxydante totale d'un composé. Cette méthode est basée sur la simple réaction d'oxydoréduction entre les antioxydants. Cette méthode CUPRAC est largement utilisée pour

mesurer la capacité antioxydante des aliments, des plantes, du sérum humain, des échantillons biologiques, des polyphénols alimentaires, des vitamines C et E, Etc. Ce test est simple, fiable, polyvalent et peu coûteux (Sunitha, 2016).

Cette méthode consiste à mélanger la solution antioxydante avec du chlorure de cuivre(II) aqueux, de la néocuproïne alcoolique et un tampon aqueux d'acétate d'ammonium à pH 7, puis à mesurer l'absorbance développée à 450 nm après 30 minutes (Sunitha, 2016).



**Figure 12 :** La réaction du test CUPRAC (Özyürek et al., 2011).

La méthode CUPRAC est avantageuse par rapport aux autres méthodes basées sur le transfert d'électrons. Le test CUPRAC s'est avéré efficace pour les antioxydants de type GSH et thiol en raison de la structure électronique du Cu (II) facilitant une cinétique plus rapide, tandis que la méthode FRAP qui est effectuée à un pH bas s'est avérée insensible au groupe thiol d'antioxydants en raison de inertie chimique par les orbitales à moitié remplies de Fe (III) à spin élevé (Sunitha, 2016).

Les résultats de la méthode CUPRAC, lorsqu'ils sont corrélés avec d'autres tests spectrophotométriques tels que FRAP et DPPH, s'avèrent être des avantages par rapport aux autres méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante des échantillons de plasma et d'urine. La méthode CUPRAC est prédominante pour mesurer la capacité antioxydante totale des fluides biologiques avec d'autres méthodes couramment utilisées (Sunitha, 2016).

#### **V-2-6-2- Protocole du test de CUPRAC :**

Ajouter 1 ml de solution de CuCl<sub>2</sub> 10 mM, 1 ml de néocuproïne 7,5 mM, 1 ml de NH<sub>4</sub>Ac 1 M et X ml de solution neutre antioxydante, puis compléter le volume final à 4,1 ml en utilisant de l'eau distillée. Incuber le mélange réactionnel dans des conditions normales (température ambiante) pendant 30 minutes. Après incubation, l'absorbance sera lue à 450 nm (Sunitha, 2016).

### **V-3- Techniques électrochimiques de l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols :**

Des techniques électrochimiques ont également été appliquées à la détermination de la teneur en antioxydants et de la capacité antioxydante. La voltampérométrie cyclique et la biampérométrie sont les plus largement utilisées (Pisoschi et Negulescu, 2011).

#### **V-3-1- Voltampérométrie cyclique :**

La voltampérométrie cyclique est un type de mesure électrochimique potentiodynamique. Dans les expériences de voltampérométrie cyclique, le potentiel de l'électrode de travail fait l'objet d'une rampe linéaire en fonction du temps. Dans la voltampérométrie cyclique, le potentiel d'une électrode de travail est balayé linéairement d'une valeur initiale à une valeur finale et inversement, tout en enregistrant l'intensité du courant respectif. Lorsque la valeur d'un potentiel donné est atteinte, la rampe de potentiel de l'électrode de travail est inversée. Cette inversion peut se produire plusieurs fois au cours d'une même expérience. Le courant à l'électrode de travail est tracé en fonction de la tension appliquée pour donner le voltampérogramme cyclique (Pisoschi et Negulescu, 2011).

Les paramètres importants obtenus à partir d'un voltampérogramme cyclique sont les intensités des pics cathodiques et anodiques, le potentiel d'oxydation anodique ( $E_a$ ) et le potentiel d'oxydation cathodique ( $E_c$ ). Toutes ces valeurs peuvent être facilement obtenues à partir du voltammogramme. Dans le cas d'un système réversible, les valeurs des intensités des pics cathodiques et anodiques sont égales. Dans le cas d'un système irréversible, seule la présence d'un pic est perceptible sur le voltampérogramme (Pisoschi et Negulescu, 2011).

#### **V-3-2- Méthode des biocapteurs :**

Les oxydoréductases sont les plus souvent utilisées dans les applications de biocapteurs en raison de leurs propriétés de transfert d'électrons pendant la catalyse.

Ces enzymes présentent l'avantage d'être stables et dans certaines situations, ne nécessitent pas des coenzymes ou des cofacteurs. Les applications potentielles des biocapteurs pour l'évaluation du statut antioxydant comprennent la surveillance du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), la surveillance de l'oxyde nitrique (NO), la surveillance du glutathion, la surveillance de l'acide urique, de l'acide ascorbique ou du composé phénolique (Pisoschi et Negulescu, 2011).

Souvent, les polyphénols sont les principaux contributeurs à la capacité antioxydante de plusieurs plantes qui en contiennent. Plusieurs biocapteurs ampérométriques pour la détection des composés phénoliques ont été développés, sur la base d'enzymes, telles que la tyrosinase, la laccase ou la peroxydase. Les biocapteurs pour les composés phénoliques ont été construits en

immobilisant la polyphénol oxydase (PPO) dans des copolymères conducteurs préparés par électropolymérisation du pyrrole avec du polytétrahydrofurane coiffé de thiophène.

Ces biocapteurs enzymatiques permettent d'évaluer la "teneur totale en phénol". Comme la tyrosinase agit sur les groupes hydroxyles des composés phénoliques, la quantité totale des groupes  $\text{OH}$  dans les vins rouges a été obtenue par la détermination de l'activité par des électrodes enzymatiques. Les résultats sont présentés en équivalent d'acide gallique (GAE) en mg/l. Pour la détermination des polyphénols dans les extraits végétaux, un biocapteur ampérométrique à base de peroxydase de raifort a été utilisé (Pisoschi et Negulescu, 2011).

#### **V-3-3- La méthode biamperométrique :**

La méthode biamperométrique est basée sur la mesure du courant circulant entre deux électrodes de travail identiques polarisées à une faible différence de potentiel et immergées dans une solution contenant un couple redox réversible. La mesure biamperométrique indirecte repose sur la réaction de l'analyte avec le couple redox indicateur, sa sélectivité dépendant de la spécificité de la réaction impliquant la forme oxydée ou réduite du couple redox et de l'analyte (Pisoschi et Negulescu, 2011).

#### **V-3-4- La méthode ampérométrique :**

La détermination ampérométrique de l'activité antioxydante était basée sur la réduction du (DPPH) à l'électrode en carbone vitreux.

La méthode ampérométrique consiste à mesurer l'intensité du courant qui circule entre une électrode de travail et une électrode de référence, à une valeur de potentiel fixe (appliquée). Le courant est généré par l'oxydation/réduction d'un analyte électroactif. La valeur du potentiel est maintenue à une valeur fixe par rapport à une électrode de référence (Pisoschi et Negulescu, 2011).

### **V-4- Méthodes chromatographiques de l'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols :**

Les méthodes chromatographiques étaient souvent appliquées aux antioxydants pour la séparation et la détection, et utilisé avant spectrophotométrie ou évaluation électrochimique de la capacité antioxydante totale (Pisoschi et Negulescu, 2011).

#### **V-4-1- Chromatographie en phase gazeuse :**

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est un type courant de chromatographie utilisée pour séparer et analyser les composés qui peut être vaporisé sans décomposition. Le processus de séparation des composés en mélange sont effectués entre une phase stationnaire liquide et une phase mobile gazeuse. La phase mobile est généralement un gaz inerte tel que d'hélium ou de gaz non réactif tel que l'azote (Pisoschi et Negulescu, 2011). La phase stationnaire est une colonne qui

est placée dans le dispositif et contient une phase stationnaire liquide qui est adsorbée sur la surface d'un solide inerte (Coskun, 2016).

La chromatographie en phase gazeuse est une technique simple, multiforme, très sensible et rapidement appliquée pour la séparation extrêmement excellente de très petites molécules. Il est utilisé dans la séparation de très petites quantités d'analytes (Coskun, 2016).

#### **V-4-2- HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) :**

En utilisant cette technique de chromatographie, il est possible d'effectuer des analyses structurales et fonctionnelles et la purification de nombreuses molécules en peu de temps. Cette technique donne des résultats parfaits dans la séparation et l'identification des acides aminés, glucides, lipides, acides nucléiques, protéines, stéroïdes et autres molécules biologiquement actives (Coskun, 2016).

L'HPLC en phase normale utilise une phase stationnaire polaire et une phase mobile non polaire et non aqueuse, et fonctionne efficacement pour séparer les analytes facilement solubles dans les solvants non polaires. L'HPLC en phase inversée utilise une phase stationnaire non polaire et une phase mobile aqueuse modérément polaire. Avec ces phases stationnaires, le temps de rétention est plus long pour les molécules qui sont moins polaires, tandis que les molécules polaires éluent plus facilement. Dans cette technique, l'utilisation de petites particules et l'application d'une pression élevée sur le débit de solvant augmentent le pouvoir de séparation de la HPLC et l'analyse est terminée en peu de temps (Pisoschi et Negulescu, 2011).

Les composants essentiels d'un appareil HPLC sont dépôt de solvant, pompe haute pression, commercial colonne, détecteur et enregistreurs préparés. Durée de séparation est contrôlée à l'aide d'un ordinateur système (Coskun, 2016).

# **Conclusion et perspectives**

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

De nos jours, un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales possède des propriétés biologiques très importantes qui trouvent de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives, et d'autre part les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défense antioxydant. En raison de la toxicité des antioxydants synthétiques, le recours à des phytonutriments doués d'activités antioxydantes s'avère très avantageux et d'actualité.

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de substances naturelles bioactives tels les polyphénols, ces molécules peut exercer un rôle physiologique différent, selon sa constitution chimique, disponibilité biologique et sont métabolisme, suscitent actuellement l'intérêt de plusieurs chercheurs en raison des bénéfices qu'ils pourraient procurer à la santé humaine.

La plupart des tests d'activité antioxydante impliquent l'induction d'une oxydation accélérée en présence d'un promoteur et le contrôle d'une ou plusieurs variables du système de test, par exemple, la température, la concentration d'antioxydant, le pH, etc. Toutefois, les mécanismes d'oxydation peuvent changer lorsque des modifications sont apportées à certaines de ces variables. Par conséquent, il est important d'évaluer les intervalles dans lesquels la quantification de l'activité antioxydante est effectuée pour générer des résultats fiables.

Des études complémentaires s'imposent en vue d'identifier des polyphénols à pouvoir antioxydants hautement efficaces pour des essais cliniques visant à prévenir ou traiter les maladies causées par le stress oxydatif ainsi que des méthodes de criblage à haut débit pour déterminer le comportement antioxydant et/ou prooxydant.



# **Références bibliographiques**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### (A)

- **Abdulla, A., Zhao, X., Yang, F. (2013).** Natural polyphenols inhibit lysine-specific demethylase-1 in vitro. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, **1** (1), 56-63.
- **Abidi, k., Nahal, G. (2016).** Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des plantes médicinales : cas *Peganum harmala*. Mémoire de Master : Biochimie et Biologie Moléculaire. Université de Larbi tébessi-Tébessa.
- **Achat, S., Chibane, M., Dangles, O. (2013).** Polyphénols de l'alimentation ; extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec les ions métalliques. Thèse de Doctorat : Sciences Alimentaires. Université A. Mira-Bejaia.
- **Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007).** Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint bone spine*, **74** (4), 324-329.
- **Ahmed, M., Khan, M. I., Khan, M. R., Muhammad, N., Khan, A. U., & Khan, R. A. (2013).** Role of medicinal plants in oxidative stress and cancer. *Scientific Reports*, **2** (2), 1-3.
- **Akroum, S. (2011).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de Doctorat : Université Mentouri de CONSTANTINE –ALGERIE .
- **Albayrak, S., Aksoy, A., Albayrak, S., & Sagdic, O. (2013).** In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian Journal of Science and Technology (Sciences)*, **37** (1), 1-9.
- **Alkurd, A., Hamed, T. R., Al-Sayyed, H. (2008).** Tannin Contents of selected plants used in Jordan. *Jordan. J. Agric. Sc*, **4**, 265 – 274.
- **Almeida, A. F., Borge, G. I. A., Piskula, M., Tudose, A., Tudoreanu, L., Valentová, K., ... & Santos, C. N. (2018).** Bioavailability of quercetin in humans with a focus on interindividual variation. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **17** (3), 714-731.
- **Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. (2003).** Structure-Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, **76** (1), 55 – 61.
- **Anhê, F. F., Desjardins, Y., Pilon, G., Dudonné, S., Genovese, M. I., Lajolo, F. M., & Marette, A. (2013).** Polyphenols and type 2 diabetes : A prospective review. *PharmaNutrition*, **1** (4), 105-114.
- **Arribas, A. S., Martínez-Fernández, M., Moreno, M., Bermejo, E., Zapardiel, A., & Chicharro, M. (2013).** Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable

- amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes. *Food chemistry*, **136** (3-4), 1183-1192.
- **Asgarpanah, J., & Kazemivash, N. (2012)**. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Coriandrumsativum L.* *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **6** (31), 2340-2345.
  - **Aufrere, J., Theodoridou, K., and Baumont, R. (2012)**. "Valeur alimentaire pour les ruminants des légumineuses contenant des tannins condensés en milieux tempérés." *Productions Animales*, **25** (1), 29.

**(B)**

- **Bartosz, G. (2003)**. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, **9** (1), 5-21.
- **Baudin, B. (2006)**. Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio*, **2** (1), 43-52.
- **Bedard, K., & Krause, K. H. (2007)**. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiologicalreviews*, **87** (1), 245-313.
- **Belkheiri, N. (2010)**. Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat : Chimie-Biologie-Santé. Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- **Berger, M. M. (2006)**. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20** (1), 48-53.
- **Berset, C. (2006)**. Antioxydants phénoliques-Structures, propriétés, sources végétales. In « Les polyphénols en agroalimentaire ». *Lavoisier*, p 1-27.
- **Bisht, K., Wagner, K. H., & Bulmer, A. C. (2010)**. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto-and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*, **278** (1), 88-100.
- **Boldi, A. M. (2004)**. Libraries from natural product-like scaffolds. *Current opinion in chemical biology*, **8** (3), 281-286.
- **Borrego, S., Vazquez, A., Dasí, F., Cerdá, C., Iradi, A., Tormos, C., ...& Camps, J. (2013)**. Oxidative stress and DNA damage in human gastric carcinoma: 8-Oxo-7'8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) as a possible tumor marker. *International Journal of Molecular Sciences*, **14** (2), 3467-3486.
- **Bouguerne, B. (2012)**. Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de Doctorat : Chimie-Biologie-Santé .Université Toulouse III - Paul Sabatier.

- **Bouheroum, M. (2007).** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherium adpressum* et *Ononis angustissima*. Thèse de Doctorat : En Chimie Organique Option : Phytochimie . Université Mentouri de Constantine-Algerie.
- **Brühlmann, C., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.-A., & Testa, B. (2004).** Screening of non-Alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*, *1* (6), 819–829.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 2nd Revised edition. Intercept Ltd. *Médicales Internationales, Paris*, p 227-459.
- **Bruneton, J. (2015).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. 5<sup>ème</sup> édition. Edition Lavoisier Tec & Doc. *Médicales Internationales, Paris*, p 1504 .

(C)

- **Calixto, J. B. (2005).** Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of ethnopharmacology* , *100* (1-2), 131-134.
- **Capasso, A. (2013).** Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum L.* *Molecules*, *18* (1), 690-700.
- **Capiralla, H., Vingtdeux, V., Zhao, H., Sankowski, R., Al-Abed, Y., Davies, P., & Marambaud, P. (2012).** Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and  $A\beta$ -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B/STAT signaling cascade. *Journal of Neurochemistry*, *120* (3), 461-472.
- **Cardenas-Rodriguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Rivera-Espinosa, L., Montesinos Correa, H., Bandala, C., Carmona-Aparicio, L., & Coballase-Urrutia, E. (2013).** Role of oxidative stress in refractory epilepsy: Evidence in patients and experimental models. *International Journal of Molecular Sciences*, *14* (1), 1455-1476.
- **Chakraborty, I., Kunti, S., Bandyopadhyay, M., Dasgupta, A., Chattopadhyay, G. D., Chakraborty, S. (2007).** Evaluation of serum zinc level and plasma SOD activity in senile cataract patients under oxidative stress. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, *22* (2), 109-113.
- **Challacombe, C. A., Abdel-Aal, E. S. M., Seetharaman, K., & Duizer, L. M. (2012).** Influence of phenolic acid content on sensory perception of bread and crackers made from red or white wheat. *Journal of Cereal Science*, *56* (2), 181-188.
- **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.

- **Chaudiere, J., & Tappel, A. L. (1983).** Purification and characterization of selenium-glutathione peroxidase from hamster liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **226** (2), 448-457.
- **Chebil, L. (2006).** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat : Institut National Polytechnique de LORRAINE.
- **Clifford, M. N. (2000).** Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80** (7), 1033-1043.
- **Conrad, J., Vogler, B., Klaiber, I., Roos, G., Walter, U., & Kraus, W. (1998).** Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry*, **48** (4), 647-650.
- **Coskun, O. (2016).** Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, **3** (2), 156.
- **Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2008).** Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. *Edt Blackwell Publishing Ltd* , p 384.
- **Currie, A., Langford, G., McGhie, T., Apiolaza, L.A., Snelling, C., Braithwaite, B. and Vather, R. (2006).** Inheritance of antioxidants in a New Zealand Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Christchurch, New Zealand*, p 218-225.
- **Curtay, J. P., & Robin, J. M. (2000).** Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrition Info*, 1-4.

### (D)

- **Daglia, M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, **23** (2), 174-181.
- **Dai, J., & Mumper, R. J. (2010).** Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, **15** (10), 7313-7352.
- **Dangles, O., Dufour, C., Manach, C., Morand, C., & Remesy, C. (2001).** Binding of flavonoids to plasma proteins. *In Methods in Enzymology*. *Academic Press* , **335**, 319-333.
- **Dangles, O., Dufour, C. (2006).** Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Eds Andersen O and Markham K. *CRC Press* , *Boca Raton*, p 443-469.
- **Dangles, O. (2012).** Antioxidant activity of plant phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance. *Current Organic Chemistry*, **16** (6), 692-714.

- **Dangles, O., & Dufour, C. (2008).** Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health : Recent advances in polyphenol research. Fouad Daayf and Vincenzo Lattanzio , *Blackwell Publishing* , 3 (1) , 67-87.
- **D'archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43 (4), 348.
- **Day, A. J., Bao, Y., Morgan, M. R., & Williamson, G. (2000).** Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 29 (12), 1234-1243.
- **Day, A. J., & Williamson, G. (2001).** Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *British Journal of Nutrition*, 86 (S1), S105-S110.
- **Deby, C., & Goutier, R. (1990).** New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochemical pharmacology*, 39 (3), 399-405.
- **Delattre, J., Beaudeau, J. L., & Bonnefont-Rousselot. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Edition Lavoisier TEC & DOC éditions Médicales Internationales, Paris, 1-3. *Médicales Internationales, Paris*, p 1-23.
- **De Marchi, E., Baldassari, F., Bononi, A., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2013).** Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1-11.
- **Densiov, E.T., Afanas'ev, I.B. (2005).** Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. 1st édition. *Taylor & Francis Group (U.S.A)*, p 703-861.
- **Desmier, T. (2016)** . Les antioxydants de nos jours : Définition et Application .Thèse de Doctorat : Faculté de Pharmacie. Université de Limoges.
- **Djahra, A. B. (2013).** Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du *Marrube blanc* ou *Marrubium vulgare L.* Thèse de Doctorat : Biologie Végétale. Université Badji Mokhtar de Annaba.
- **Donaghy, L., Hong, H. K., Jauzein, C., & Choi, K. S. (2015).** The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of *marine bivalve molluscs*. *Fish & shellfish immunology*, 42 (1), 91-97.
- **Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. (2012).** Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826 (2), 443-457.

- **Dufour, C., Loonis, M., & Dangles, O. (2007).** Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radical Biology and Medicine*, 43 (2), 241-252.
- **Dupas, C. (2009).** Influence des protéines laitières sur le pouvoir antioxydant et la biodisponibilité des polyphénols du café. Thèse de Doctorat : Sciences Alimentaires. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIA).
- **Duran-Bedolla, J., Rodriguez, M. H., Saldana-Navor, V., Rivas-Arancibia, S., Cerbon, M., & Rodriguez, M. C. (2013).** Oxidative stress: production in several processes and organelles during *Plasmodium sp* development. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 2 (2), 93-100.
- **Duthie, G. G., Pedersen, M. W., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Jenkinson, A., McPhail, D. B., & Steele, G. M. (1998).** The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52 (10), 733-736.
- **Dykes, L., & Rooney, L. W. (2006).** Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of Cereal Science*, 44 (3), 236-251.

**(F)**

- **Falany, C. N. (1997).** Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *The FASEB Journal*, 11 (4), 206-216.
- **Faller, A. L. K., & Fialho, E. F. N. U. (2010).** Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23 (6), 561-568.
- **Favier, A. (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin*, 55 (1), 9-16.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*, (11/12), 108-115.
- **Fraga, C. G. (2009).** Plant phenolics and human health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. *John Wiley & Sons Edition*, p 5-13.
- **Fraga, C. J., & Oteiza, P. I. (2011).** Dietary flavonoides : Role of (-) – epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 813 – 82.
- **Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019).** Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants [Working Title]*, 11-18.

**(G)**

- **Gardés-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh., Z., & Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité Chimique*, 91 -96.
- **Garrido, J., & Borges, F. (2013).** Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Research International*, 54 (2), 1844-1858.
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle Ppophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3 (4), 162-169.
- **Ghosh, D., & Konishi, T. (2007).** Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16 (2), 200-208.
- **Goto, M., Ueda, K., Hashimoto, T., Fujiwara, S., Matsuyama, K., Kometani, T., & Kanazawa, K. (2008).** A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(9), 1318-1325.
- **Goudable, J., & Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11 (2), 115-120.
- **Guil-Guerrero, J. L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J. C., Carlosama-Yepez, M., & Ruales, P. (2016).** Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. *Livestock Science*, 189, 32-49.
- **Gupta, D . (2015).** Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6 (2), 546.

**(H)**

- **Ha, T. J., Nihei, K. I., & Kubo, I. (2004).** Lipoxygenase inhibitory activity of octylgallate. *Journal of agricultural and foodchemistry*, 52 (10), 3177-3181.
- **Hajjaj, G. (2017).** Screening phytochimique, etude toxicologique et valorisation pharmacologique de *matricaria chamomilla l.* et de *l'ormenis mixta l.(asteraceae)*. Thèse de Doctorat : Sciences du Médicament .Université Mohammed V, Maroc.
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62 (10), 628-638.
- **Halliwell, B., Zhao, K., & Whiteman, M. (2000).** The gastrointestinal tract: A major site of antioxidant action?. *Free radical research*, 33 (6), 819-830.



- **Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K. (2010).** Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, **11** (4), 1365-1402.
- **Havsteen, B. H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, **96** (2-3), 67-202.
- **Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **13** (10), 572-584.
- **Heinrich, M., & Lee Teoh, H. (2004).** Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*, **92** (2-3), 147–162.
- **Hellsten, Y., Svensson, M., Sjödin, B., Smith, S., Christensen, A., Richter, E. A., & Bangsbo, J. (2001).** Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, **31** (11), 1313-1322.
- **Hendrich, A. B. (2006).** Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds 1. *Acta Pharmacologica Sinica*, **27** (1), 27-40.
- **Hennebelle, T. (2006).** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota pseudodictamnus*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *lippia alba* (Verbénacées) . Thèse de Doctorat : Chimie Organique et Macromoléculaire. Université Lille.
- **Holderness, J., Hedges, J.F., Daughenbaugh, K., Kimmel, E., Graff, J., Freedman, B. Jutila, M.A. (2008).** Response of  $\gamma\delta$  T cells to plant-derived tannins. *Critical Review of Immunology*, **28** (5), 377-402.
- **Hollman, P. C., Tijburg, L. B., & Yang, C. S. (1997).** Bioavailability of flavonoids from tea. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **37** (8), 719-738.
- **Houée-Levin, C ; Sicard-Roselli, C ; et Bergès, J. (2005).** Chimie et biochimie radicalaire. Echelles, ISBN 2-7011-3717-9, p 86-10.
- **Hu, Q., & Luo, Y. (2016).** Polyphenol-chitosan conjugates: Synthesis, characterization, and applications. *Carbohydrate Polymers*, **151**, 624-639.
- **Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002).** Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (7), 1815-1821.

- **Hwang, O. (2013).** Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Experimental neurobiology*, **22** (1), 11-17.

**(I)**

- **Iwueke, A. V., &Nwodo, O. F. C. (2008).** Antihyperglycaemic effect of aqueous extract of *Daniella oliveri* and *Sarcocephalus latifolius* roots on key carbohydrate metabolic enzymes and glycogen in experimental diabetes. *Biokemistri*, **20** (2),63-70.

**(J)**

- **Japón-Luján, R., Janeiro, P., & Luque de Castro, M. D. (2008).** Solid– Liquid transfer of biophenols from olive leaves for the Enrichment of edible oils by a dynamic ultrasound-assisted approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56** (16), 7231-7235.
- **Jena, N. R. (2012).** DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *Journal of biosciences*, **37** (3), 503-517.
- **Johnson, I. T., Williamson, G., & Musk, S. R. R. (1994).** Anticarcinogenic factors in plant foods: a new class of nutrients?. *Nutrition Research Reviews*, **7** (1), 175-204.

**(K)**

- **Kanter, M., Meral, I., Dede, S., Cemek, M., Ozbek, H., Uygan, I., &Gunduz, H. (2003).** Effects of *Nigella sativa L.* and *Urtica dioica L.* on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl<sub>4</sub>-treated rats. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, **50** (5), 264-268.
- **Karou, D., Dicko, M. H., Simpoire, J., &Traore, A. S. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, **4** (8), 823-828.
- **Kaushal, N., &Kudva, A. K. (2013).** Oxidative stress and inflammation :“The Lessers of Two Evils” in Carcinogenesis. *Journal of Postdoctoral Research*, **1** (2), 89-101.
- **Kawsar ,S. M. A., Hug, E., Nahar ,N.,Ozeki Y. (2008).** Identification and quantification of phenolic acids in *Macrotyloma uniflorum* by reversed phase – HPLC. *American Journal of Plant Physiology*, **3** (4), 165-172.
- **Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ayaz, M., Ajmal, M., Ellahi, M. Y., &Khalique, A. (2017).** Antioxidant capacity and fatty acids characterization of heat treated cow and buffalo milk. *Lipids in Health and Disease*, **16** (1), 163.
- **Koren, H. S. (1995).** Associations between criteria air pollutants and asthma. *Environmental Health Perspectives*, **103** (6), 235-242.

- **Krook, M. A., & Hagerman, A. E. (2012).** Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system. *Food Research International*, **49** (1), 112-116.
- **Kubo, I., Masuoka, N., Xiao, P., & Haraguchi, H. (2002).** Antioxidant activity of dodecyl gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (12), 3533–3539.
- **Kuhnau, J. (1976).** Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*, **24**, 117-191.
- **Kuka, S., Tatarkova, Z., & Kaplan, P. (2012).** Oxidative damage to proteins and lipids during ageing. *Acta Medica Martiniana*, **12** (1), 5-11.
- **Kumar, S., Pandey, A.K. (2013).** Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Hindawi The Scientific World Journal*, (ID: 162750) , 1-16.
- **Kusano, C., & Ferrari, B. (2008).** Total antioxidant capacity: A biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecularbiology*, **7** (1), 1-15.

**(L)**

- **Lacolley, P. (2007).** Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. *Edition John Libbey Eurotext* , p 312.
- **Lamina, S., Ezema, C. I., Theresa, A. I., & Anthonia, E. U. (2013).** Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, **2** (2), 83-91.
- **Lee, M. J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F. Y., Prabhu, S., ... & Yang, C. S. (2002).** Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (–)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, **11** (10), 1025-1032.
- **Lev, N., Gilgun-Sherki, Y., Offen, D., Melamed, E. (2007).** Oxidative stress and neurodegenerative disorders .1st Edition , G. Ali Qureshi S. Hasan Parvez. *Elsevier Science*, Amsterdam, p 283-295.
- **Lin, C. M., Chen, C. S., Chen, C. T., Liang, Y. C., & Lin, J. K. (2002).** Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294** (1), 167-172.
- **Liochev, S. I. (2013).** Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **60**, 1-4.
- **Liu, R. H. (2007).** Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, **46** (3), 207-219.

- **Longo, L., Vasapollo, G., & Rescio, L. (2005).** Identification of anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (5), 1723-1727.
- **Luthria, D. L., Mukhopadhyay, S. Krizek, D. T. (2006).** Content of total phenolics and phenolic acids in Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 771-777.

**(M)**

- **Ma, P., Wu, Y., Zeng, Q., Gan, Y., Chen, J., Ye, X., & Yang, X. (2013).** Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food and Chemical Toxicology*, **58**, 177-183.
- **Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D. K. (1995).** Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives. *CRC Press*, P 65.
- **Maes, M., Galecki, P., Chang, Y. S., & Berk, M. (2011).** A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **35** (3), 676-692.
- **Maghzal, G. J., Krause, K. H., Stocker, R., & Jaquet, V. (2012).** Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, **53** (10), 1903-1918.
- **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79** (5), 727-747.
- **Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005).** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81** (1), 230S-242S.
- **Manoj, K. M., Gade, S. K., & Mathew, L. (2010).** Cytochrome P450 reductase: a harbinger of diffusible reduced oxygen species. *PLoS One*, **5** (10), e13272.
- **Mantena, S. K., Baliga, M. S., & Katiyar, S. K. (2006).** Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*, **27** (8), 1682-1691.
- **Marreiro, D. D. N., Cruz, K. J. C., Morais, J. B. S., Beserra, J. B., Severo, J. S., & De Oliveira, A. R. S. (2017).** Zinc and oxidative stress: current mechanisms. *Antioxidants*, **6** (2), 24.
- **Martin, S., & Andriantsitohaina, R. (2002).** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *In Annales de Cardiologie et D'angiologie*, **5** (6), 304-315.

- **Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N., &Teixeira, J. A. (2011).** Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, **29** (3), 365-373.
- **Mates, J. M. (2000).** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, **153** (1-3), 83-104.
- **Meda, N. T. R., Bangou, M. J., Bakasso, S., Millogo-Rasolodimby, J., &Nacoulma, O. G. (2013).** Antioxidant activity of phenolic and flavonoid fractions of *Cleome gynandra* and *Maerua angolensis* of Burkina Faso. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **3** (2), 36.
- **Mena, S., Ortega, A., & Estrela, J. M. (2009).** Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, **674** (1-2), 36-44.
- **Mima, A. (2013).** Inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy: new insights on its inhibition as new therapeutic targets. *Journal of Diabetes Research*, 2013.
- **Molino, S., Dossena, M., Buonocore, D., Ferrari, F., Venturini, L., Ricevuti, G., &Verri, M. (2016).** Polyphenols in dementia: From molecular basis to clinical trials. *Life Sciences*, **161**, 69-77.
- **Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J. P., &Canaud, B. (2002).** Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, **23** (5), 201-208.
- **Mulvihill, E. E. & Huff, M. W. (2010).** Antiatherogenic properties of flavonoids : Implications for cardiovascular health Canadian. *Journal of Cardiology*, **26**, 17A - 21A.

**(N)**

- **Nagao, A., Seki, M., & Kobayashi, H. (1999).** Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **63** (10), 1787-1790.
- **Nauciel, C., Vilde, J-L. (2005).** Bactériologie médicale. 2ème édition. *Masson. Paris*, p 78,97.
- **Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S., & Kakuda, Y. (2006).** Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, **48** (2), 176-181.
- **Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000).** The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, **17** (3), 215-234.
- **Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003).** Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. *Journal of Natural Products*, **66** (7), 1022-1037.
- **Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001).** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **74** (4), 418-425.

- **Nimse, S. B., et Pal, D. (2015).** Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, **5** (35), 27986–28006.
- **Nowicka, B., & Kruk, J. (2012).** Plastoquinol is more active than  $\alpha$ -tocopherol in singlet oxygen scavenging during high light stress of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1817** (3), 389-394.

**(O)**

- **Olthof, M. R., Hollman, P. C., & Katan, M. B. (2001).** Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*, **131** (1), 66-71.
- **Orliaguet, G., Gall, O., & Benabess-Lambert, F. (2013).** Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens . *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*, **17** (5), 228-237.
- **Oroian, M., & Escriche, I. (2015).** Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, **74**, 10-36.
- **Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49** (10), 4619-4626.
- **Öztürk, M., Duru, M. E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., & Özler, M. A. (2011).** In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*, **49** (6), 1353-1360.

**(P)**

- **Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009).** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and Cellular Longevity*, **2** (5) , 270-278.
- **Pasquier, C. (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, 1995 (276), 87-92.
- **Penna, C., Mancardi, D., Rastaldo, R., & Pagliaro, P. (2009).** Cardioprotection: A radical view: Free radicals in pre and postconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1787** (7), 781-793.
- **Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009).** Phenolics: From chemistry to biology, **14** (6) , 2202-2211.
- **Pérez-Pérez, E., Vit, P., & Huq, F. (2013).** Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity. *Int J Med Plant Altern Med*, **1** (4), 63-72.

- **Perron, N. R. & Brumaghim, J. L. (2009).** A Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*, **53**, 75–100.
- **Pietta, P. G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63** (7), 1035-1042.
- **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16** (4), 233-239.
- **Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011).** Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, **1** (1), 106.
- **Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015).** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**, 55-74.
- **Pizza, V., Iorio, E., & Capasso, A. (2013).** Parkinson's disease and oxidative stress: evaluation by BAP and d-ROMs tests , *1*, 34-38.
- **Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013).** Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013,1-11.
- **Portet, B. (2007).** Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum var. berbicense*. Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE III -Paul sabatier.
- **Portes ,E. (2008).** Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse de Doctorat : Université de BORDEAUX.
- **Pradeep, P. M., & Sreerama, Y. N. (2015).** Impact of processing on the phenolic profiles of small millets: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia. *Food Chemistry*, **169**, 455-463.

**(Q)**

- **Qin, C., Li, Y., Niu, W., Ding, Y., Zhang, R., & Shang, X. (2010).** Analysis and characterisation of anthocyanins in mulberry fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, **28** (2), 117-126.
- **Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2013).** Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, **68** (1), 125-131.

**(R)**

- **Rahman, K. (2007).** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinica Interventions in Aging*, 2 (2),36- 219.
- **Ralston, L., Subramanian, S., Matsuno, M., & Yu, O. (2005).** Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. *Plant Physiology*, 137 (4), 1375-1388.
- **Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. R. (2006).** Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113 (3), 189-207.
- **Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., & Keen, C. L. (2000).** Cocoa inhibits platelet activation and function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72 (1), 30-35.
- **Rezaire, A. (2012).** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de Doctorat : Santé, Environnement et société dans les Amériques. Université des Antilles et de la Guyane.
- **Rochette, L., Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J. C., Lorgis, L., Cottin, Y., & Vergely, C. (2013).** Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?. *Pharmacology & Therapeutics*, 140 (3), 239-257.
- **Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011).** Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412 (5-6), 410-424.
- **Roede, J. R., & Jones, D. P. (2010).** Reactive species and mitochondrial dysfunction: Mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51 (5), 380-390.
- **Rofi, A., Fatchiyah, F., Rahayu, P., Muhyi, R., Sumitro, S. B. (2013).** Reactive oxygen species, NF- levels in tissue of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 2 (2), 143-147.
- **Roupe, K. A., Remsberg, C. M., Yáñez, J. A., & Davies, N. M. (2006).** Pharmacometrics of stilbenes: seguing towards the clinic. *Current Clinical Pharmacology*, 1 (1), 81-101.

**(S)**

- **San Miguel-Chávez, R. (2017).** Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. *Phenolic Compounds – Biological*, 59-74.



- **Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., & Borderías, A. J. (2007).** Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. *Food Chemistry*, **101** (1), 372-378.
- **Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C., & Masella, R. (2007).** Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanità* , **43** (4), 394.
- **Šaponjac, V. T., Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., & Djilas, S. (2016).** Detection of bioactive compounds in plants and food products. In *Emerging and traditional technologies for safe, Healthy and Quality Food* . Springer, Cham, p 81-109.
- **Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire, Éd Tec & Doc. Coll. *Sci. & Techn. Agroaliment* , Lavoisier, Paris, p 2-10.
- **Savini, I., Catani, M. V., Evangelista, D., Gasperi, V., & Avigliano, L. (2013).** Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *International Journal of Molecular Sciences*, **14** (5), 10497-10538.
- **Sayre, L. M., Moreira, P. I., Smith, M. A., & Perry, G. (2005).** Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, **41** (2), 143-164.
- **Scalbert, A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30** (12), 3875-3883.
- **Schepens, M. A., Roelofs, H. M., Peters, W. H., & Wanten, G. J. (2006).** No evidence for oxidative stress in patients on home parenteral nutrition. *Clinical Nutrition*, **25** (6), 939-948.
- **Serdar, Z., Aslan, K., Dirican, M., Sarandöl, E., Yeşilbursa, D., & Serdar, A. (2006).** Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clinical Biochemistry*, **39** (8), 794-803.
- **Setchell, K. D., Faughnan, M. S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N. M., Wolfe, B. E., ... & Cassidy, A. (2003).** Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of <sup>13</sup>C-labeled tracers in premenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **77** (2), 411-419.
- **Shacter, E. (2000).** Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, **32** (3-4), 307-326.
- **Shah, P., & Modi, H. A. (2015).** Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *Int J Res Appl Sci Eng Technol*, **3** (6), 636-41.
- **Shin, S. M., Yang, J. H., & Ki, S. H. (2013).** Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. *Oxidative Medicine and Cellular longevity*, 2013.
- **Simon, H. U., Haj-Yehia, A., & Levi-Schaffer, F. (2000).** Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, **5** (5), 415-418.

- **Singh, S. B. (2012).** Antibiotic Discovery and Development. Editors: Dougherty, Thomas J., Pucci, Michael J: *Springer*, p 821-841.
- **Sökmen, B. B., Aydın, S., & Kınalıoğlu, K. (2012).** Antioxidant and antibacterial properties of a lichen species *Diploschistes scruposus* (Schreb.) Norman. *IUFS Journal of Biology*, **71** (1), 43-51.
- **Sorg, O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? . *Comptes Rendus Biologies*, **327** (7), 649-662.
- **Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E. S., Srail, S. K., & Rice-Evans, C. (1999).** The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS letters*, **458** (2), 224-230.
- **Subedi, A., Amatya, M. P., Shrestha, T. M., Mishra, S. K., & Pokhrel, B. M. (2012).** Antioxidant and antibacterial activity of methanolic extract of *Machilus Odoratissima*. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, **8** (1), 73-80.
- **Sumaya Martinez, M. (2004).** Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation (Doctoral dissertation, Brest).
- **Sunitha, D. (2016).** A review on antioxidant methods .*Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **14**, 22-32 .

**(T)**

- **Topçu, G., Kusman, T., (2014).** *Lamiaceae* family plants as a potential anticholinesterase source in the treatment of Alzheimer's disease. *BezmialemSci* , 1, 1–25.
- **Tinggi, U. (2008).** Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine*, **13** (2), 102-108.

**(V)**

- **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39** (1), 44-84.
- **Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T. (2007).** Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química nova.* , **30** (5) ,1323-1338.
- **Venditti, P., Di Stefano, L., & Di Meo, S. (2013).** Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, **13** (2), 71-82.

**(W)**

- **Weichselbaum, E., & Buttriss, J. L. (2010).** Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin*, **35** (2), 157-164.
- **Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M. D., & Daniel, H. (2000).** Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, **60** (14), 3823-3831.
- **Williamson, G., & Clifford, M. N. (2010).** Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?. *British Journal of Nutrition*, **104** (S3), S48-S66.
- **Wollgast, J., & Anklam, E. (2000).** Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, **33** (6), 423-447.

**(X)**

- **Xiang, Q., Wang, Y., Wu, W., Meng, X., Qiao, Y., Xu, L., & Liu, X. (2013).** Carnosic acid protects against ROS/RNS-induced protein damage and upregulates HO-1 expression in RAW264. 7 macrophages. *Journal of Functional Foods*, **5** (1), 362-369.
- **Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020).** Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, **1**(1), 60–69.

**(Y)**

- **Yamaguchi, M. U., Garcia, F. P., Cortez, D. A. G., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., & Nakamura, C. V. (2011).** Antifungal effects of ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Antonie Van Leeuwenhoek*, **99** (3), 507-514.
- **Yamanaka, N., Oda, O., & Nagao, S. ((1997).** Green tea catechins such as (–)-epicatechin and (–)-epigallocatechin accelerate Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS letters*, **401** (2-3), 230-234.
- **Yilmaz, Y. (2006).** Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, **17** (2), 64-71.
- **Young, J. F., Nielsen, S. E., Haraldsdóttir, J., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P., ... & Dragsted, L. O. (1999).** Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **69** (1), 87-94.

**(Z)**

- **Zeghad, N. (2018).** Evaluation des propriétés biopharmacologiques, standardisation chimique et valorisation des agrores sources fonctionnelles cas de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* .Thèse de Doctorat : Biotechnologie Végétale.Université Mentouri Constantine.
- **Zelko, I. N., Mariani, T. J., &Folz, R. J. (2002).** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, **33** (3), 337-349.
- **Zerargui, F. (2015).** Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis L.* et caractérisation des substances bioactives. Thèse de Doctorat : Biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- **Zhao, H. X., Zhang, H. S., & Yang, S. F. (2014).** Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. *Food Science and Human Wellness*, **3** (3-4), 183-190.
- **Zhao, Y., Dou, J., Wu, T., &Aisa, H. A. (2013).** Investigating the antioxidant and acétylcholinestérase inhibition activities of *Gossypium herbaceam*. *Molecules*, **18** (1), 951-962.

<b>NOM ET PRENOM :</b> - HEROUAL Khadidja - FILALI Sara - MEGUELLATI Sara	<b>DATE DE SOUTENANCE</b> 17 SEPTEMBRE 2020
<b>TITRE :</b> LES POLYPHENOLS : STRUCTURE, POUVOIR ANTIOXYDANT ET METHODES <i>IN VITRO</i> DE L'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	
<b>NATURE DE MASTER :</b> Sciences Biologiques <b>OPTION :</b> Toxicologie	
<p style="text-align: center;"><b>RESUME</b></p> <p>De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. L'utilisation thérapeutique des plantes est partie intégrante des traditions de toutes les cultures. La valorisation médicinale de ces pratiques passe notamment par l'isolement et l'identification de nouvelles molécules. Les études des métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des tissus végétaux. C'est le cas notamment des composés phénoliques qui font l'objet de notre étude, composés largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydant et anti radicalaires.</p> <p>Le but de cette étude consiste non seulement à renforcer les données phytochimiques des polyphénols, mais aussi à mettre en évidence l'activité antioxydante, antiradicalaire et d'autres activités biologiques des polyphénols et leur intérêt sur la santé.</p> <p>L'activité antioxydante et antiradicalaire des polyphénols pourra être évaluée par plusieurs méthodes par exemple des méthodes spectrophotométrique, tels que le test au radical libre DPPH, le test au radical libre ABTS, la FRAP...Etc, des techniques électrochimiques ainsi que par des méthodes chromatographiques tel que la chromatographie sur phase gazeuse et l'HPLC.</p> <p>Ce travail a fourni de nouvelles connaissances ethnopharmacologiques et phytochimiques au sujet des plantes médicinales et constitue une contribution à l'étude du rôle des polyphénols naturels dans la régulation du stress oxydatif.</p>	
<b>Mots clés:</b> Stress oxydant, radicaux libres, antioxydante, polyphénols, flavonoïde DPPH, ABTS.	
<b>LABORATOIRE DE RECHERCHE :</b> - Génie Microbiologique et Applications. - Laboratoire de Biologie et d'Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri, Constantine1	
<b>Président du jury :</b> A. MENAD <b>Rapporteur</b> : R. BOULDJADJ <b>Examineur</b> : R. BOULKANDOUL	
Pr. Université Mentouri Constantine1 MAA. Université Mentouri Constantine1 MAA. Université Mentouri Constantine1	