



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
كلية علوم الطبيعة والحياة

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante d'une
plante médicinale (*Diplotaxis harra*).

Présenté par :

Le : 18/06/2023

- Saidi Douaa Elferdous
- Boulcherab Inès
- Zaiter Rachik

Jury d'évaluation :

Président du jury : Pr. BENSEGUENI A. (Professeur- Université Constantine 1).

Examineur : Dr.GUENDOUCHE A. (MCB – Université Constantine 1).

Encadreur : Dr.MOSBAH A. (MCA – Université Constantine 1).

Année universitaire

2022-2023

Remerciements

Au nom d'Allah le Très Miséricordieux, le Plus Miséricordieux, et que la prière et la paix soient sur le meilleur de la création de Dieu Muhammad que la prière et la paix de Dieu soient sur lui. Alhamdo li Allah, qui nous a donné la force, la volonté et le courage, et nous a donné toutes les voies et moyens pour mener à bien le projet de fin d'études.

*Nous remercions du fond de nos cœurs notre cher encadreur Mme. **Dr. Asma Mosbah** (Maitre de conférences, université Constantine 1, UMF1). Nous apprécions la diligence et la conscience professionnelle avec lesquelles vous nous avez accompagnés pour mener à bien ce travail de la première étape à la dernière. Merci pour votre soutien, votre compréhension et votre grande gentillesse. Merci pour vos précieux conseils et votre confiance en nous.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de notre jury, Monsieur **BENSEGUENI Abderrahmene** (Professeur Université Frères Mentouri, Constantine 1) et Madame **GUENDOUZE Assia** (maitre de conférence « B » à l'Université Frères Mentouri Constantine 1) qui nous ont fait l'honneur d'avoir accepté d'évaluer notre travail.*

*Nous remercions le doctorant **Bada Mohamed Yahia Zerieb** pour son assistance et sa gentillesse tout au long de notre travail.*

Nous tenons à remercier tous les membres des laboratoires de biochimie pour leur gentillesse et leur aide à la réussite de notre recherche, et n'oublions pas également laboratoires de biochimie appliquée, et tous nos professeurs de la faculté des sciences de la nature et de la vie pendant cinq années de notre parcours académique à l'université Constantine 1, UMF1.

Dédicace

Merci dieu le tout miséricordieux, ton amour et tes grâces à mon égard m'ont donné la persévérance et le courage pour accomplir ce travail.

*À MA CHERE MERE **Zahtani Souad***

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu m'as consenti pour mon instruction et mon bien être. Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me porte depuis mon enfance et j'espère que ta bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes rêves tant formulés, le fruit de tes innombrables sacrifices „Je suis fier d'être ta fille, Maman. Ma vie, Puisse Dieu, le Très Haut, t'accorder santé, bonheur et longue vie. Je t'aime

*À MON TRES CHER PERE **Saidi Aissa***

À mon soutien et à mon âme, à la personne qui me donne de la force, à la personne qui fait l'impossible pour réaliser tout ce que je veux. Père, les mots ne suffisent pas pour te remercier pour ce que tu m'as donné depuis mon enfance et pour mon soutien continu pour terminer mes études et réussir dans ma vie. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension. Je te dédie ce travail, et j'espère que tu seras fier de moi. J'espère que tes objectifs seront atteints à travers moi. Je t'aime, le plus grand homme de ma vie. Je prie Dieu que tu restes à mes côtés et que Dieu te donne bonne santé et longévité

*À mes très chers frères **chihabe** et **zaki** et ma seule sœur **Zahra**, Je suis très heureux de vous avoir dans ma vie. Merci de vous joindre à moi et de m'appuyer.*

*À ma chère tante **Wafia** et tante **Faiza**, à mon cher oncle **Rachid** qui m'ont soutenu dans mes moments difficiles et dans ma carrière universitaire, merci du fond du mon cœur.*

Je remercie aussi mon grand-père de mon père et ma grand-mère et mon grand-père de ma mère et je les appelle miséricorde et pardon. et ma grand-mère de mon père que dieu lui accorde la santé et le contentement

*Ma chère tante **Nadia**, votre perte nous attriste, je prie **ALLAHE** que vous soyez au paradis. Tu resteras toujours dans nos cœurs*

*À mon trinôme **Rachik** et **Inès** qui a partagé avec moi les moments difficiles et les beaux souvenirs durant ces années d'études. Merci énormément pour ton soutien moral, ta patience et ta compréhension tout au long de ce projet.*

À toute ma grande famille, mes collègues et mes chers amis. À toutes celles et à tous ceux qui m'aiment

Douaa

Dédicace

Avec la générosité et l'aide d'ALLAH Le majestueux qui m'a donné la patience, le courage et la santé, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

*À celui qui ne cesse de se sacrifier pour moi, à ma fierté et mon bonheur, à mon très cher père **Yaffer**, toi qui as toujours cru en moi, je suis si fière d'être la fille d'un tel homme. L'homme fort, confiant et au cœur pur. Merci pour ta patience, tes encouragements et tes orientations durant toutes mes années d'étude. Ce travail, et ce que je suis aujourd'hui sont le fruit de tous les efforts que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance. Que Dieu te donne une longue et joyeuse vie.*

*À celle qui m'a donné la tendresse, l'amour, et la confiance, à la source de mes efforts qui n'a jamais cessé de prier pour moi, à ma très chère maman **Mounia**. Avec un énorme plaisir, et une immense joie, je dédie ce travail à toi maman pour ta permanente présence à mes côtés et ton soutien tout au long de ma vie. Je t'aime d'un amour inconditionnel et je ne te remercierais jamais assez pour tous tes sacrifices. Que dieu, le tout puissant, te préserve et t'accorde le bonheur, la santé et une longue vie.*

*À mon cher frère **Borhene Abdeldjalil** et ma chère sœur **Nardjess**, je leurs souhaite beaucoup de bonheur et de réussites dans leurs vie.*

*À mon grand-père, **Salah** que dieu le garde pour nous, et à ma chère tante **Alia**.*

*À l'âme pure de mes grands-mères **Sakina** et **Arafa**, à l'âme pure de mon grand-père **Djamel Eddine** et à l'âme pure de ma tante **Amel**, comme j'aimerais que vous soyez avec moi le jour de ma remise des diplômes, puissiez-vous reposer en paix, que dieu les garde dans son paradis.*

*À mon trinôme : **Douaa** et **Rachik**, merci de ne pas avoir lâché prise, et d'avoir tenu bon jusqu'au bout ... ce n'ait pas facile, mais on y est quand même arrivé.*

À toute ma famille, mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines. À mes enseignants, mes amis, mes collègues et tous ceux qui m'ont aidé durant mon parcours.

Inès

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

A LA MEMOIRE DE MA MÈRE :

Je dédie entièrement ce travail à ma mère :

Saker Chafia

Paix à son âme, ton absence aujourd'hui ma beaucoup marqué, tu es mon pilier, mon exemple, et ma plus grande force, et surtout votre amour n'a cessé malgré ton absence dans ce bas monde, merci de n'avoir jamais douté de moi.

Tout ce que j'espère, c'est que tu sois fière de moi aujourd'hui.

À Mon CHERE PÈRE :

*Je dédie cette thèse à mon très cher père : **Zaiter Lahcene***

Vous avez toujours pour moi un ensemble du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à vous honorer

Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension, ton soutien moral et physique fait une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Ce modeste travail est le fruit de tous tes sacrifices que tu as déployés pour mon éducation.

Je tiens dédie mon mémoire à mes chères sœurs :

Esma, Sara, Selma, et ma jumelle Manar

Et pour mes chers frères : Hichem, Habib, Mofdi

*À mon trinôme : **Douaa** et **Ines**, nous avons passé des beaux souvenirs ensembles, je vous souhaite le meilleur dans votre vie.*

À MON ENCADRANTE :

Je tenais vivement a remercié mon encadrante Madame Mosbah Asma " merci à votre bienveillance et votre aide, votre professionnalisme nous aider à mener ce projet.

Rachik

Résumé

Le présent travail de recherche a porté sur le screening phytochimique des métabolites secondaire des extraits de la plante *Diplotaxis harra* et l'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* ; avec un test enzymatique ; inhibition de l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR) et un test non enzymatique ; effet scavenger du radical hydroxyle (OH•).

Le screening phytochimique des extraits (méthanolique, éther de pétrole, hexane, dichlorométhane) des parties aériennes : feuilles, fleurs, tiges, de la plante, a mis en évidence une richesse en tanins, coumarines et alcaloïdes.

L'activité inhibitrice de l'enzyme xanthine oxydoréductase (enzyme génératrice des espèces réactives de l'oxygène) a montré que les extraits méthanoliques des différentes parties de la plante étudiées (MeOH Fe, MeOH Fl et MeOH Ti) possèdent un pouvoir inhibiteur important contre l'enzyme XOR. De plus, le deuxième test de piégeage du radical hydroxyle (OH•) a révélé que l'extrait MeOH de feuilles possède la plus forte capacité inhibitrice du radical hydroxyle.

En conclusion, nos travaux de recherche ont permis de montrer que les extraits MeOH des tiges et des fleurs de la plante *Diplotaxis harra* ont un intérêt thérapeutique important comme agents antioxydants.

Mots clés : *Diplotaxis harra*, screening phytochimique, métabolite secondaire, activité anti-oxydante, xanthine oxydoréductase (XOR), radical hydroxyle (OH•).

Abstract

The present research work focused on the phytochemical screening of secondary metabolites of *Diplotaxis harra* plant and the evaluation of anti-oxidant activity, *in vitro*; using an enzymatic assay, inhibition of xanthine oxydoréductase (XOR) enzyme, and a non-enzymatic assay; scavenging effect of hydroxyl radical (OH•).

Phytochemical screening of the extracts (methanol, petroleum ether, hexane and dichloromethane) of the aerial parts: leaves, flowers, stems of the plant, showed a richness in tannins, coumarin and alkaloids.

The inhibitory activity of xanthine oxydoreductase enzyme (enzyme generating reactive oxygen species) indicated that the methanol extract of different parts of the plant (MeOH Fe, MeOH Fl and MeOH Ti) showed the strong inhibitory power against XOR enzyme. In addition, the second assay of the hydroxyl radical (OH•) scavenging revealed that the leaf MeOH extract had the highest inhibitory capacity of the hydroxyl radical.

In conclusion, our work has shown that the MeOH extracts of the *Diplotaxis harra* stems and flowers have an important therapeutic interest as antioxidant agents.

Keywords: *Diplotaxis harra*, phytochemical screening, secondary metabolite, anti-oxidant activity, xanthine oxydoreductase (XOR), hydroxyl radical (OH•).

الملخص

ركز العمل البحثي الحالي على الفحص الكيميائي النباتي للمستقلبات الثانوية لمستخلصات النبتة *Diplotaxis harra* وتقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر؛ مع إجراء اختبار إنزيمي؛ تثبيط إنزيم xanthine oxydoréductase (XOR) واختبار غير إنزيمي؛ تأثير النقاوي على جذور الهيدروكسيل (OH•).

أظهر الفحص الكيميائي النباتي للمستخلصات (الميثانول، الإيثر النفطي، الهكسان، ثنائي كلورو الميثان) للأجزاء الهوائية: الأوراق والزهور وسيقان النبات، ثراءً في العفص والكومارينوالقلويدات.

أظهر النشاط المثبط لإنزيم xanthine oxydoreductase (إنزيم يولد أنواع الأكسجين التفاعلية) أن مستخلصات الميثانول للأجزاء المختلفة من النبات التي تمت دراستها (MeOH Fe و MeOH Fl و MeOH Ti) لديها قوة مثبطة قوية ضد إنزيم XOR. بالإضافة إلى ذلك، كشف الاختبار الثاني لفتح جذر الهيدروكسيل (OH•) أن مستخلص MeOH الورقي يتمتع بأعلى قدرة تثبيطية لجذور الهيدروكسيل.

في الختام، أظهر عملنا أن مستخلصات MeOH من سيقان وزهور نبات *Diplotaxis harra* لها اهتمام علاجي مهم كمضادات للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Diplotaxis harra*، الفحص الكيميائي النباتي، المستقلب الثانوي، النشاط المضاد للأكسدة، xanthine oxydoréductase (XOR)، جذر الهيدروكسيل (OH•).

Liste des abréviations

ADP = adénosine-diphosphate

AMP = adénosine monophosphate

Arg = argénin acid

ATP = adénosine triphosphate

C = carbone

CCR = cardio cerebral resuscitation

C₅H₈ = formule brute d'isoprène

C₁₀H₁₆ = les monoterpènes sont composées de 2 unités d'isoprène

C₁₅H₂₄ = les sesquiterpènes sont composées de 3 unités d'isoprène

C₂₀H₃₂ = les diterpènes sont composées de 4 unités d'isoprène

C₃₀H₄₈ = les triterpènes sont composées de 6 unités d'isoprène

C₃₅H₅₆ = les sesquaterpènes sont composées de 7 unités d'isoprène

C₄₀H₆₄ = les tétraterpènes sont composées de 8 unités d'isoprène

CHC₁₃ = chloroforme

Cu = cuivre

CN = cranial nerve

COX - 2 = cyclooxygenase -2

DEX = la dexaméthasone

DHE = extrait diplotaxishorra

e⁻ = électron

EC = enteric coated

ERO = espèces réactives de l'oxygène

EtOH = l'éthanol

FAD = flavine adénine dinucléotide

Fe²⁺ = ions ferreux

Fe³⁺ = ferrique

Glu = glutamic acid

GLX - 1 = glyoxalase

GRAM = technique de coloration

GSH = glutathion

GSMPX = glutathion peroxydase

GSSG = le disulfure glutathion
GTP = guanosine triphosphate
HCT = l'hématocrite.
HeG2 = hépatoma G2
HHDP = hexahydroxydiphénique
Ho = holmium
H₂O₂ = peroxyde d'hydrogène
HOCL = polynucléaires neutrophils
IC₅₀ = concentration inhibitrice de 50%
iNOS = inductible nitric oxide synthase
IR = interventional radiology
IR = ischémie reperfusion
KB = kilo byte
KDa = kilo Dalton
Leu = leucine
LPS = lipopolysaccharide
MCF - 7 = michiganconcerfoundation -7
MD = molecular dynamics
MFGM = milk fat globule membrane
Mo = molybdène
MP = number of parliament
MTT = multi tables tournaments
NAD⁺ = nicotinamide adénine dinucléotide
Na₂S = sodium sulfide
NO = monoxyde d'azote
NO. = radical nitroxye
O₂ = dioxygène
O₂. = radical superoxyde
OH⁻ = hydroxyde
OH. = radical hydroxyle
ONOOH =nitroperoxyde
OPPH = 2-2 diphenyl-1-picrylhedrazyl
Phe = phenylalanine

PDB = program data base

RNS = reactive nitrogen species

Roo = return on objectives

ROS = reactive oxygen species

RP – HPLC = reversed high performance liquid chromatography

SOD = separation of duty

Thr = threonine

UV = ultraviolet

Val = valine

X = nombres de base

XDH = la xanthine déshydrogénase NADH dépendante

XO = xanthine oxydase

XOR = xanthine oxydoréductase

ZI = zone industrielle

Zn = zinc

% = pourcentage

Liste des Figures

Figure 1: Différentes espèces de la famille <i>Brassicaceae</i>	4
Figure 2: Distribution mondiale de la famille des <i>Brassicaceae</i>	5
Figure 3: Distribution du genre <i>Diplotaxis</i>	6
Figure 4: Plante <i>Diplotaxis harra</i>	7
Figure 5: Structure chimique de la molécule d'isoprène.....	11
Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes.....	13
Figure 7: Structure Chimique d'Acide gallique.....	16
Figure 8: Structure chimique D'Acide ellagique	17
Figure 9: Structure chimique Du HHDP	17
Figure 10: Structure chimique des alcaloïdes	18
Figure 11: Alcaloïdes vrais.	18
Figure 12: Proto-alcaloïdes	19
Figure 13: Pseudo-alcaloïdes. (23).....	19
Figure 14: Différentes causes du stress oxydatif.....	22
Figure 15: Pathologies causées par le stress oxydatif.	22
Figure 16: la formation d'un radical libre.	23
Figure 17: Modèle 3D de surface et de ruban du dimère de glutathion peroxydase (GLX1) du PDB 2F8A. (80)	26
Figure 18: Diagramme en ruban d'un tétramère humain superoxyde dismutase 2 (SOD2). ...	27
Figure 19: Structure d'une catalase d'érythrocyte humain.....	28
Figure 20: Structure chimique des principaux Caroténoïdes	28
Figure 21: Structure chimique de glutathion.....	29
Figure 22: Structure chimique de la vitamine E.....	29
Figure 23: Structure chimique de la vitamine C.	30
Figure 24: Voies de dégradation des purines	34
Figure 25: Gène codant pour la xanthine oxydoréductase	34
Figure 26: Structure du 8-SH-FAD dans la XDH et XO	35
Figure 27: Tissus humains exprimant un niveau élevé de la xanthine oxydoréductase et fonction locale des activités et produits XOR (94)	37
Figure 28: Mécanisme de 6-pteridylaldehyde	38
Figure 29: Structure chimique de l'inhibiteur febuxostat	40
Figure 30: Structure de l'apigénine (flavone).	41

Figure 31: Structure de la quercétine (flavonol).	41
Figure 32: Structure de la myricétine (flavonol).	42
Figure 33 : Mécanisme de génération de ROS dans IR comme proposé par Granger et autres (106)	44
Figure 34: l'ajustement du pH du tampon phosphate par le pH-mètre	49

Liste des Tableaux

Tableau 1: Classification des flavonoïdes selon le groupe.	14
Tableau 2: Exemple des radicaux libres (42)	25
Tableau 3: Activité antibactérienne des extraits des feuilles/fleurs/racines de <i>Diplotaxis harra</i>	33
Tableau 4: Lieux de distribution et activité de la XO	47
Tableau 5: Résumé des tests préliminaires du screening phytochimique	51
Tableau 6: protocole détaillé de l'inhibition de l'enzyme XOR	56
Tableau 7: Résultats du screening phytochimique	58
Tableau 8: IC ₅₀ des extraits de <i>Diplotaxis harra</i> qui inhibent l'enzyme XOR	59
Tableau 9 : IC ₅₀ des extraits de <i>Diplotaxis harra</i> de l'effet scavenger du radical hydroxyle OH	

Table des matières

Remerciements	
Dédicace	
Résumé	
Liste des abréviations	
Listes des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I.....	3
I. Généralité sur la plante <i>Diplotaxis harra</i>	4
I.1. Famille <i>Brassicaceae</i>	4
I.2. Distribution.....	5
I.3. Genre <i>Diplotaxis</i>	6
II. Aspect botanique de l'espèce <i>Diplotaxis harra</i>	7
II.1. Classification taxonomique.....	7
II.2. Morphologie végétale	8
II.3. Cytogénétique	8
III. Utilisation traditionnelle et pharmacologique	9
IV. Métabolites secondaires	10
IV.1. Terpènes	11
1.1. Définition	11
1-2- Classification des terpènes	12
2. Composés phénoliques	13
2-1- Flavonoïdes	13
2-1-1-Définition	13
2-1-2-Structure	13
2-2- Tannin.....	15
3. Alcaloïdes	17
3. Rôles de métabolites secondaires pour l'homme	20
V. Toxicité de <i>Diplotaxis harra</i>	20
II. Activités biologiques	21

II.1. activité anti-oxydante.....	21
II.1.1. Stress oxydatif.....	21
1.2. Radicaux libres.....	23
II.1.3. Antioxydants	26
II.2. Activité anti-inflammatoire.....	31
2.1. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	31
II.3. L'activité anti-cancéreuse	32
II.4. L'activité anti bactérienne.....	32
VI. Généralité sur la Xanthine oxydase (XO)	34
III.1. Définition.....	34
III.2. Structure de la xanthine oxydoréductase(XOR).....	35
III.3. Formes de la xanthine oxydoréductase (XOR).....	35
III.4. Distribution de la XOR.....	35
III.5. Implication de l'enzyme Xanthine oxydoréductase dans le stress oxydatif.....	37
III.6. Inhibition de la XOR	38
III.6.1. Inhibiteurs analogues de substrats	38
III.6.2. Autres inhibiteurs de la XOR.....	38
III.6.3. Inhibiteurs naturels.....	40
III.7.Rôles physiologiques de la XOR.....	42
III.8. Rôle pathologique de XOR.....	43
III.8.1. Rôle de la XOR dans l'ischémie / réperfusion :	44
C H A P I T R E I I	45
I. Matériel et Méthodes	46
I.1. Lieu du travail	46
I.2. Matériel Végétal.....	46
I.3. Screening phytochimique.....	46
I.4. Activités anti-oxydantes.....	49
I.4.1. Inhibition de l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR).....	49
I.4.2. Test de piégeage du radical hydroxyle (OH•)	52
CHAPITRE III	54
I. Screening phytochimique.....	55
II. Activités anti-oxydantes.....	58

II.1. Effet inhibiteur de l'enzyme XOR.....	58
II.2. Effet scavenger du radical hydroxyle (OH•).....	59
CONCLUSION GENERALE	61
R E F E R E N C E S E T B I B L I O G R A P H I E	

INTRODUCTION GENERALE

Introduction Générale

Depuis l'antiquité, les êtres humains ont utilisé les plantes pour répondre à leurs besoins fondamentaux, notamment la nourriture, les vêtements et les besoins médicaux. Plus de 80% de la population mondiale utilise actuellement les plantes médicinales pour se soigner, à la fois en raison de leur efficacité et du manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne (Galati et *al.* 1994).

Les plantes médicinales sont extrêmement nombreuses, ayant été utilisées dans les pays en développement comme principale source du traitement médical depuis de nombreuses années et sont toujours utilisées.

Les propriétés des plantes médicinales sont dues aux substances chimiques qu'elles synthétisent. Les métabolites primaires sont nécessaires à leur survie. Elles synthétisent une gamme remarquable d'autres composés appelés métabolites secondaires. L'homme les utilise dans son arsenal thérapeutique. Ce sont les principes actifs connus pour leurs diverses activités biologiques (Small et Catling, 2000).

Certains métabolites secondaires sont des antioxydants naturels, tels que les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tanins des plantes, contre le processus induit par les espèces réactives à l'oxygène (ERO), ces espèces peuvent être des radicaux libres. De plus, les métabolites secondaires peuvent prévenir de nombreuses maladies (Baba et Malik, 2015).

Dans ce contexte, nous avons pour objectif d'apporter notre contribution concernant le screening phytochimique et l'évaluation des activités anti-oxydante de l'espèce *Diplotaxis harra*. Notre travail a été divisé en deux parties ; nous aborderons dans la première partie une étude bibliographique qui regroupe trois chapitres dont :

- Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique qui regroupe trois parties ;
 - La première partie comporte des généralités bibliographiques sur la plante *Diplotaxis harra* avec sa composition chimique, sa classification botanique et son utilisation et sa toxicité,
 - La deuxième partie concerne les activités biologiques,
 - La troisième partie c'est à propos de l'enzyme XOR.
- Le deuxième chapitre focalise sur la partie expérimentale comportant :
 - Le screening phytochimique,
 - Étude de l'effet des extraits de la plante sur une enzyme pro-oxydante.

Introduction Générale

- Étude de l'effet scavenger des extraits de la plante sur le radical hydroxyle.
- Les méthodes d'évaluations des activités anti-oxydantes.

Le dernier chapitre présente les résultats obtenus et leurs discussion et une conclusion générale qui englobe l'ensemble des résultats du nos travaux.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralité sur la plante *Diplotaxis harra*

I.1. Famille *Brassicaceae*

La famille de *Brassicaceae* appelée aussi '*Cruciferae*', c'est une large famille homogène de plantes herbacées, et principalement d'arbustes. Elle contient 338 genres et 3350 espèces (figure 1) (1) (2). Cette famille a des fruits de type de silique, et elles ont presque la même formule florale. Ces plantes présentent une aire de distribution très ancienne et plus large et n'évolueront pas avant 150 ou 200 millions d'années, donc c'est une famille très ancienne, mais aussi très avancée et spécialisée ; d'une part la répartition géographique, et d'autre part la simplification des motifs floraux et la complexité des siliques, qui sont les maîtres mots de ce qui est actuellement visible (3).



Figure 1: Différentes espèces de la famille *Brassicaceae*.

I.2. Distribution

Les *Brassicacées* sont représentées dans le monde entier (figure 2), mais principalement dans les régions tempérées de l'hémisphère nord. Plus on s'éloigne des régions polaires, plus leur proportion dans la flore dominante diminue : la flore du Spitzberg compte 19 % de crucifères contre seulement 1 % au Sénégal. Ils sont encore plus rares dans l'hémisphère sud. Cette famille est principalement concentrée le long de la côte méditerranéenne, de l'Asie Mineure à l'Iran, l'ouest de l'Amérique du Nord est également une région riche en plantes crucifères. Deux petites tribus caractérisent la région du Cap en Afrique du Sud : les *Chamireae* et les *Heliophileae*. Une autre tribu monospécifique.

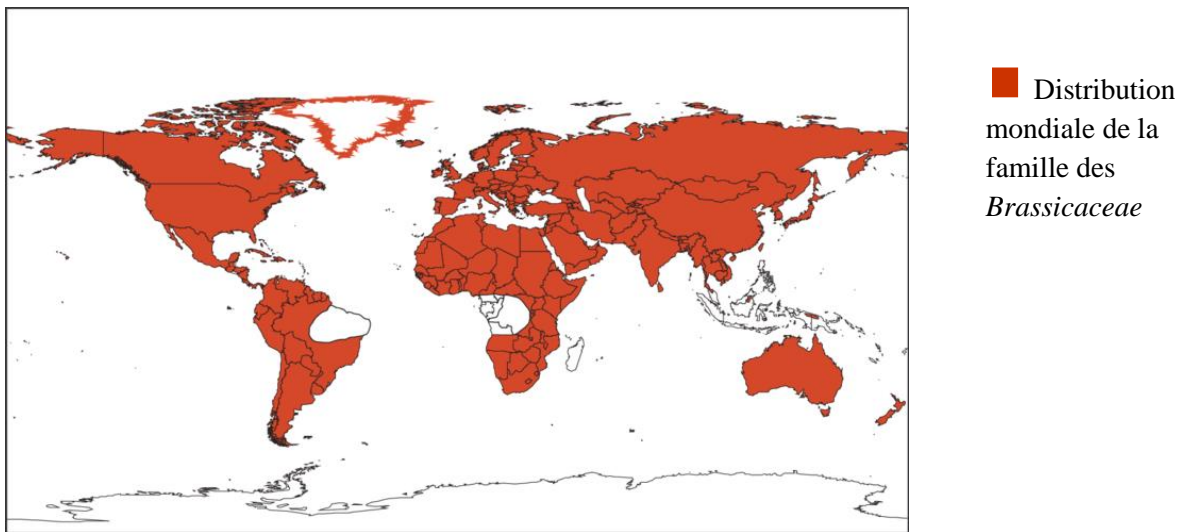


Figure 2: Distribution mondiale de la famille des *Brassicaceae*.

I.3. Genre *Diplotaxis*

Le genre *Diplotaxis* (*Diplotaxe*) (figure 3) comprend une trentaine d'espèces de plantes dicotylédones appartenant à la famille des *Brassicaceae*. Son nom vient du grec *diplos* (double) et *taxis* (rangée), en référence aux graines de ces plantes, qui sont disposées en 2 rangées de chaque côté de la paroi interne du fruit. Certains biscuits ont été historiquement utilisés comme légumes à feuilles et le sont encore aujourd'hui, tout comme leur roquette très similaire (genre *Eruca*). Les *diploaxes* sont des plantes hermaphrodites à fleurs jaunes (parfois blanches, comme chez *Diplotaxis erucoïdes*) qui fleurissent du printemps à l'automne et même en hiver (4).



Figure 3: Distribution du genre *Diplotaxis*

II. Aspect botanique de l'espèce *Diplotaxis harra*

II.1. Classification taxonomique

Règne : Plantae

Classe : Magnoliopsidae

Ordre : Brassicales

Famille : Brassicaceae ou Crucifères

Genre : *Diplotaxis* DC

Nom scientifique : *Diplotaxis harra* (Forssk.) Boiss. Figure (4)

Nom vernaculaire arabe : El harra (5)

Synonymes : *Sinapis crassifolia*

Diplotaxis crassifolia

Sinapisharra (Forssk.) (6)



Figure 4: Plante *Diplotaxis harra*.

II.2. Morphologie végétale

Diplotaxis harra est une espèce appartenant à la famille des *Brassicacées*. Ce sont des vivaces, des annuelles herbacées, des bisannuelles, parfois pubescentes. Ses feuilles basilaires sont rosulées et caulinaires alternes, simples à pinnatifides ou pinnatifides, à pétioles à la base, à lobes oblongs, entiers ou dentés (7).

Les fleurs sont petites, mais de couleur jaune et ont des pédoncules filamenteux qui sont regroupés pour attirer les insectes. À quelques exceptions près, elles sont régulières et possèdent des cercles en deux parties : un calice à 4 sépales (d'environ 4,5 mm de long, les sépales internes sont plus ou moins en forme de sac mais tous couverts de poils frisés), une corole à 4 pétales (6 à 10 mm, jaune vif) disposées en croix, étamines à 2 étamines courtes (uniquement 3 à 6,5 mm externes) et 4 étamines plus longues (intérieures 5 à 7,5 mm) soit toujours 6 étamines et un pistil supérieur à 2 carpelles fusionnés (8).

Ovaire pédicellé, contenant moins de 120 ovules, stigmat légèrement plus large que le style. Graines elliptiques, à longue radicule, sans ailes, grand axe de 0,5-0,9 mm. Tiges droites, non ramifiées ou peu ramifiées, sans angles, toujours velues, à longs poils durs et étalés. Tiges à cellules épidermiques grandes et fortement kératinisées, d'autres de petit diamètre, à membranes épaisses presque kératinocytaires ; fibres péricycliques en touffes aplaties, cellules externes plus petites. La moelle fibreuse est entourée d'un large anneau de sclérenchyme. Les fruits sont des gousses pendantes à l'apex, de 2 à 4 mm de long, déhiscentes au niveau paraplacental, rarement non déhiscentes.

II.3. Cytogénétique

La cytogénétique est la discipline médicale et biologique qui étudie le matériel génétique organisé sous forme de chromosomes structurés, visibles et individualisés.

La plupart des études cytologiques du genre *Diplotaxis harra* se sont concentrées sur le nombre de chromosomes, certains travaux se concentrant sur des critères nucléaires détaillés à des fins taxonomiques. Les résultats des études cytologiques ont montré que le genre *Harax* possède trois nombres de base et trois niveaux de ploïdie ($2n = 2x = 22$, $2n = 2x = 26$ et $2n = 2x = 38$).

Diplotaxis harra est diploïde. Il est donc clair que cette espèce présente une variabilité considérable du nombre de chromosomes en Iran. En plus de la présence de cytotypes intraspécifiques, cette espèce présente également de races chromosomiques diploïdes et aneuploïdes ($2n = 26$, $2n = 28$) aux nombres de base $x = 13$ et $x = 14$. Ainsi, les individus

diploïdes de *Diplotaxis harra* et les cytotypes aneuploïdes sont indiscernables les uns des autres sur le terrain. La méiose est très cohérente, un processus génétiquement programmé pour inclure l'appariement de chromosomes homologues, le croisement, la réduction du nombre de chromosomes et l'absence de phase S entre les divisions. Comme tout autre processus biologique, toutes les étapes successives de la méiose sont contrôlées par plusieurs gènes.

Des mutations dans l'un de ces gènes contrôlant la microsporogénèse ou la mégasporogénèse, des événements pré-méiotiques ou post-méiotiques, peuvent provoquer de graves anomalies dans l'ensemble du processus, conduisant à des produits finaux génétiquement anormaux avec des conséquences majeures pour l'espèce. La fertilité et l'efficacité reproductive globale sont négativement affectées.

III. Utilisation traditionnelle et pharmacologique

Les plantes, organismes, marquent leur identité par des traits morphologiques, qui sont à l'origine de la taxonomie végétale, mais aussi biochimiques, associés à de nouvelles voies de biosynthèse, représentant l'intérêt de l'utilisation des plantes médicinales, lorsque les plantes sont considérées comme médicinales inscrites à la pharmacopée lors de leur utilisation, leur usage est exclusivement médicinal, ce qui signifie que les plantes ont des propriétés pour prévenir ou traiter les maladies humaines ou animales (9).

Les plantes médicinales représentent une ressource précieuse et le principal moyen d'auto-soins pour la plupart des populations rurales et urbaines en Afrique. Malgré les progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales reste répandu dans certains pays du monde, notamment les pays en voie de développement (10).

L'étude de la médecine traditionnelle et de la phytothérapie est particulièrement intéressante, car très peu de travaux de recherche ont été réalisés sur cet aspect, notamment l'utilisation des espèces spontanées en médecine traditionnelle (11).

En médecine traditionnelle, *Diplotaxis harra* est utilisé comme agent tonique et stimulant, antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et anticancéreux, pour l'anémie, antidiabétique, antirhumatismal et antihelminthique. Les parties aériennes de *Diplotaxis harra* sont utilisées en décoction en cas de constipation ou de diabète. Également, la plante médicinale *Diplotaxis harra* est caractérisée par sa composition diversifiée en métabolites secondaires tels que : alcaloïdes, flavonoïdes, terpénoïdes, stéroïdes, saponines, glycosides, composés

phénoliques et composés soufrés. De plus, La diplotaxie agit en stimulant et modulant l'organisme et les défenses immunitaires ainsi que les fonctions digestives.

IV. Métabolites secondaires

L'activité des métabolites secondaires a été démontrée pour la première fois par Ernest Stahl en 1888 (Hartmann, 2008). Le chercheur étudie les habitudes alimentaires de divers escargots sur des espèces végétales (12).

Au lieu de métabolites primaires tels que les protéines, les glucides et les lipides, les plantes ont des métabolites dits "secondaires". Ces composés varient d'une espèce à l'autre, et bien que leurs effets soient encore mal connus. Ils peuvent être des éléments essentiels dans la co-évolution des plantes et des organismes tels que les parasites, les pathogènes et les prédateurs, ainsi que les pollinisateurs et les disperseurs. Ces diverses relations conduisent à une extrême diversité de composés secondaires (13).

Les métabolites secondaires sont des molécules présentes en grande quantité, avec une diversité structurale extraordinaire, marquent l'identité d'espèce, de famille ou de genre. Ils interviennent dans l'écologie chimique entre les espèces. Les métabolites secondaires ne participent pas directement au processus de vie des cellules, mais jouent tout de même d'importantes fonctions écologiques.

Chez les plantes, les métabolites secondaires sont importants pour la survie et la reproduction de l'espèce. Ils jouent différents rôles, comme une phéromone ou un signal chimique qui adapte les plantes à l'environnement, un moyen de défense contre les herbivores, les pathogènes ou les concurrents. D'autres protègent les plantes du rayonnement solaire et facilitent même la dispersion du pollen et des graines.

Les métabolites secondaires sont classés en 3 principales catégories qui sont :

Les terpènes

Les composés phénoliques

Les alcaloïdes (ou composés azotés)

IV.1. Terpènes

1.1. Définition

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, ils ont une structure soit cyclique soit une chaîne ouverte, leur formule brute est $(C_5H_X)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre les valeurs de 1 à 8, sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène (figure 5), sa formule brute est C_5H_8 . Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) (14).

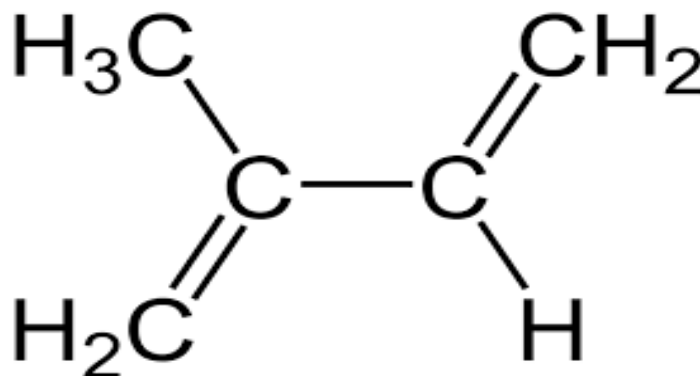


Figure 5: Structure chimique de la molécule d'isoprène.

1-2- Classification des terpènes

La classification des terpènes est en fonction du nombre d'unités d'isoprène dans la molécule ; un préfixe indique le nombre de paires d'isoprène nécessaires pour construire la molécule. Les terpènes sont composés généralement de 2, 3, 4 ou 6 unités d'isoprène ; les tétraterpènes (8 unités d'isoprène) représentent une classe différente de produits chimiques appelés caroténoïdes, tandis que les autres sont rares.

Les hémipènes sont composés d'une seule unité d'isoprène. Le seul hémipérentène est l'isoprène, par contre les composés contenant de l'oxygène comme le prénil et l'acide isovalérique sont des hémipénoïdes.

- Les monoterpènes ont la formule chimique $C_{10}H_{16}$ et sont composés de deux unités d'isoprène.
- Les sesquiterpènes ont la formule chimique $C_{15}H_{24}$ et sont composés de trois unités d'isoprène.
- Les diterpènes ont la formule chimique $C_{20}H_{32}$ et sont composés de quatre unités d'isoprène.
- Les sesterterpènes, qui ont 25 carbones et cinq unités d'isoprène, sont plutôt rares par rapport aux autres tailles.
- Les triterpènes ont la formule chimique $C_{30}H_{48}$ et sont composés de six unités d'isoprène.
- Les sesquaterpènes ont la formule chimique $C_{35}H_{56}$ et sont composés de sept unités d'isoprène.
- Les tétraterpènes ont la formule chimique $C_{40}H_{64}$ et comprennent huit unités d'isoprène.
- Les polyterpènes sont constitués de longues chaînes qui contiennent plusieurs molécules d'isoprène (15).

2. Composés phénoliques

2-1- Flavonoïdes

2-1-1-Définition

Le terme flavonoïdes (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ce sont les pigments qui font apparaître différents organes végétaux en jaune, orange et rouge (16).

Ces différentes substances existent sous forme libre (aglycone) ou sous forme glycosidique. On les trouve couramment dans toutes les plantes vasculaires et ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (16).

Les flavonoïdes sont également présents dans une variété de plantes médicinales (16).

2-1-2-Structure

La structure d'un flavonoïde est toujours organisée autour d'un squelette 1,3-diphénylpropane $C_6C_3-C_6$ (figure 6). Les deux cycles benzéniques sont appelés cycle A et cycle B. Le chaînon propyle C_3 peut être complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle C [(17); (18); (19)]. Tableau (1)

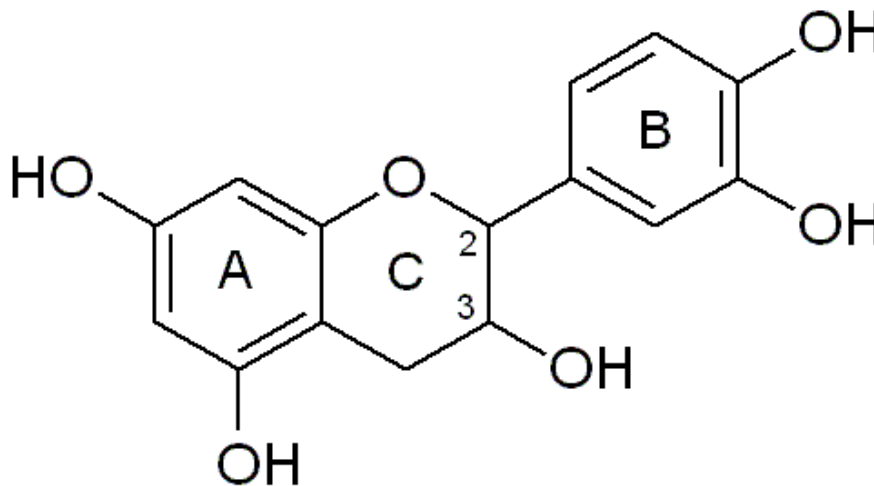
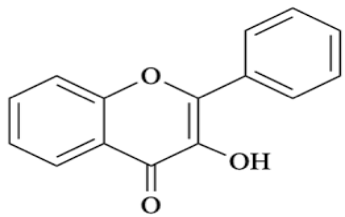
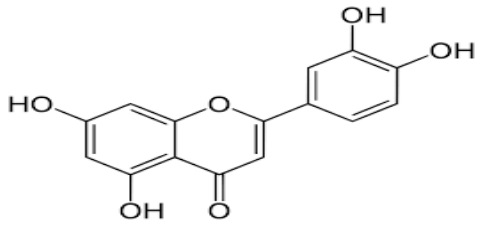
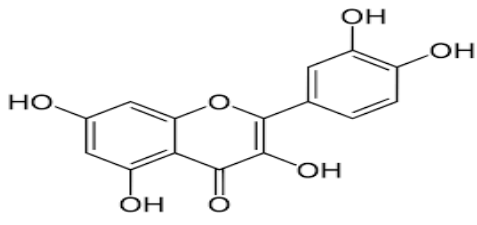
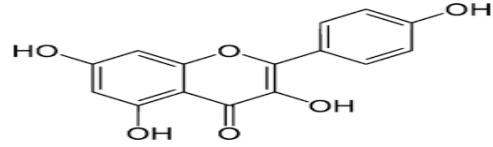
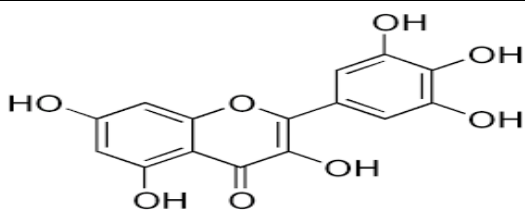
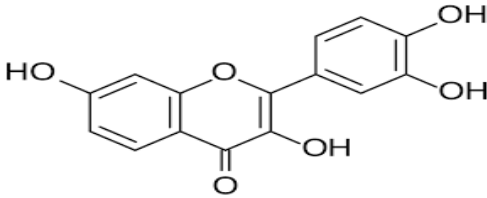
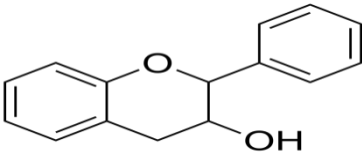
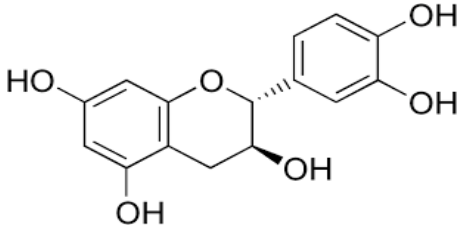
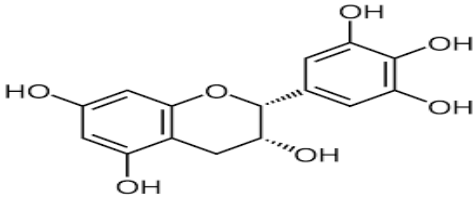


Figure 6 : Structure de base des flavonoïdes.

Tableau 1: Classification des flavonoïdes selon le groupe.

Groupe	Exemple	Source Biologique	Structure
 <p>Flavonol</p>	<p>Lutéoline</p>	<p><i>Salvia mentosa</i> (<i>Salvia</i>)</p>	
	<p>Quercétine</p>	<p><i>Quercus alba</i> (Oak)</p>	
	<p>Kaempferole</p>	<p><i>Pinus sylvestris</i>, (Pine) <i>Aloevera</i> (Aloe)</p>	
	<p>Myricétine</p>	<p><i>Rosa damascena</i> (Rose)</p>	

	Fisetine	<i>Fragaria</i> <i>Ananassa</i> (Strawberry)	
Flavonol 	Catechine	<i>Camellia</i> <i>Sinensis</i> (Green Tea)	
	Epigallo Catechine	<i>Camellia</i> <i>Sinensis</i> (Green Tea)	

2-2- Tannin

2-2-1-Définition

Le mot tanin ou tannin, ou acide gallique, est une substance amorphe très répandue dans le bois, l'écorce, les feuilles et/ou les racines de nombreux végétaux, elle était utilisée pour décrire certaines substances organiques qui servaient à transformer les peaux brutes d'animaux en cuir. Les tanins sont extraits des plantes avec de l'eau (ou eau et alcool) qui est ensuite décanté et laissé évaporer à basse température jusqu'à l'obtention du produit final. Les tanins ont une légère odeur caractéristique, un goût amer et astringent, et leur couleur varie du jaune au brun foncé (20).

2-2-2-Structure chimique et classification

On distingue 2 groupes de tanins différents par leurs structures et également par leurs origines biogénétiques :

A- Tanins hydrolysables.

B- Tanins condensés.

A-Tanins hydrolysables : Ce sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement hydrolysables par les acides et les enzymes (tannase) en ose (généralement le glucose) et en acides phénols. On distingue 2 types selon la nature de l'acide phénol :

a. Tanins galliques ou gallo-tanins : ils libèrent l'ose et l'acide gallique par hydrolyse. Figure(7)

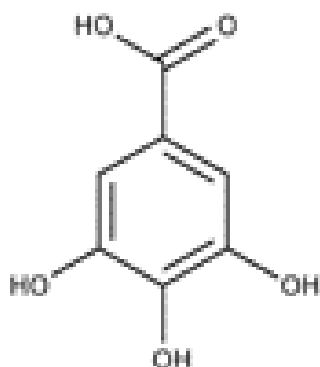


Figure 7: Structure Chimique d'Acide gallique

b. Tanins ellagiques ou ellagi-tanins : ils libèrent l'ose, l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP), figure 8) et différents dérivés (acide ellagique et acide chébulique) (figure 9) par hydrolyse :

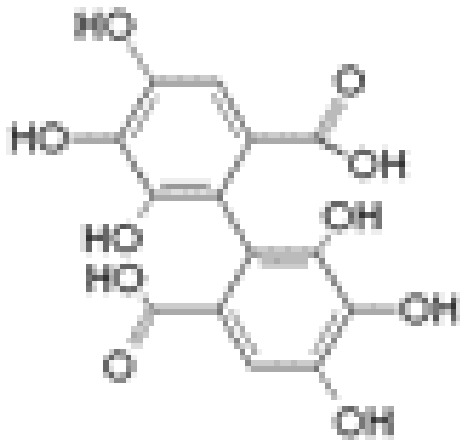


Figure 9: Structure chimique du HHDP

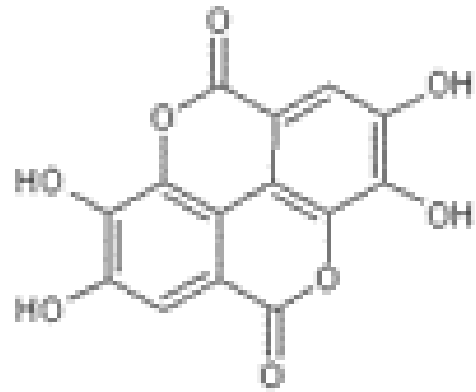


Figure 8: Structure chimique d'Acide ellagique

B. Tanins condensés (pyrocatéchique ou proanthocyanidols) :

Ils diffèrent des tanins hydrolysables par :

- ❖ Une structure qui ressemble à celle des flavonoïdes.
- ❖ Absence de partie osidique.
- ❖ Non hydrolysables, en milieu acide fort et à chaud, ils se polymérisent en donnant des précipités insolubles rouges bruns appelés phlobaphènes (21).

3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés basiques contenant de l'azote qui peuvent être extraits dans de l'eau acide ou des solvants tels que le chloroforme après alcalinisation. Ils sont généralement précipités avec des réactifs métalliques à base d'iode (réactifs de Dragendorff) et sont souvent biologiquement actifs. Figure (10).

La plupart des alcaloïdes naturels proviennent des plantes (il y a des exceptions dans le monde animal), on les trouve principalement dans les angiospermes, mais il y a plus d'exceptions (lycopine du lycopodium, alcaloïde des marais de l'équisetum), Leur rôle biologique les place également au cœur du phénomène d'interactions de défense contre les stress biotiques (herbivores, microbes). L'amertume - une propriété antinutritionnelle - est une caractéristique générale des alcaloïdes. Par contre, très peu sont volatiles, à l'exception de la coumarine qui sent la souris quand les feuilles de pruche bruissent.

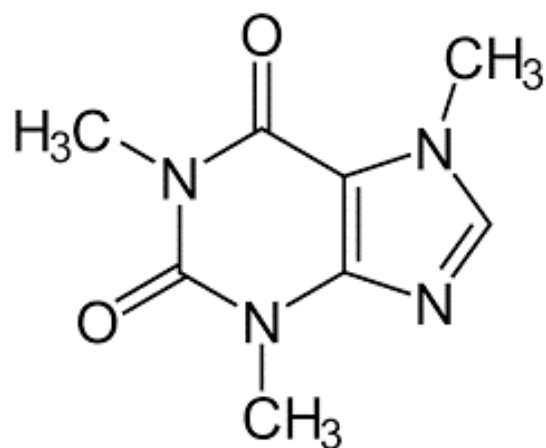


Figure 10: Structure chimique des alcaloïdes

On distingue :

- **Alcaloïdes vrais**, qui sont d'un point de vue de la biosynthèse dérivés d'acides aminés, et qui présentent au moins un hétérocycle : exemple la strychnine dérivée du tryptophane (figure 11).

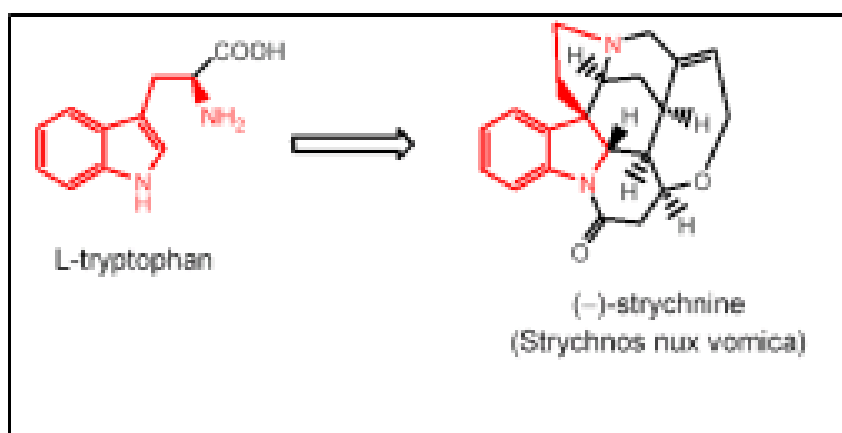


Figure 11: Alcaloïdes vrais

• **Proto-alcaloïdes**, qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques (exemple : la colchicine). Figure (12).

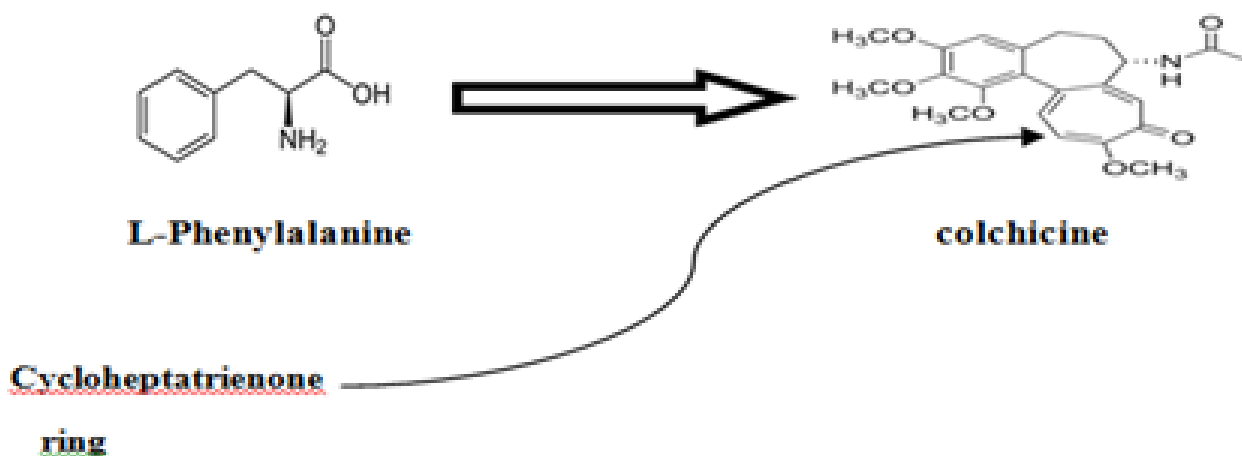


Figure 12: Proto-alcaloïdes

• **Pseudo-alcaloïdes**, qui ne dérivent pas d'acides aminés (exemple : la caféine). Figure (13).

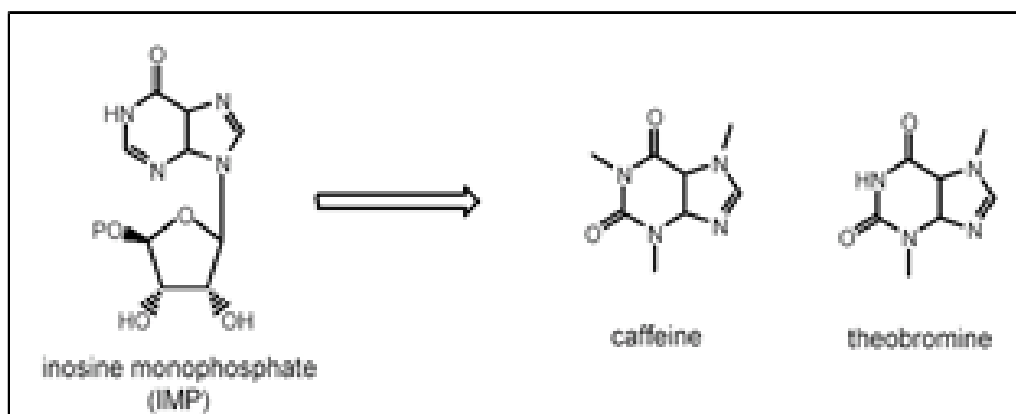


Figure 13: Pseudo-alcaloïdes (23)

3. Rôles de métabolites secondaires pour l'homme

Les métabolites secondaires présents dans les plantes ont de fortes utilisations médicinales dans le traitement des problèmes d'anxiété et de stress, mais aussi pour soulager les symptômes de maladies chroniques ou prévenir des affections allant des migraines au cancer. Les composés phénoliques sont bénéfiques pour la santé humaine grâce à leurs activités anti-oxydantes, anticancéreuses, anti-inflammatoires et cardioprotectrices (22).

V. Toxicité de *Diplotaxis harra*

Diplotaxis harra est désignée une plante toxique, signifie qu'elle contient une substance nocive pour les animaux et les humains, si elle est ingérée (23) La phytotoxicité est causée par une variété de toxines chimiques, y compris les alcaloïdes, les glycosides, les protéines et les acides aminés (24) Ces substances peuvent affecter l'organisme de différentes façons, selon la toxine en cause (25). Il existe plusieurs plantes vénéneuses bien connues pour lesquelles les produits chimiques spécifiques responsables de leur toxicité n'ont pas été identifiés (24) Certaines plantes affectent les reins, tandis que d'autres affectent le cœur ou provoquent des tremblements musculaires ou des vomissements (26). Il ya aussi de nombreuses plantes qui sont non toxiques pour les animaux de compagnie, mais peut causer un estomac dérangé si ingéré (27). Cependant, certaines plantes sont très toxiques et l'ingestion de petites quantités peut entraîner une mort rapide (24) Le diagnostic de phytotoxicité peut être difficile, en particulier dans le domaine de la médecine vétérinaire, où les antécédents d'exposition à des plantes vénéneuses font souvent défaut (24).

Il y'a une étude qui a été faite *in vitro* sur l'extrait EtOH des parties aériennes de *Diplotaxis harra*, La cytotoxicité de cet extrait éthanolique a été évaluée sur les lignées cellulaires HCT116, HepG2 et MCF-7 par rapport à la doxorubicine (témoin), IC₅₀ de la doxorubicine=4,65, 12,60 et 17,90 µg/ml pour l'extrait EtOH, doxorubicine IC₅₀ = 3,64, 4,57 et 2,97 µg/ml. Les résultats obtenus ont révélé une bonne cytotoxicité de l'extrait EtOH contre HCT116 avec une IC₅₀ = 4,65 µg/ml. L'extrait d'EtOH a été séparé en trois fractions principales : CHCl₃, EtOAc et n-butanol, et une comparaison chromatographique a indiqué que la fraction de n-butanol avait une teneur majeure en phénol. Une purification plus poussée à l'aide de RP-HPLC a isolé cinq glycosides flavonoïdes, qui ont été identifiés comme : la quercétine (1), la quercétine 3-β-glucoside (2), l'isorhamnétine 7-β-glucoside (3), l'apigénine 3-β-rhamnoside (4) et le kaempférol 3-β-glucoside (5). De plus, les flavonoïdes isolés ont montré une cytotoxicité *in vitro* contre la lignée cellulaire HCT116 avec une IC₅₀ de 20, 1, 24, 3, 22, 8, 23, 4 et 41, 9 µg / ml, respectivement, comme déterminé par le test MTT.

II. Activités biologiques

II.1. activité anti-oxydante

II.1.1. Stress oxydatif

II.1.1.1. Définition

Le stress oxydatif est une forme d'attaque cellulaire causée principalement par les radicaux libres, qui peuvent être neutralisés par des antioxydants (28). Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les défenses antioxydantes de l'organisme, favorisant les premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice intense) ainsi que de mauvaises habitudes alimentaires peuvent anormalement augmenter la production d'ERO dans l'organisme (28).

La vitesse de ce phénomène s'accroissant avec l'âge, il est essentiel de maintenir une alimentation équilibrée et un mode de vie sain. Une supplémentation en antioxydants est parfois recommandée, notamment en cas de manque ou d'exercice intense (29).

II.1.1.2. Origine du stress oxydatif

L'oxygène, comme tous les oxydants, est toxique lors de la respiration mitochondriale. En effet, la fuite d'électrons au niveau de la chaîne mitochondriale conduit à la formation de radicaux superoxydes en combinant ces électrons avec des molécules d'oxygène. (30) Les mitochondries régulent l'hypoxie au niveau tissulaire en libérant des ERO [(31), (32)].

Le stress oxydatif peut avoir diverses causes (figure 14), comme une surproduction endogène de pro oxydants due à une inflammation, des carences nutritionnelles en antioxydants, ou encore une exposition environnementale à des facteurs pro oxydants (médicaments, rayons UV, pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques) (33).

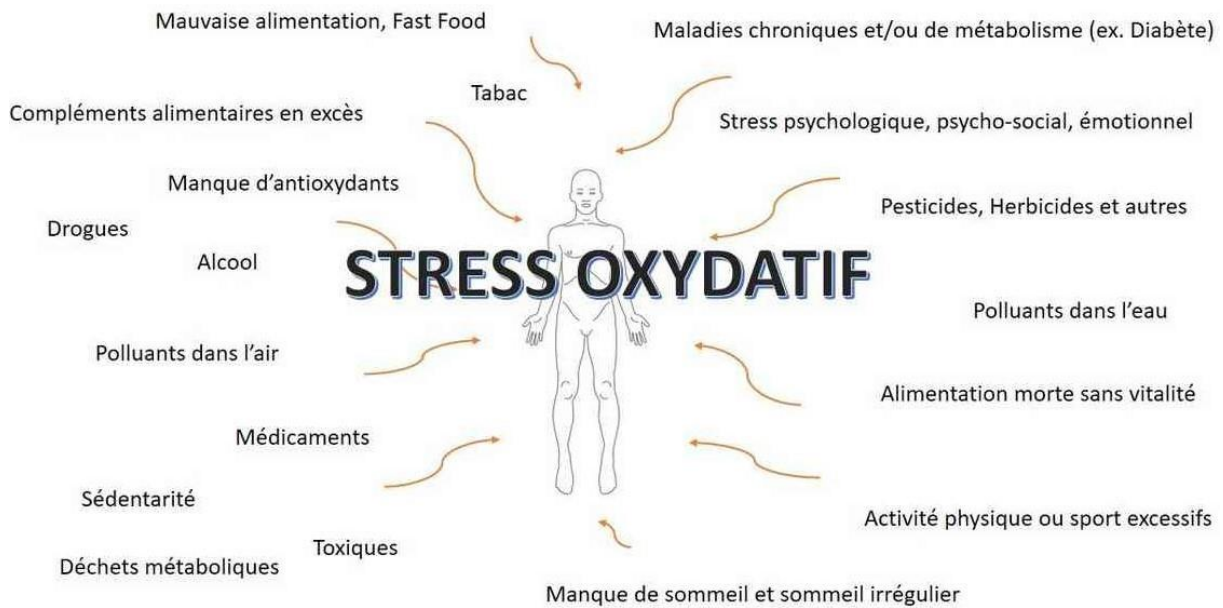


Figure 14: Différentes causes du stress oxydatif

II.1.1.3. Maladies liées au stress oxydatif

Le stress oxydatif est la cause initiale et majeure de nombreuses maladies (figure 15), en entraînant l'apparition de biomolécules anormales et la surexpression de certains gènes : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aiguë, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, maladie d'Alzheimer, rhumatismes, athérosclérose, diabète, maladie de Parkinson, infections intestinales [(34) (35)].

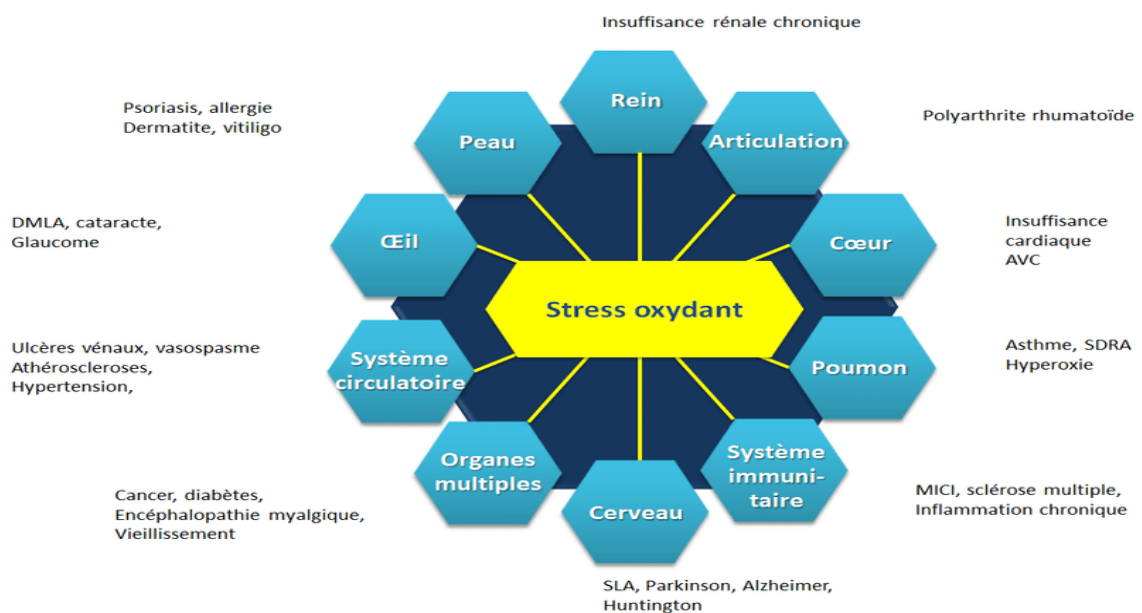


Figure 15: Pathologies causées par le stress oxydatif.

1.2. Radicaux libres

II.1.2.1. Définition

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (figure 16). La molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants pour tenter de capturer les électrons nécessaires à la stabilité. Une réaction en chaîne commence lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui privant de son électron, et la molécule qui s'attaque elle-même devient un radical libre (36).

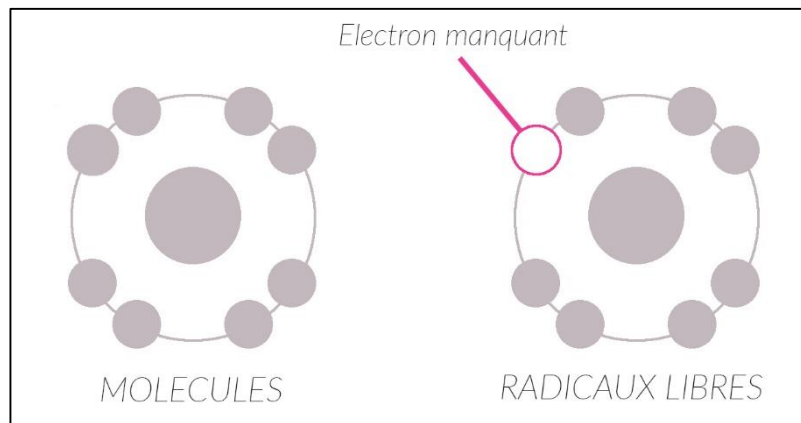


Figure 16: la formation d'un radical libre.

II.1.2. 2. Type des ERO

Parmi toutes les espèces de radicaux libres susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer trois groupes (37):

- Les radicaux libres primaires, constituant un groupe restreint de composés radicalaires dérivés de l'oxygène par réduction à un électron, comme l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote, comme le monoxyde d'azote NO^{\bullet} . Ils jouent un rôle particulier dans la physiologie.
- Les radicaux libres secondaires, sont formés par la réaction des radicaux libres primaires avec des composés biochimiques de la cellule.
- D'autres espèces dérivées de l'oxygène sont appelées espèces réactives non radicalaires telles que l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), qui ne sont pas des radicaux libres mais sont également réactifs, qui peuvent être le précurseur de radicaux libres.

II.1.2.3. Origine des radicaux libres

Les radicaux libres, dont les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS), proviennent de deux sources : endogène (mitochondrie, peroxyosomes, réticulum endoplasmique, phagocytes, etc.) et exogène (pollution, alcool, fumée de tabac), les métaux lourds, métaux de transition, solvants industriels, pesticides, certains médicaments comme l'halothane, le paracétamol et les radiations) [(38), (39)].

II.1.2.4. Exemple des radicaux libres

Les radicaux libres les plus réponsus sont résumés dans le tableau suivant (tableau 2) :

Tableau 2: Exemple des radicaux libres (40)

Radicaux libres	Descriptions
AnionO ₂ ⁻ , superoxyde	L'état réduit des électrons O ₂ ⁻ , formés par les chaînes de transport d'électrons dans de nombreuses réactions d'auto-oxydation. Plutôt inactif, mais peut libérer du Fe ₂ ⁺ à partir des protéines fer-soufre et de la ferritine. Disproportionation spontanée ou catalysée par voie enzymatique pour former H ₂ O ₂ , un précurseur de la formation d'OH catalysée par un métal. Réaction chimique : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ $O_2 + Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3} + O_2^{\cdot-}$ (auto oxydation)
H ₂ O ₂ , peroxyde d'hydrogène	Un état réduit à deux électrons formé par la disproportionation de O ₂ ⁻ , ou par réduction directe de O ₂ ⁻ . Liposoluble et donc capable de diffuser à travers la membrane.
OH, radical hydroxyle	L'état réduit à trois électrons, formé par la réaction de Fenton et la décomposition du peroxydinitrite. Très réactif, attaque la plupart des composants cellulaires. $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^{\cdot} + OH^-$
ROOH, hydroperoxyde organique	Formé par des radicaux libres réagissant avec des composants cellulaires comme les lipides et les nucléobases.
HOCl, acide hypochloreux	Formé à partir de H ₂ O ₂ par la myéloperoxydase. Soluble dans les lipides et très actif. Oxyde facilement les composants protéiques, y compris les groupes amino, les groupes thiol et la méthionine $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + OH^-$

II.1.3. Antioxydants

II.1.3.1. Définition

L'organisme humain possède des systèmes de défense très efficaces, il y'a deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (41).

Les antioxydants sont des molécules qui inhibent ou bien ralentissent l'oxydation d'un substrat (42) Ils sont présents sous plusieurs formes et peuvent intervenir en prévention de la formation des radicaux libres, ainsi bien que pour participer à leur élimination.

Les antioxydants sont des substances qui peuvent empêcher ou ralentir les dommages aux cellules causés par les radicaux libres, qui sont des molécules instables que le corps produit en réaction à des agressions extérieures, à l'activité sportive, la respiration et même la digestion. (43).

II.1.3.2. Classification des antioxydants

II.1.3.2.1. Antioxydants enzymatiques

a. Glutathions peroxydases (GSHPX)

Les GSHPX (figure 17) réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et les hydroperoxydes lipidiques. Pour leur fonction, ils utilisent le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur sur lequel transférer l'oxygène, le convertissant en glutathion oxydé (GSSG) (44).

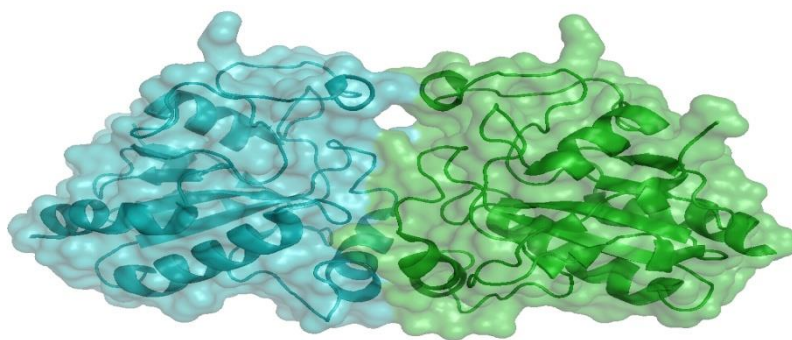


Figure 17: Modèle 3D de surface et de ruban du dimère de glutathion peroxydase (GLX1) du PDB 2F8A (80)

b. Superoxydesdismutases (SOD)

Ces métalloprotéines représentent la première ligne de défense contre le stress oxydatif, assurant l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, 3 isoenzymes ont été décrites : Cu/Zn-SOD1 cytosolique, Mn-SOD₂ mitochondriale et Cu/Zn-SOD₃, qui diffèrent par la localisation chromosomique, la teneur en métal, la structure quaternaire et la localisation des gènes. La SOD₃ est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le principal système antioxydant de la paroi artérielle : son expression et sa sécrétion sont augmentées par l'influence de facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II), influencées par l'homocystéine et diminuées (45) (Figure 18).

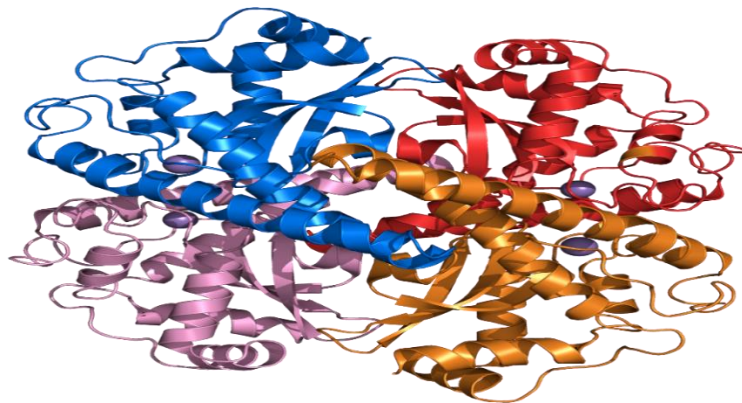


Figure 18: Diagramme en ruban d'un tétramère humain superoxyde dismutase 2 (SOD2)

c. Catalases

Ils réduisent le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , par la libération de l'oxygène et de l'eau. Ils sont principalement localisés dans les peroxysomes. Ils n'élimineront pas tout le peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important, notamment en présence d'ions ferreux, peut faire éliminer le peroxyde d'hydrogène en excès, de sorte que la réaction de Fenton ne peut pas être amplifiée. Ils sont quantitativement moins efficaces que le système de glutathion peroxydase (46) (Figure 19).

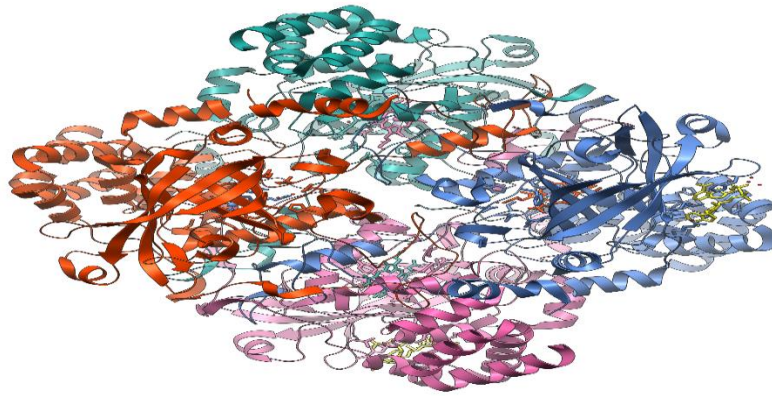


Figure 19: Structure d'une catalase d'érythrocyte humain

II.1.3.2.2. Antioxydants non enzymatiques :

a. Caroténoïdes

C'est un pigment dérivé de plantes et de micro-organismes et peut être divisé en deux groupes principaux, le carotène et la lutéine. Leur activité anti-oxydante est associée à de longues chaînes de polyènes qui peuvent réagir avec les radicaux libres ($\text{ROO}\bullet$), ($\text{HO}\bullet$), ($\text{O}_2\bullet$), ($\text{R}\bullet$) par simple addition électrophile et transfert d'électrons. Oxygène singulet 1O_2 [(47), (48)] (Figure 20).

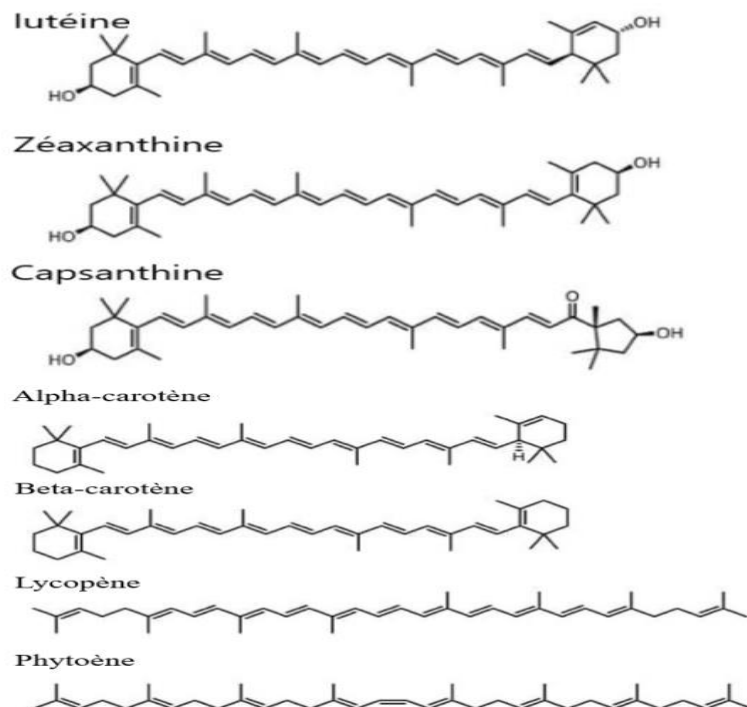


Figure 20: Structure chimique des principaux Caroténoïdes

b. Glutathion

Le glutathion (GSH ou L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine) a une masse molaire de 307 g/mol et est le composé thiolé de bas poids moléculaire le plus abondant chez l'homme (mais plus particulièrement dans le foie, les reins, les poumons, le cœur et cerveau) et dans les plantes (Sies, 1999). Il existe sous forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG). Le glutathion fait référence à l'établissement de liaisons disulfure réversibles entre le glutathion et les chaînes protéiques contenant des acides aminés sulfurés (cystéine, méthionine). C'est la fonction thiol (-SH) de la cystéine qui confère au glutathion ses propriétés biochimiques par oxydation sous forme de ponts disulfures (-S-S-) (Figure 21).

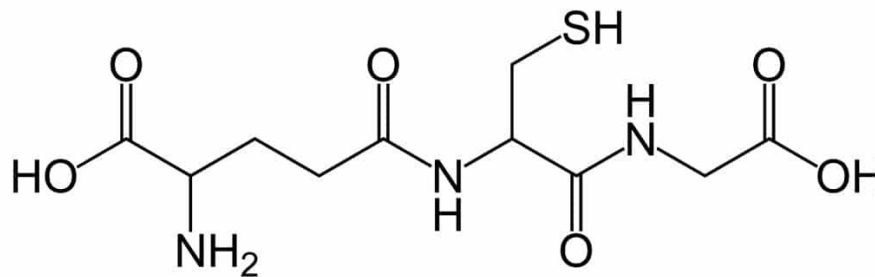


Figure 21: Structure chimique de glutathion

c. Vitamine E (les tocophérols)

Bien qu'ils soient d'excellents antioxydants alimentaires, ils ont des rôles physiologiques importants dans le corps humain, notamment comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines, ou contre le stress oxydatif. Empêche la formation d'hydroperoxyde en piégeant ($\text{LOO}\cdot$) les radicaux libres (49) (Figure 22).

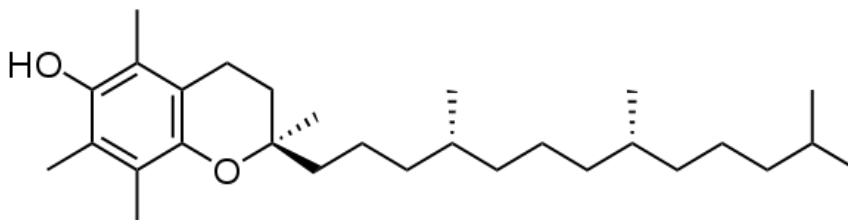


Figure 22: Structure chimique de la vitamine E

d. Vitamine C (acide ascorbique)

Est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes, mais elle n'est pas synthétisée par l'homme. Elle est reconnue pour son effet protecteur contre l'oxydation membranaire (50).

Cela fonctionne en capturant ERO directement, principalement O_2 et OH. (51) (Figure 23).

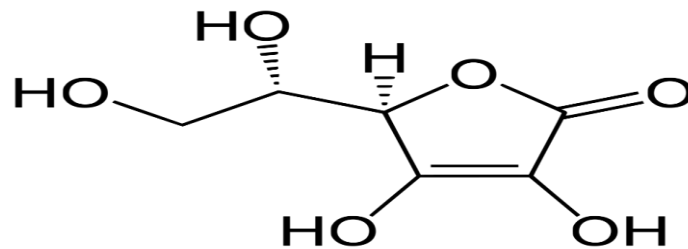


Figure 23: Structure chimique de la vitamine C

II.1.3.2.3. Oligoéléments

Le sélénium, le cuivre, le manganèse, le zinc : Ce ne sont pas des antioxydants, car ils ne piègent pas les radicaux libres, mais jouent un rôle important comme cofacteur des enzymes anti-oxydantes citées ci-dessus : les superoxydesdismutases (SOD) et les glutathions peroxydases (GPx) (52).

II.1.4. Activité anti-oxydante

Elle s'apprécie par la mesure des produits formés (hydroperoxydes notamment) par des techniques photométriques plus ou moins directes, ou par la mesure de l'efficacité des composés à piéger les radicaux libres. Ces méthodes comparent la capture des additifs à l'hydrophilie ou à l'hydrophobicité du milieu. L'antioxydant de référence Trolox® peut être appliqué dans une grande variété de produits, quelle que soit la nature hydrophile ou hydrophobe du milieu (28).

Dans une étude récente ils ont été déterminée l'activité anti-oxydante chez les parties aériennes de *Diplotaxis harra* : en utilisant un radical libre stable (1, 1-diphényle-2-picrylhydrazyl) DPPH (53) Dans cette étude, les résultats ont révélé que lorsque la concentration de l'extrait de plante était augmentée, il y avait une augmentation soutenue correspondante de l'activité de récupération. La puissante activité anti-oxydante de l'extrait de

germes de soja a été principalement attribuée à des composés secondaires (54) Cela a été confirmé par Falleh et al (2013), qui ont rapporté que le *Diplotaxis* sauvage peut être utilisé comme une source puissante d'antioxydants et d'antibiotiques naturels en raison de sa teneur élevée en polyphénols.

II.2. Activité anti-inflammatoire

2.1. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques trouvés dans le règne végétal est énorme, et leur gamme d'activités est tout aussi large. Certains de ces composés ont des propriétés anti-inflammatoires. On pense que beaucoup agissent en bloquant les voies de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase (55).

Les flavonoïdes, en particulier, sont responsables d'une gamme de fonctions biologiques telles que les activités anti-inflammatoires et anticancéreuses.

Il y a eu une autre étude in vitro de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait de *Diplotaxis harra* (DHE) en inhibant l'expression des protéines pro-inflammatoires COX-2 (A) et iNOS (B). La dexaméthasone (DEX) a été utilisée comme valeurs positives.

- Activité anti-inflammatoire in vitro de la DHE et de l'IR3G sur l'expression d'iNOS et de COX-2 :

L'activité anti-inflammatoire de la DHE et de l'IR3G sur l'expression des protéines pro-inflammatoires dans les macrophages de souris stimulés par le LPS a été évaluée selon des études antérieures. Activités anti-inflammatoires, neuroprotectrices et inhibitrices dans les déficits moteurs.

L'activité anti-inflammatoire de la DHE incite à évaluer l'activité de son glycoside flavonoïde majeur à différentes doses. Par rapport à celle observée dans les cellules stimulées avec du LPS seul, l'expression de l'enzyme pro-inflammatoire a été réduite de 57, 390,95 à 35, 967, 80% pour iNOS et de 79,133, 66 à 62, 480,99%. Il a été constaté que le niveau d'inhibition de l'iNOS obtenu par IR3G était presque similaire à celui de la dexaméthasone à la même dose molaire.

Les résultats des analyses d'amarrage moléculaire et de simulation MD révèlent le potentiel inhibiteur de l'IR3G et de son aglycone IR contre les cibles neurogènes associées à la MP. Cependant, de futures études doivent évaluer expérimentalement l'activité inhibitrice

contre les trois cibles pharmacologiques liées à la MP ainsi que les propriétés pharmacocinétiques de l'IR3G. Cette association peut être supérieure à la monothérapie à la lévodopa en termes de synergie pharmacodynamique et/ou de dose réduite de lévodopa.2 [(56), (57)].

II.3. L'activité anti-cancéreuse

De nombreuses espèces végétales ont été utilisées pour traiter ou prévenir le développement du cancer. De nombreux chercheurs ont identifié des espèces végétales aux propriétés anticancéreuses, en mettant l'accent sur les espèces végétales utilisées en phytothérapie dans les pays en développement [(58), (59) (60)].

La découverte des anti-oncogènes, ou gènes suppresseurs de tumeurs a permis aux chercheurs de mieux comprendre le mécanisme génétique d'apparition des tumeurs, ceci permet d'entrevoir la possibilité d'une approche entièrement nouvelle des cancers (61).

Selon des études, il a été démontré qu'un mélange de flavonoïdes prévient les polypes intestinaux et réduit la récurrence du CCR après résection [(62), (63)] À la recherche de composés qui pourraient agir en synergie avec la rutine dans le traitement de l'inflammation et du cancer.

II.4. L'activité anti bactérienne

Malgré les progrès étonnants de la recherche sur les médicaments, l'émergence et le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques sont devenus un défi médical mondial. Avec le développement de bactéries multirésistantes, les professionnels de la santé ne cachent pas leurs inquiétudes.

Les qualités antibactériennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Ces propriétés sont dues à la fraction des huiles essentielles contenues dans les plantes (64) .Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique mais a plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (65).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité et la perte des constituants cellulaires.

- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de la structure.
- Destruction du matériel génétique conduisant à la mort de la bactérie (66).

Le tableau indique les résultats de recherche effectuées avec les extraits de la plante *Diplotaxis harra* contre six souches bactériennes ; *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enteritidis*.

Tableau 3: Activité antibactérienne des extraits des feuilles/fleurs/racines de *Diplotaxis harra*.

Extraits		Diamètre de la zone d'inhibition (ZI, mm)					
Organes	Solvants	<i>B.cereus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>S.enteritidis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
Feuilles	Hexane	10	30	7	8	7	7
	Acétate d'éthyle	18	14	12	10	14	15
	Méthanol	Non testé					
Fleurs	Hexane	10	12	7	10	10	11
	Acétate d'éthyle	11	-	-	-	-	-
	Méthanol	-	15	11	10	7	-
Racines	Hexane	Non testé					
	Acétate d'éthyle	12	29	14	10	7	10
	Méthanol	Non testé					
Gentamicine (15µg/mL)		25	30	18		18	22

➤ Par comparaison avec l'antibiotique de référence (gentamicine), ils ont montré que :

L'extrait à l'Acétate d'éthyle des feuilles de *Diplotaxis harra* est aussi actif sur plusieurs souches.

L'extrait à l'Acétate d'éthyle des racines de *Diplotaxis harra* est aussi très réactif sur deux souches : *S. aureus* et *E. faecalis*. L'extrait de l'hexane des feuilles de *Diplotaxis harra* est très actif sur la souche : *S.aureus* avec une ZI=30mm.

Ces résultats montrent bien l'intérêt des extraits de *Diplotaxis simplex vis à vis* les souches bactériennes pathogènes GRAM+ et GRAM-. Nos données montrent que les bactéries Gram positif sont plus sensibles que les bactéries Gram-négatif aux différents extraits de *Diplotaxis simplex* et *Diplotaxis harra*.

VI. Généralité sur la Xanthine oxydase (XO)

III.1. Définition

La xanthine oxydase, qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines (figure 24), joue un rôle important dans la génération d'ERO, notamment O_2^- et H_2O_2 (67) Il a été isolé premièrement du lait de bovin (68).

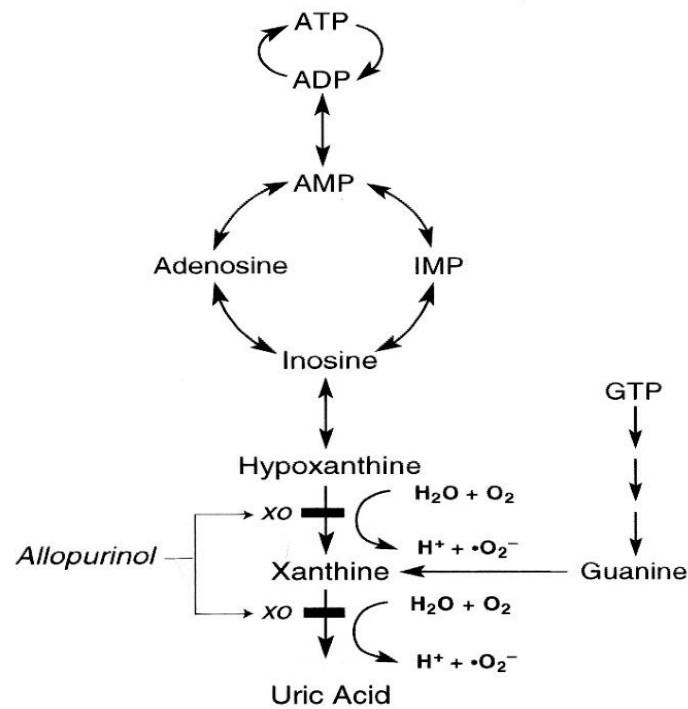


Figure 24: Voies de dégradation des purines

Le gène codant pour la xanthine oxydoréductase humaine (XOR) (figure 25), d'une longueur supérieure à 60Kb, est situé dans la bande p22 du chromosome 2 (69), constituée de 36 exons et 35 introns (70). Sa séquence est de 1333 acides aminés, il est presque homologue au XOR de la souris et du rat (71).

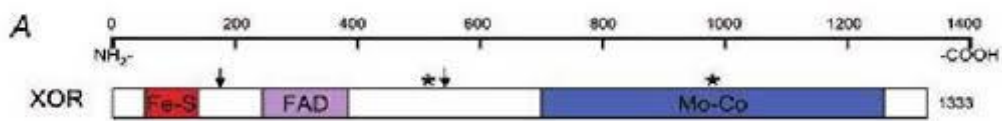


Figure 25: Gène codant pour la xanthine oxydoréductase

III.2. Structure de la xanthine oxydoréductase(XOR)

L'enzyme est un homodimère composé de deux sous-unités de 150 kDa (72) Chaque sous-unité à 3 domaines. Le domaine C-terminal de 85 kDa (590-1332 acides aminés) est le molybdène (Mo). Le domaine N-terminal de 20 kDa (1-165 acides aminés) se compose de deux sous-domaines avec deux centres (Fe²/S₂) qui lient jusqu'à quatre résidus de cystéine (73), et le domaine central de 40 kDa (226-531 acides aminés), une molécule de flavine.

III.3. Formes de la xanthine oxydoréductase (XOR)

La XOR est une molybdoflavoprotéine, elle existe sous deux formes interconvertibles (figure 26) :

- La xanthine déshydrogénase NAD⁺-dépendante (XDH ; EC 1.1.1.204), c'est une forme dominante *in vivo*.

- la xanthine oxydase O₂-dépendante (XO ; EC 1.1.3.22) peut être formée sous certaines conditions pathologique [(74), (75)].

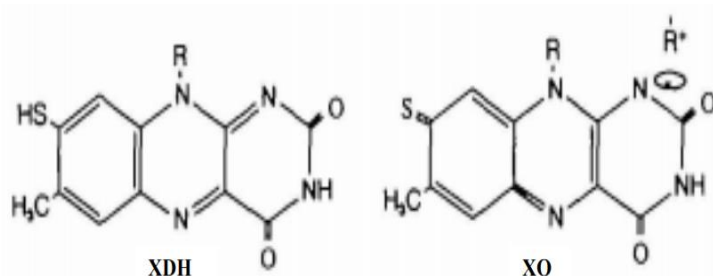


Figure 26: Structure du 8-SH-FAD dans la XDH et XO

La différence entre les deux formes de l'enzyme XOR est la réactivité du cofacteur flavine, avec l'accepteur d'électrons, NAD⁺ si la forme XDH et O₂ si la forme XO pour générer O₂ - (76).

La conversion de XDH en XO génératrice de radicaux se produit par modification réversible (par oxydation des résidus thiol) ou irréversible (par protéolyse) (77).

III.4. Distribution de la XOR

La XOR a été purifiée à partir du lait de vache, a été largement étudiée au début des années 1970 et a été signalée comme la deuxième protéine la plus abondante sur la membrane des globules gras du lait (MFGM) (78) (figure 27). Le tableau (4) comprend divers endroits où XOR est distribuée et fonctionné.

Tableau (4) : Lieux de distribution et activité de la XOR.

	Expression	Référence
Distribution du XOR	Dans les seins en lactation.	(79)
	Tissulaire et dans divers organes, notamment (le foie, les reins ; intestin).	(80)
	Dans le tractus gastro-intestinal.	(81)
	Dans la peau, le thymus, le tissu adipeux blanc.	(82)
	Dans le cerveau, les poumons et le mésentère.	(83)
	Dans la langue, les tubules rénaux, la glande surrénale.	(84)
L'activité de cette enzyme a été démontrée	Dans le placenta, le pancréas, la prostate, les testicules, les ovaires et les leucocytes du sang périphérique.	(81)
	Dans la rate, les muscles squelettiques et le cœur.	(85)
	Dans la microvascularisation endothéliale humaine de plusieurs tissus.	(86)
	Sur sa surface apicale (Cantu -Medellin et Kelley, 2013).	(87)
	Dans la muqueuse nasale.	(88)
	Dans la matrice cytoplasmique des entérocytes.	(89)

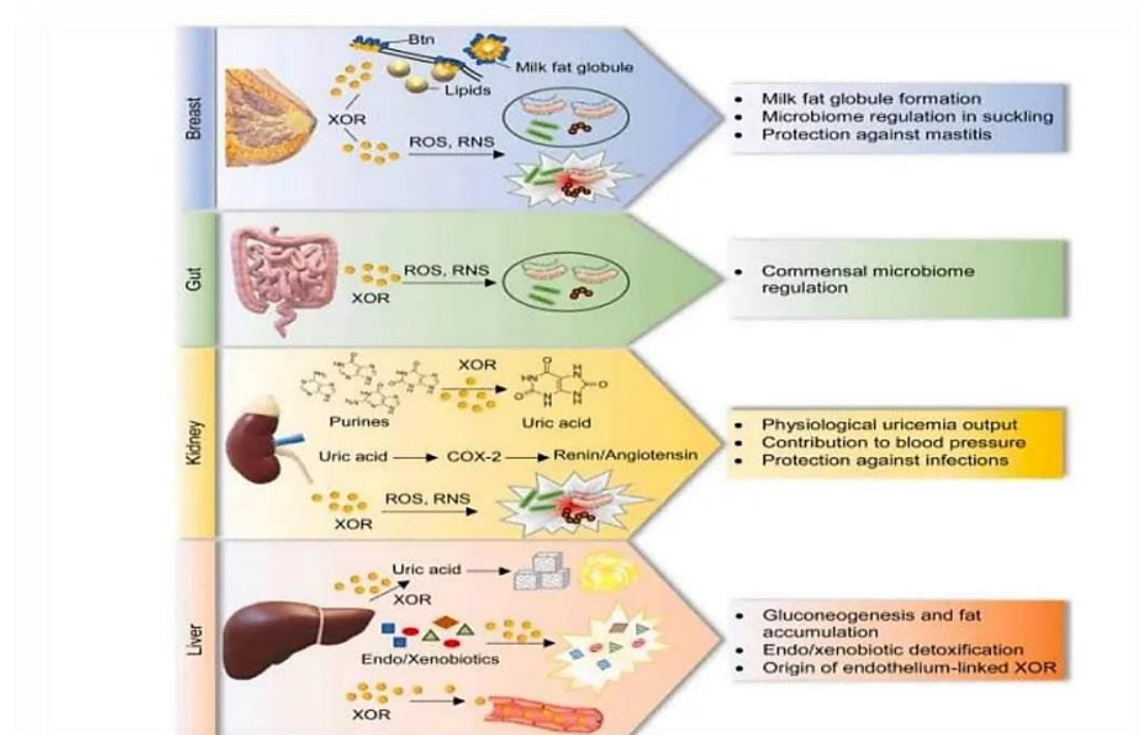


Figure 27: Tissus humains exprimant un niveau élevé de la xanthine oxydoréductase et fonction locale des activités et produits XOR (113).

III.5. Implication de l'enzyme Xanthine oxydoréductase dans le stress oxydatif

Le radical libre produit par XO est faible au repos, mais il joue un rôle important au cours de l'ischémie-reperfusion: à l'effort, le flux sanguin est majoritairement dirigé vers les muscles squelettiques actifs. Cependant, dans certaines conditions d'exercice (isométrique, épuisé), le flux sanguin ne peut plus assurer sa fonction d'apport d'oxygène aux muscles squelettiques. Par exemple, pendant un exercice isométrique, le flux sanguin peut être réduit en raison de la compression capillaire causée par la contraction musculaire. À la fin de l'exercice, le flux sanguin fournit de grandes quantités d'oxygène aux tissus partiellement ou complètement hypoxiques. Ce phénomène est appelé "ischémie-reperfusion". Dans des conditions normales, la xanthine déshydrogénase (XDH) convertit la xanthine en acide urique en donnant des électrons au NADP^+ . Dans des conditions hypoxiques, les xanthines sont ensuite formées par métabolisme anaérobie et la XDH est convertie en xanthine oxydase (XO). Pendant la reperfusion, il y a un grand afflux d' O_2 , donc XO convertit la xanthine en acide urique en donnant des électrons à O_2 , entraînant la formation d' O_2^- .

III.6. Inhibition de la XOR

Les puissants inhibiteurs XOR peuvent être divisés en deux catégories ;

III.6.1. Inhibiteurs analogues de substrats

III.6.1.1. Allopurinol et alloxanthine :

L'allopurinol bloque la reperfusion du cœur, des reins, de l'intestin et du foie, améliore la fonction et la survie du greffon après une transplantation rénale et augmente la survie en réponse à un choc circulatoire. Au niveau du cœur, il protège également contre les arythmies induites par la reperfusion (90) L'allopurinol a été utilisé comme médicament cliniquement efficace et bien toléré pour le traitement de l'hyperuricémie associée à la goutte (91) (92) (93) L'oxypurinol est un inhibiteur non compétitif de cette enzyme ; la formation de cette composé dont la persistance à long terme dans les tissus est responsable de la plupart l'activité pharmacologique de l'allopurinol (94).

III.6.2. Autres inhibiteurs de la XOR

L'inhibiteur initial de la xanthine oxydase qui a été découvert résultait de la dégradation de l'acide folique. Cet inhibiteur a ensuite été identifié comme étant la 2-amino-4-hydroxy-6-formylptéridine, communément appelée 6-ptéridylaldéhyde (figure 28). Il a été démontré que l'administration d'aldéhyde de ptérine réduit le potentiel de dommages post-ischémiques dans les intestins (95).

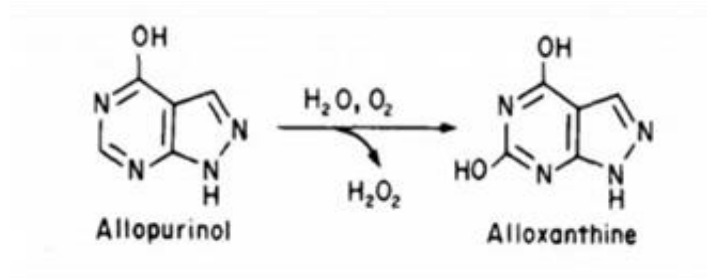


Figure 28: Mécanisme de 6-ptéridylaldéhyde

En 1967, Baker et Wood ont mené une étude qui a démontré que la 9-phénylguanine était un inhibiteur significativement plus puissant de la xanthine oxydase que la 9-méthylguanine, avec une différence de cent quarante fois. De plus, l'interaction entre l'enzyme et le composé aromatique a été déterminée comme étant hydrophobe par opposition. Suite à ce type d'interaction, le site actif de l'enzyme s'adapte pour créer un inhibiteur irréversible (96).

III.6.2.1. Cyanide

En 1926, Szent-Györgyi a découvert que le cyanure peut être utilisé comme inhibiteur de la xanthine oxydase. Plus tard, en 1958, Handler a rapporté que le 14CN se lie à l'enzyme avec une stoechiométrie d'une molaire par site actif. Cependant, Massey et Edmondson ont montré plus tard en 1970 que ce n'était pas la raison de l'inactivation de l'enzyme. Il a été constaté que le cyanure réagit avec l'enzyme pour libérer un atome de soufre vital appelé sulfocyanate. Après incubation avec Na_2S , l'activité peut être restaurée dans une mesure significative (96).

III.6.2.2. Méthanol et le formaldéhyde

Le méthanol inhibe la xanthine oxydase lorsqu'il est incubé en présence de xanthines. Le méthanol est probablement converti en formaldéhyde (96).

L'éthylène glycol et le mercaptoéthanol inhibent également la xanthine oxydase. Il a été démontré que le premier était converti par voie enzymatique en glyoxylate et oxalate (96).

III.6.2.3. Febuxostat : (TEI-67202- (3-cyano-4-isobutoxyphényl) -4-méthyl-5-thiazolecarboxylique) :

Febuxostat vient d'être lancé en France sous la marque Adénuric®. Comme l'allopurinol, il a une activité in vivo plus importante et plus durable comparable à l'allopurinol, et a un effet hypouricémiant. Il abaisse l'acide urique sérique par inhibition mixte de la xanthine oxydoréductase (97) (figure 29).

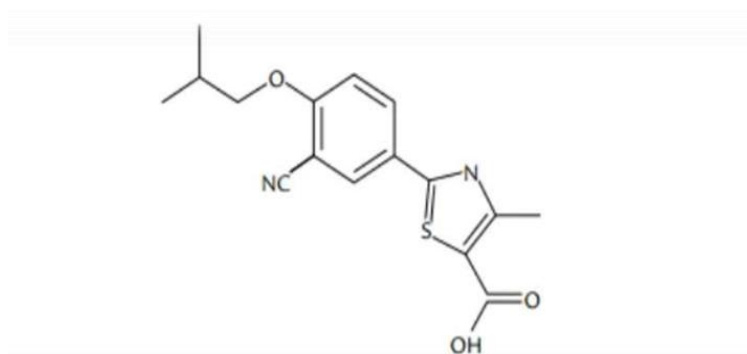


Figure 29: Structure chimique de l'inhibiteur febuxostat

III.6.3. Inhibiteurs naturels

III.6.3.1. Flavonoïdes :

L'inhibition de la xanthine oxydoréductase par la famille des flavonoïdes est un développement prometteur. Il existe actuellement plus de 4000 flavonoïdes connus, qui offrent un substitut intrigant pour le traitement des maladies causées par les radicaux libres. La grande variété présente dans la famille des flavonoïdes souligne l'importance d'une compréhension approfondie de la corrélation entre structure et fonction afin d'identifier les molécules les plus puissantes.

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs XOR naturels et obtenus à partir de plantes (98). Plusieurs études ont été menées, révélant que ces inhibiteurs suppriment de manière compétitive XOR (98).

Les données de cette étude suggèrent que la structure plane est nécessaire pour l'activité inhibitrice élevée contre la xanthine oxydoréductase. Mais la structure planaire des flavones seule n'est pas suffisante pour induire l'inhibition de cette enzyme. Les groupes hydroxyle en C-5 et C-7 et la double liaison entre C-2 et C-3 sont essentiels pour une activité inhibitrice de la xanthine oxydase plus élevée. Les flavones ont montré une activité inhibitrice légèrement supérieure à celle des flavonols, un effet qui pourrait s'expliquer par l'affinité structurelle entre les 5,7 dihydroxyflavones et l'enzyme (99).

Les groupes hydroxyle qui affectent négativement l'inhibition de la xanthine oxydoréductase sont situés aux positions 2, 8 et 3. Le remplacement en position 2 a le plus grand impact. En revanche, l'introduction de fonctions hydroxyle aux positions 8 et 3 a montré à peu près les mêmes résultats. Deux caractéristiques importantes observées sont la formation de liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyle attachés à C₇ et C₅, et l'interaction du groupe carbonyle avec les résidus Glu 1261, Arg 880 et Thr 1010, respectivement (100).

L'apigénine était l'inhibiteur le plus puissant (figure 30), montrant l'interaction la plus favorable au site réactif XOR. Le cycle benzopyronebicyclique de l'apigénine est attaché à Phe 914 et le groupe phénolique s'étend dans l'espace environnant avec plusieurs résidus hydrophobes (98).

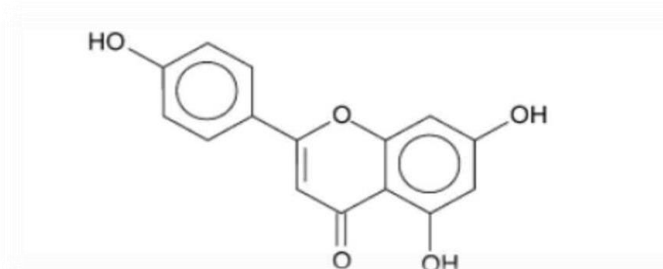


Figure 30: Structure de l'apigénine (flavone)

La quercétine montre une inhibition compétitive de la xanthine oxydoréductase (figure 31), qui est également observée dans d'autres flavones, suggérant une liaison au centre allostérique de la xanthine oxydoréductase (99).

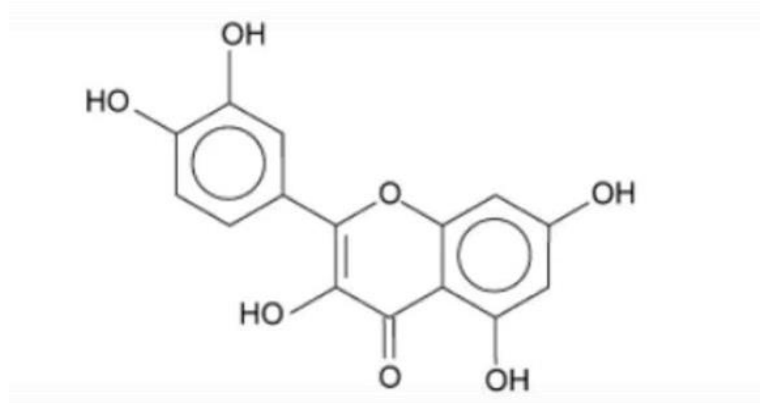


Figure 31: Structure de la quercétine (flavonol)

La quercétine et la myricétine (figure 32) ont montré la même orientation que l'apigénine dans le centre actif, cependant, l'interaction était plus faible en raison de la liaison instable du groupe hydroxyle lié à C3, qui est situé dans la région non polaire des résidus Phe 1009, Val 1011 et Leu 1014 (101).

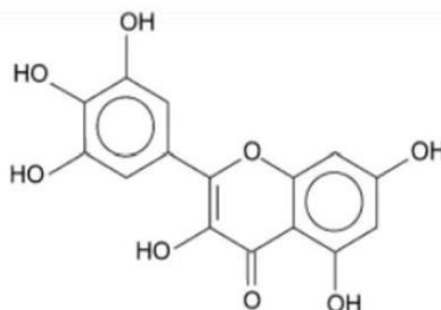


Figure 32: Structure de la myricétine (flavonol)

En ce qui concerne l'orientation présentée par la génistéine, en comparaison avec l'apigénine, l'étude de modélisation de Lin et *al.* 2002 a montré que cette molécule peut guider son anneau de benzopyranone à une région d'hydrophobe de l'enzyme. Avec des liaisons instables et une inhibition très faible en comparaison avec d'autres composés flavonoïdes (101).

III.7. Rôles physiologiques de la XOR

Ces dernières années, on a observé un intérêt croissant pour la régulation du gène XOR afin de comprendre les facteurs responsables de l'expression spécifique de cette enzyme dans les tissus et les cellules, ainsi que pour situer cette régulation dans son contexte physiologique. Plusieurs résultats significatifs ont récemment été rapportés, ce qui élargit la compréhension du rôle physiologique de cette enzyme au-delà du catabolisme des purines.

L'augmentation de l'expression de XOR peut jouer un rôle dans les effets immuno-modulateurs et antiviraux provoqués par certaines cytokines (102) Il est bien connu depuis longtemps que XOR possède des propriétés bactéricides en présence d'hypoxanthine. Cette enzyme est régulée par des cytokines pro-inflammatoires et est considérée comme un agent de défense principalement en raison de sa capacité à générer des ROS.

Le peroxy-nitrite, généré par XOR, joue un rôle dans la stérilisation de l'intestin du nouveau-né en ciblant les bactéries pathogènes présentes dans la membrane épithéliale du tractus digestif. Le rôle des ROS dans la signalisation cellulaire suscite un intérêt croissant

de manière générale (103) L'acide urique, qui est un antioxydant puissant, agit comme un piègeur efficace de peroxynitrite et est présent à des concentrations relativement élevées dans le plasma des êtres humains et des primates supérieurs qui ne possèdent pas l'urate oxydase. Il offre une protection.

III.8. Rôle pathologique de XOR

La XOR a la capacité de se lier aux glycosaminoglycanes présents à la surface des cellules endothéliales vasculaires sous forme concentrée, cela peut entraîner des dommages oxydatifs dans des organes situés à distance du site d'origine des dommages, même s'ils ont une faible teneur en XOR eux-mêmes (104).

La découverte que XOR peut réagir avec le monoxyde d'azote (NO) ajoute une nouvelle dimension aux considérations sur le rôle de l'enzyme dans les systèmes vasculaires. Le NO et le superoxyde interagissent rapidement, formant ainsi le peroxynitrite, un oxydant puissant et destructeur. Ce peroxynitrite peut être produit par XOR lui-même lorsqu'il est complètement ou partiellement dissocié de la L-arginine ou de la tétrahydrobioptérine.

Cette espèce réactive a récemment suscité un grand intérêt clinique et a été impliquée dans diverses pathologies, notamment l'arthrite, l'asthme, la septicémie, l'athérosclérose et en particulier les maladies neurologiques telles que la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (103).

III.8.1. Rôle de la XOR dans l'ischémie / réperfusion :

Granger et ses collègues ont attiré l'attention sur la XOR en proposant un rôle clé pour les enzymes XOR dans la pathogenèse de l'ischémie-réperfusion (IR). Le mécanisme hypothétique est illustré à la figure (33).

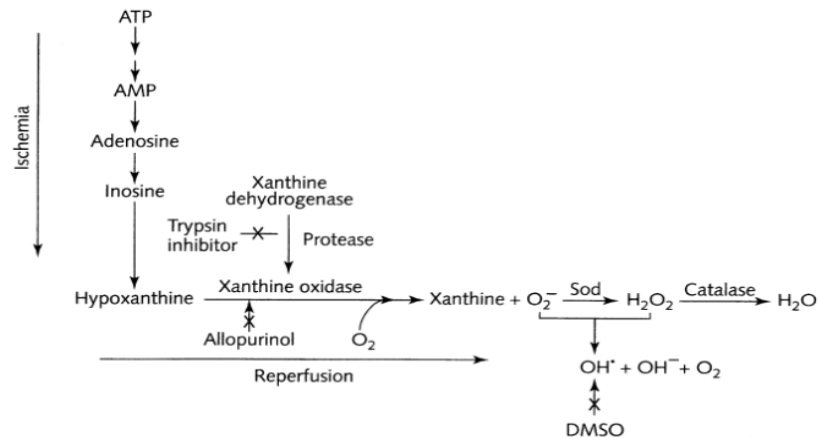


Figure 33 : Mécanisme de génération de ROS dans IR comme proposé par Granger et autres (104)

Au cours de l'ischémie, le gradient ionique transmembranaire est dissipé, permettant des concentrations élevées de calcium cytoplasmique. Cela active à son tour une protéase qui convertit de manière irréversible la XDH prédominant dans le corps en XO. Dans le même temps, l'ATP cellulaire est catabolisé en hypoxanthine, qui s'accumule (105). En reperfusion, l'oxygène de rentrée, l'hypoxanthine et la XO sont combinés pour produire l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent interagir pour produire une gamme d'agents cytotoxiques, y compris les radicaux hydroxyles (Harrison 2002). Le superoxyde a été impliqué dans un rôle primordial dans les lésions post-ischémiques ou de reperfusion dans une grande variété de tissus y compris l'intestin, le cœur, le rein, le foie et le cerveau (106).

CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Matériel et Méthodes

I.1. Lieu du travail

Le présent travail de recherche a été effectué dans le laboratoire de biochimie appliquée (Biopole Chaab Rsase) et le laboratoire d'enzymologie (faculté SNV).

I.2. Matériel végétal

Les extraits de la plante *Diplotaxis harra* utilisés dans ce travail ont été fournis par le laboratoire de biochimie appliquée.

I.3. Screening phytochimique

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative qui permet de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires dans les tissus végétaux de la plante étudiée. La détection de ces composés est basée sur des tests de solubilité des composants, des réactions de précipitation et de turbidité, des changements de couleur spécifiques ou un examen sous lumière UV (107) (tableau 5).

Tableau 5 : Résumé des tests préliminaires du screening photochimique

Groupes chimiques	Test	Révélation	Observation de résultats positifs	Références
Tanins	Test de Stiasny	1 mL d'extrait +1mL H ₂ O+ quelque gouttes de FeCl ₃ 1 %	Apparition d'une coloration Verdâtre ou bleue noirâtre	(GanatraetGurubaxani, 2016)
Sapoosides	Test de mousse	10 mLd'extrait+ 1ml H ₂ O+agitation	Formation d'une mousse persistante	(Sushama,2017)
Polyphénols	Chlorure de fer	2 mL d'extrait + quelque gouttes de FeCl ₃ 5 %	Apparition d'une coloration bleue noirâtre ou verte plus ou moins foncée	(Prakash et <i>al.</i> ,2015)
Coumarines	Test de confirmation NH ₄ OH	1 mL d'extrait + quelque gouttes de Ammoniaque (NH ₄ OH 20 %)	Apparition d'une Fluorescence bleue sous UV	(Ganatra et Gurubaxani, 2016)

Groupes chimiques	Test	Révélation	Observation de résultats positifs	Références
Flavonoïdes	Shinoda (ou cyanidine)	Quelque mL d'extrait +5 mL (EtOH) +1mL HCl + 5 mg Copeaux de magnésium + attendre 1 ou 2 min	Apparition d'une coloration rouge ou Marron foncé	(Gul, 2017;Gnahoué et <i>al.</i> , 2015)
Terpènes et Stéroïdes	Test de Salkowski	Salkowski 5 mL extrait + 1mL H ₂ SO ₄	Apparition d'une Coloration Rouge avec Coloration brun rougeâtre à l'interphase (un anneau rouge brun)	(Ganatra et Gurubaxani, 2016)
Alcaloïdes	Test de Dragendorff	2 mL d'extrait+2ml Solution de Dragendorff	Formation d'un précipité de coloration Rouge brun	(Sushama, 2017)
Anthocyanes	Mise en évidence des anthocyanes	5 ml de l'extrait+5ml (acide sulfurique 10%) + quelque goutte de (NH ₄ OH)	Apparition d'une Coloration bleu-violet	(Parekh et Chanda, 2007).

I.4. Activités anti-oxydantes

Les extraits méthanoliques des 3 organes (feuilles, tiges et fleurs) de la plante étudiée (*Diplotaxis harra*) sont utilisés pour évaluer l'activité anti-oxydante.

I.4.1. Inhibition de l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR)

I.4.1.1. Préparation des solutions utilisées

- **Tampon phosphate :**
 - Préparation du tampon Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 avec concentration de 50mM et pH=7.5 sachant que le PM (Na_2HPO_4) = 141,958 g/mol et le PM (NaH_2PO_4)= 119,97 g/mol.
 - Dissoudre 2,12937g de Na_2HPO_4 dans 300 ml de l'eau distillée et 1,779g de NaH_2PO_4 dans 300 ml de l'eau distillée.
 - L'ajustement du pH du tampon à 7,5 (figure 34) par le pH-mètre en ajoutant de Na_2HPO_4 sur NaH_2PO_4 .



Figure 34: Ajustement du pH du tampon phosphate par le pH-mètre

- **Solution de substrat Xanthine :**
 - Préparation de la solution de substrat avec concentration 0,15mM à pH 7,5 sachant que le PM du substrat est 152,11 g/mol.
 - Dissoudre 1,8 mg de substrat dans 100 ml de l'eau distillée.
- **Différents concentrations des extraits :**
 - La préparation de la solution mère est effectuée avec une concentration de 5mg/ml des extraits MeOH des 3 parties de l'espèce *Diplotaxis harra* en ajoutant le DMSO pour faciliter la solubilisation des extraits.
 - À partir de la solution mère, nous avons fait une dilution tube en tube 7 fois (concentration/2).
 - Les différentes concentrations préparées sont mises dans le vortex quelques minutes pour bien mélanger.
- **Solution de l'allopurinol :**
 - Dissoudre 1,36 mg d'allopurinol dans 100 ml de l'eau distillée, en ajoutant le DMSO pour faciliter la solubilisation.
 - À partir de la solution mère, nous avons fait une dilution tube en tube 7 fois (concentration/2).
 - Les différentes concentrations préparées sont mises dans le vortex quelques minutes pour bien mélanger.

I.4.1.2. Procédure

L'activité inhibitrice de XOR a été déterminée selon le protocole de Fried et Fried (1974) avec une légère modification. Le milieu réactionnel contient 315 µL (50 mM ; pH 7,5) de tampon phosphate, 16µL de l'extrait avec différentes concentrations et 15 µL (0,07 U/ml) de la solution enzymatique. Initier la réaction en ajoutant 150 µL de la solution de substrat (xanthine, 0,15 mM dans le même tampon) (tableau 6). L'absorbance est enregistrée à 295 nm, indiquant la formation d'acide urique.

L'activité inhibitrice a été exprimée en pourcentage d'inhibition de XO, calculée comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\Delta A \text{ control} - \Delta A \text{ échantillon}) / \Delta A \text{ control}] \times 100.$$

Control contenait le milieu sans extrait.

Échantillon contenait le milieu avec extrait.

Control positif contenait de l'allopurinol.

Tableau 6 : Protocole détaillé de l'inhibition de l'enzyme XOR

Milieu réactionnel	Blanc	Contrôle négative	Échantillon	Contrôle positif
Extrait	16ul	/	16ul	/
Substrat Xanthine	150ul	150ul	150ul	150ul
Tampon	315ul	315ul	315ul	315ul
L'enzyme xanthine oxydase	/	15ul	15ul	15ul
l'allopurinol	/	/	/	16ul

I.4.2. Test de piégeage du radical hydroxyle (OH•)

I.4.2.1. Préparation des solutions utilisées

- **Solution du FeSO₄ :**
 - Dissoudre 91,2 g de FeSO₄ (sachant que le PM = 151,908 g/mol) dans 400 ml de l'eau distillée.
- **Solution de sodium salicylate :**
 - Dissoudre 1,28 g de sodium salicylate (sachant que le PM = 160,103 g/mol) dans 400 ml de l'eau distillée.
- **Solution de peroxyde d'Hydrogène H₂O₂ :**
 - Dissoudre 80 mg d'H₂O₂ (sachant que le PM = 34,015 g/mol) dans 400 ml de l'eau distillée.
- **Solution mère :**
 - Dissoudre 10 mg d'extraits méthanoliques des 3 organes (feuilles, fleurs et tiges) dans 2 ml de l'eau distillée (ED). Après, nous avons préparé 6 concentrations différentes :
 - C1: 5 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1 ml de S.M.
 - C2: 2,5 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1 ml de C1
 - C3: 1,25 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1 ml de C2
 - C4: 0,625 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1ml de C3
 - C5: 0,3125 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1 ml de C4
 - C6: 0,156 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1ml de C5
- **Solution d'acide gallique et d'acide ascorbique**
 - La solution mère (SM) des deux molécules est préparée avec la dissolution de 4 mg d'acide gallique dans 2 ml de l'eau distillée (ED), et la même procédure pour l'acide ascorbique. Après, nous avons préparé 6 concentrations différentes :
 - C1 : 1 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1 ml de SM.
 - C2 : 0,5 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1 ml de C1
 - C3 : 0,15 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1 ml de C2
 - C4 : 0,12 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1ml de C3
 - C5 : 0,06 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1 ml de C4
 - C6 : 0,03 mg/ml : 1 ml d'ED. + 1ml de C5

I.4.2.2. Procédure

La technique est réalisée selon la méthode de Smirnoff et Cumbes (1989). Le principe est de générer le radical hydroxyle (OH^\bullet) dans le milieu réactionnel par la réaction de Fenton, puis les radicaux OH^\bullet générés réagissent avec le salicylate de sodium pour générer des complexes d'hydroxyle salicylate. Le volume final du milieu réactionnel est de 1,5 ml, et le milieu est composé de 0,5 ml de FeSO_4 (1,5 mM), 0,35 ml de peroxyde d'hydrogène (6 mM), 0,15 ml de salicylate de sodium (20 mM) et 0,4 ml des différentes concentrations des extraits des 3 parties étudiées. Après incubation pendant 1 h à 37°C , l'absorbance du complexe hydroxy salicylate est mesurée à 562 nm. Le taux d'inhibition d' OH^\bullet est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{inhibition} = [1 - (\text{A1} - \text{A2}) / \text{A0}] \times 100$$

A0 : l'absorbance du contrôle (sans extrait).

A1 : l'absorbance en présence d'extrait.

A2 : l'absorbance sans sodium salicylate.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Screening phytochimique

Une analyse qualitative a été réalisée sur différents extraits de l'espèce étudiée *Diplotaxis harra* afin de mettre en évidence les différentes classes de métabolites secondaires qui composent ces extraits. Ces réactions reposent sur le phénomène de précipitation ou de coloration de réactifs spécifiques (tableau 7).

Les résultats phytochimiques sont classés comme suit :

- (+++) Réaction très positif : Présence très confirmée
- (++) Réaction positif : Présence confirmée.
- (+) Réaction positive : Présence modérée.
- (-) Réaction négative : Absence.

À partir des résultats obtenus du screening phytochimique des 4 extraits étudiés (Éther de pétrole, méthanol, Hexane et dichlorométhane) de la plante *Diplotaxis harra*, nous constatons une richesse relative en tanins, coumarines et alcaloïdes pour les trois parties de la plante ; feuilles, fleurs et tiges, et cela due à l'observation positive des résultats.

Le métabolite secondaire saponoside, montre un résultat positif chez la moitié des extraits, d'entre eux : les extraits EP et hexane des fleurs et tiges et l'extrait méthanolique des tiges.

D'autre part, nous avons observé que les polyphénols se trouvent avec une concentration importante dans l'extrait MeOH, et avec une faible concentration pour l'extrait dichlorométhane des tiges. Par contre, les flavonoïdes ont montré un résultat positif pour l'extrait méthanolique des feuilles. Les terpènes et les stérols ont indiqué une réaction plus au moins positive pour l'extrait hexane (feuille) et l'extrait MeOH (fleur), avec une absence totale des anthocyanes pour tous les extraits.

Tableau 7 : Résultats du screening phytochimique

Groupe chimique Les extraits	Tanins	Saponosides	Polyphénols	Coumarines	Flavonoïdes	Terpènes etStérols	Alcaloïdes	Anthocyanes
EP. (Ck).Feuille	++	-	-	++	-	-	+++	-
EP. Fleur.	+	+++	-	+	-	-	++	-
EP. Tige	++	++	-	+++	-	-	++	-
Héxane Feuille	+	+++	-	+++	-	+	++	-
Héxane Fleur	++	+++	-	++	-	-	++	-
Héxane Tige	+	+++	-	+++	-	-	++	-

Groupe chimique Les extraits	Tanins	Saponosides	Polyphénols	Coumarines	Flavonoïdes	Terpènes etStéroïdes	Alcaloïdes	Anthocyanes
MEOH Feuille	+++	-	+++	-	+++	+++	++	-
MEOH Fleur	+++	-	+++	++	-	+	++	-
MEOHTige	+++	+++	+++	++	-	-	+++	-
Dichlo. Feuille	++	-	-	+++	-	-	++	-
Dichlo. Fleur	+	-	-	+	-	-	++	-
Dichlo. Tige	+++	-	+	+++	-	-	+++	-

II. Activités anti-oxydantes

L'activité anti-oxydante des extraits méthanoliques de différentes parties de la plante *Diplotaxis harra*, tige, feuille et fleur, a été évaluée par deux méthodes : l'effet inhibiteur des extraits sur l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR) et l'effet scavenger du radical hydroxyle OH•.

II.1. Effet inhibiteur de l'enzyme XOR

Les résultats obtenus, représentent la concentration inhibitrice à 50% de l'enzyme XOR dans le milieu réactionnel ; exercée avec les trois extraits, l'extrait MeOH des feuilles (MeOH Fe), fleurs (MeOH Fl) et des tiges (MeOH Ti). Ce résultat montre que tous les extraits inhibent l'activité de la XOR significativement en comparant avec le contrôle positif l'allopurinol, dans laquelle une valeur d'IC₅₀ faible indique une valeur activité de piégeage des radicaux plus élevée (tableau8).

Tableau 8 : IC₅₀ des extraits de *Diplotaxis harra* qui inhibent l'enzyme XOR.

Extraits	IC ₅₀ (mg /ml)
MeOH Fe	2,87
MeOH Fl	0,0324
MeOH Ti	0,125
Allopurinol	1,56

Les valeurs des IC₅₀ des différents extraits représentées dans le tableau (7) montrent que l'extrait MeOH Fl a l'effet inhibiteur le plus puissant avec une IC₅₀ de 0,0324 mg/ml, suivi par l'extrait MeOH Ti avec une IC₅₀ de 0,125 mg/ml et l'extrait MeOH Fe qui a une IC₅₀ de 2,87 mg/ml, comparativement avec l'IC₅₀ du contrôle positif l'allopurinol avec une IC₅₀ 1,56 mg/ml.

Nous avons constaté que l'effet inhibiteur des extraits MeOH (Fl., Ti.) sur l'enzyme XOR était fiable à des concentrations différentes, et même mieux que l'effet inhibiteur du contrôle positif l'allopurinol. Cette fiabilité est grâce à la polarité des extraits méthanolique due à leur richesse en groupement hydroxyle (OH); ce dernier, affecte la structure de l'enzyme et sa fonction.

D'autres recherches qui ont été faite sur les 2 espèces (*Diplotaxis simplex* et de *Diplotaxis harra*) ont montré que les extraits de fleurs de *Diploraxis simplex* et de *Diplotaxis harra* présentaient les taux les plus élevés de capacité d'inhibition de l'acétylcholinestérase ($CI_{50} = 0,42$ mg/mL et $CI_{50} = 0,72$ mg/mL, respectivement). Une corrélation négative a été observée entre les valeurs CI_{50} et les quantités de phénol, de flavone et de flavonol dans le *Diplotaxis simplex*. Pour *Diplotaxis harra*, une telle corrélation n'a été observée qu'avec les quantités de di-hydroflavonol et de flavanone. Les résultats n'ont pas révélé de différences significatives entre les deux espèces, sauf en ce qui concerne la capacité de récupération de l'oxyde nitrique ($p < 0,05$; test t-Student), avec la présence de *Diplotaxis harra*. (108)

II.2. Effet scavenger du radical hydroxyle (OH•)

Le piégeage des radicaux libres hydroxyles (OH•) est largement utilisé pour évaluer l'activité anti-oxydante ; ce test reflète la capacité de don d'hydrogène des antioxydants. Les résultats ont été exprimés comme valeurs IC_{50} en mg/ml (tableau 9).

Tableau 9 : IC_{50} des extraits de *Diplotaxis harra* de l'effet scavenger du radical hydroxyle OH.

Extrait	IC_{50} (mg/ml)
MeOH Fe	54,48
MeOH Fl	55,23
MeOH Ti	59,10
Acide ascorbique	0,03
Acide gallique	0,052

L'étude de pouvoir antioxydant via l'inhibition du radical libre (OH•) a montré que les extraits MeOH des feuilles (MeOH Fe), fleurs (MeOH Fl) et des tiges (MeOH Ti) possèdent un effet scavenger significatif, avec cependant un meilleur taux d'inhibition pour l'extrait (MeOH Fe) ($IC_{50} = 54,48$ mg/ml) suivi par l'extrait (MeOH Fl) ($IC_{50} = 55,23$ mg/ml) et l'extrait (MeOH Ti) ($IC_{50} = 59,10$ mg/ml).

Dans une étude récente l'activité anti-oxydante a été déterminée chez les parties aériennes de *Diplotaxis harra* : en utilisant un radical libre stable (1, 1-diphényle-2-

picrylhydrazyl) DPPH. L'activité de piégeage des radicaux libres de l'extrait brut de la plante a donné une valeur IC_{50} de 2,11 mg/ ml, supérieur à celle du catéchol, témoin positif (0,15 mg ml⁻¹). Cela a été confirmé par Falleh et al (2013), qui ont rapporté que le *Diplotaxis* sauvage peut être utilisé comme une source puissante d'antioxydants et d'antibiotiques naturels en raison de sa teneur élevée en polyphénols.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion Générale

La découverte des ressources naturelles du règne végétale reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques et les plantes restent toujours une source fiable et inépuisable de biomolécules connus par leurs propriétés pharmacologiques. Notre pays contient plusieurs plantes qui sont utilisées en médecine traditionnelle dont leurs métabolites secondaires sont des principes actifs.

Notre travail porte sur l'étude de l'espèce *Diplotaxis harra*, qui appartient à la famille des *Brassicacées*. C'est l'une des familles les plus importantes dans la région méditerranéenne, et le plus utilisé dans la médecine traditionnelle.

Nous avons travaillé sur les extraits polaires et apolaires de différentes parties de la plante *Diplotaxis harra* ; feuilles, fleurs et tiges, préalablement préparés. Le premier test effectué est le screening phytochimique associé à l'identification qualitative des métabolites secondaires dans les extraits. Les résultats obtenus ont permis de dire que cette plante est riche en : tanins, coumarines et alcaloïdes. Ces constituants sont connus par leurs diverses propriétés biologiques et thérapeutiques.

L'évaluation d'activité anti-oxydante par la méthode inhibitrice de l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR) montre que l'extrait MeOH des fleurs (MeOH Fl) et l'extrait MeOH des tiges (MeOH Ti) présentent la meilleure activité inhibitrice avec des valeurs IC_{50} de 0,0324 mg/ml et 0,125 mg/ml respectivement en comparaison avec le control positif Allopurinol.

Le test de l'effet scavenger du radical hydroxyl ($OH\bullet$) a montré que l'extrait (MeOH Fe), dont la valeur d' IC_{50} est 54,48 mg/ml, avait un effet scavenging très important *vis-à-vis* le radical hydroxyle ($OH\bullet$).

Enfin, et grâce aux résultats obtenus dans notre travail, nous pouvons confirmer que cette plante contient des molécules bioactifs, ainsi qu'elle possède un pouvoir antioxydant important, due à son effet inhibiteur d'enzyme XOR et un effet scavenging *vis-à-vis* le radicale hydroxyle libre.

Ce travail pourrait être considéré comme un point de départ pour d'autres recherches sur les effets biologiques bénéfiques de la plante *Diplotaxis harra*, de ce fait on peut proposer comme perspectives :

- Identification et purification des molécules bioactives par des techniques appropriées à savoir ; DAD-HPLC, LC/MS et GC/MS,

Conclusion Générale

- Étude de l'effet des molécules de cette plante sur différents pathologies induites *in vivo* sur un modèle animale,
- Étude de l'effet des molécules de cette plante sur des lignées cellulaires exprimant des pathologies chroniques,
- Études cliniques de l'effet des molécules de cette plante sur des sujets pathologiques humains exprimant des pathologies chroniques.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIE

- 1) (Atawodi, 2005 ; Georgegetti et al., 2003)
- 2) (Chris A.Pritsos., 2000).
- 3) (da Silva et al. 2004).
- 4) (Harborne et Williams, 2001 ; Li et al., 2001 ; Williams et Grayer, 2004 In Isorez, 2007)
- 5) (k.l.kavanagh et al. crystal structure of the selenocysteine to glycine mutant of human glutathione peroxidase 1.).
- 6) (Lin et al. 2002
- 7) (Lobo et al., 2010).
- 8) (Magder, 2006)
- 9) (Martinez-Cayuela, 1995)
- 10) Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. *Food Microbiology*, 27(5): 586–591.
- 11) .L. Dupic, O. Huet, A. Harrois, et J. Duranteau, « Hypoxie et fonction mitochondriale », *Réanimation*, vol. 19, no 5, p. 399-405, sept. 2010
- 12) I.Ochwang'I DO, Kimwele CN, Oduma JA, Gathumbi PK, Mbaria JM, Kiama SG. Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014; 151:1040–1055. [PubMed: 24362078]
- 13) 4. Freiburghaus F, Kaminsky R, Nkunya MHH, Brun R. Evaluation of African plants for their in vitro trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996; 55:1–11. [PubMed: 9121161]
- 14) 8. Kamatou GPP, Van Zyl RL, Davids H, Van Heerden FR, Lourens ACU, Viljoen AM. Antimalarial and anticancer activities of selected South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. radula*. *South African Journal of Botany*. 2008; 74:238–243.
- 15) A. Guillouty El Babili, Fatiha, « Plantes médicinales et antioxydants », Thèse de Doctorat, Université Toulouse III- Paul Sabatier, Toulouse, France, 2016.
- 16) A. Rezaire, « Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa) », p. 215.
- 17) Activité antioxydante et anti-inflammatoire et toxicité et cytotoxicité d'une espèce du genre *Asphodelus*.pdf
- 18) Ahmed, A.F.; Hsieh, Y.T.; Wen, Z.H.; Wu, Y.C.; Sheu, J.H. Polyoxygenated sterols from the Formosan soft coral *Sinularia gibberosa*. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 1275–1279.
- 19) Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, Nishino T (1990). Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type of the O₂-dependent type. Amino acid sequences of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage site of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 14170-14175.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIE

- 20) Anonymous. 2005. A guide to Medicinal Plants in North Africa. IUCN Centre for Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain.109-110.
- 21) Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 291-312..
- 22) Attaa, E. M., Hashem, A. I., Ahmed, M. A., Salah, M. E., Marsyl, J., El-Sharkawc, E. R., 2011. Phytochemical studies on *Diploptaxis harra* growing in Sinai. *European Journal of Chemistry*. 2 (4): 535-538.
- 23) Battelli M. G., Bolognesi A., and Polito L. (2014). Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842 (9), pp. 1502-1517.
- 24) Battelli M. G., Bortolotti M., Polito L., and Bolognesi A. (2019). Metabolic syndrome and cancer risk: The role of xanthine oxidoreductase. *Redox Biology*, 21, 101070.
- 25) Berry C.E. and Hare J.M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* 555, 589-606.
- 26) Bortolotti M., Polito L., Battelli M. G., Bolognesi A. 2021. Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks. *Redox Biology*. 41 : 101882.
- 27) Boulos L. 1999. Flora of Egypt Check-list. Al-Hadara Publishing Co, Cairo, Egypt; 419-420.
- 28) Bray RC. (1975). Molybdenum-iron-sulferflavin hydroxylases and related enzymes. In "Boyer P.D (Eds.), *The enzymes*" 3rd Ed. Academic Press, New York. pp: 299- 419
- 29) Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. Tec et Doc,
- 30) Bruneton J. *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie*, Ed. Tec&Doc Lavoisier, 1987.
- 31) Cantu-Medellin N., and Kelle E. E. (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*, 1 (1), pp. 353-358.
- 32) Danny E.C. Van Hoorn, Robert J. Nijveldt, Paul A.M. Van Leeuwen, Zandrie Hofman, Laura M'rabet, Dries B.A. De Bont, Klaske Van Norren, (2002). Accurate Prediction Of Xanthine Oxidase Inhibition Based On The Structure Of Flavonoïdes, *European Journal Of Pharmacology* 451 (2002) 111–118.
- 33) Ehon, G. B. Callahan. S.. Nathan. H., Bieber, S., Rundles, R. W. And Hittchngs, G. H. (1963) Potentiation By Inhibition Of Drug Degradation: 6-Substituted Purines And Xanthine Oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 12: 85- 93.
- 34) Favier, A (2003). Le stress oxydant .L'actualité chimique, 108p

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIE

- 35) Fried, R., and Fried, L. W. (1974). Xanthine Oxidase (Xanthine Dehydrogenase). In *Methods of Enzymatic Analysis*, p. 644-649.
- 36) Giler S. H., Sperling O., Brosh S., Urca I., and de Vries A. (1975). Serum xanthine oxidase in jaundice. *Clinica Chimica Acta*, 63 (1), pp.37- 40.
- 37) Goudable Joëlle, Favier Alain. (1996). Radicaux libres oxygénés et antioxydants (Dr J. Goudable, laboratoire de biochimie C, Hopital Edouard-Herriot, 69437 Lyon cedex 03. ---- *Nutr Clin Mdtabol* 1997; 11:115-20.
- 38) H.A.Carlson. *Curr. Op. Chem. Biol. S*, 6, 447-452, (2002).
- 39) Haleng J (1), Pincemail J (2), Defraigne J.O (3), Charlier C (4), Chapelle J.P (5). (2007). Le stress oxydant.
- 40) Harrison R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology and Medicine*. 33, 774-797.
- 41) Hartmann, T. (2008). The lost origin of chemical ecology in the late 19th century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 4541-4546.
- 42) Hille, R., Massey, V. (1981) Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 256: 9090–9095
- 43) https://blog.granions.fr/stress-oxydatif-causes-symptomes-traitements/?fbclid=IwAR02Jpcv0YOkHiIt5vlb-_k_pvPYkG71oWs1dWlbjO-WP9riuJlzUgB_7WM
- 44) <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2023.03.016>.
- 45) <https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mmf/2022/Etude%20phytochimique%20et%20biologique%20d%E2%80%99une%20plante%20m%C3%A9dicinale%20Salvia%20officinalis%20L.pdf>
- 46) https://fsnv.univ-bba.dz/wp-content/uploads/2020/04/Cours_Phytochimie_Boumerfeg_S..pdf
- 47) https://theses.hal.science/tel-00006170/document?fbclid=IwAR3N1rFErZWrkUB3ZG1r_NYMsIbfHk3ye67pDwAc5rLX796Pk69ZehpOXBQ
- 48) <https://theses.hal.science/tel-00006170/documentSabrina> KRIEF Le 5 septembre 2003
- 49) <https://www.aquaportail.com/definition-5295-tanin.html>
- 50) <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/5/648>
- 51) https://www.plantes-botanique.org/famille_brassicaceae?fbclid=IwAR1Yn4Uh3kI BCMwWwf-BUGUNm6Vdv0Df4hw3Qe2kH3IZY749IN5ZAHeBQa4
- 52) <https://www.quelleestcetteplante.fr/genres.php?genre=Diploptaxis>
- 53) <https://www.thesill.com/blog/plant-toxicity>
- 54) <https://www.toutelanutrition.com/wikifit/guide-bien-etre/vitamines-mineraux/les-antioxydants>
- 55) Ichida K, Amaya Y, Noda K, Minoshima S, Hosoya T, Sakai O, Shimizu N and Nishino T (1993). Cloning of the cDNA encoding human xanthine

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIE

- dehydrogenase 82 (oxidase) : structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene* 133, 279-284.
- 56) J. Haleng, J. Pincemail, J.-O. Defraigne, C. Charlier, et J.-P. Chapelle, « Le stress oxydant », *Rev. Médicale Liège*, vol. 62, no 10, oct. 2007.
- 57) Jahangir M, Abdel-Farid IB, Kim HK, Choi YH & Verpoorte R. 2009. Healthy and unhealthy plants: The effect of stress on the metabolism of Brassicaceae. *Environ. Exp. Bot* 67: 23-33.
- 58) Jarasch E-D., Christine G., Hans W., HeidT., Thomas W., Keenant and Werner W. F. (1981). Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Article*, 25, pp. 67- 82.
- 59) K. L. Retsky, K. Chen, J. Zeind, et B. Frei, « Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2- oxo-histidine formation », *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 26, no 1-2, p. 90-98, janv. 1999.
- 60) Komal, B., Sandeep, B., Pranay, S and Ashishk. (2013). Lead optimization of isocytosine derived xanthine oxidase inhibitor. *Bioorganic and medicinal chemistry letters* 23:834-838.
- 61) Krenitsky TA., Spector T and Hall WW (1986). Xanthine oxidase from human liver: purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247, 108-119.
- 62) Kusano T., Ehirchiou D., Matsumura T., Chobaz V., Nasi S., Castelblanco M., So A., Lavanchy C., Acha-Orbea H., Nishino T., Okamoto K., and Busso N. (2019). Targeted knock-in mice expressing the oxidase-fixed form of xanthine oxidoreductase favor tumor growth. *Nature Communications*, 10 (1),14 p.
- 63) Laboratoire de pharmacognosie Dr Sahraoui, https://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/pharm3an_pharmacognosie19-tanins.pdf
- 64) Lavoisier, 3ème édition, Paris, 1120p
- 65) Le floch É, Boulos L & Véla E. 2010. Catalogue synonymique commenté de la flore de Tunisie, Tunis, Ministère de l'Environnement et du Développement durable: 143.
- 66) M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, et M. Mazur, « Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer », *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, no 1, p. 1-40, mars 2006.
- 67) Manaman Mc JL, Shellman, V. (1996). Purification of rat livers xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by affinity chromatography on benzamidine-sepharose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332 (1): 135-141

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIE

- 68) Martelin, E. (2004). Regulation of the human xanthine oxidoreductase gene. Halinski University Biomedical Dissertation, Finland, 42.
- 69) Massey V, Schopfer LM, Nishino T, and Nishino, T. (1989) Differences in protein structure of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase revealed by reconstitution with active site probe study. *Journal of Biological Chemistry*. 264, 10567-10573
- 70) Moriwaki Y., Yamamoto T., and Yamakita J.I. (1998). Comparative localization of aldehyde oxidase and xanthine oxidoreductase activity in rat tissues. *Histochemical Journal*, 30, 69 - 74.
- 71) Nada Bahloul. (2016). Aqueous Extracts from Tunisian *Diplotaxis*: Phenol Content, Antioxidant and Anti-Acetylcholinesterase Activities, and Impact of Exposure to Simulated Gastrointestinal Fluids; Ehab A. Abourashed; p7
- 72) Naglah, A.M.; Ahmed, A.F.; Wen, Z.H.; Al-Omar, M.A.; Amr Ael, G.; Kalmouch, A. New inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 inhibitors, nalidixic acid linked to isatin Schiff bases via certain L-amino acid bridges. *Molecules* 2016, 21, 498.
- 73) oxicity.pdf
- 74) Pacher P, Nivorozhkin A and Szabó C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews*. 58, 87-114.
- 75) Plantes et botanique : Genre des *Diplotaxis* (plantes-botanique.org)
- 76) Pr-LABBANI-Métabolisme Secondaire.pdf
- 77) Research_Article_Cytogenetic_study_and_p (4).pdf
- 78) Rundles, R. W., Wyngaarden, J. B., Hitchings, G. H. And Elion, G. B. (1969). *Drugs And Uric Acid*. *Annu. Rel. Pharmacol.* 9: 345-362.
- 79) S. Kaiser, P. Di Mascio, M. E. Murphy, et H. Sies, « Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 277, no 1, p. 101-108, févr. 1990.
- 80) S.L. da Silva et al. 2004)
- 81) Schardinger F (1902). Über das Verhalten der Kuhmilch gegen Methylenblau und seine Verwendung zur Unterscheidung von ungekochter und gekochter Milch. *Untersuch Nahrungsgenussmittel*. 5:1113–1121
- 82) stress oxydant.pdf.
- 83) stress_oxydant_rmlg_2007.pdf.
- 84) Tabuti J.R.S., Lye K.A., Dhillon S.S. (2003) Traditional herbal drugs of Bulamogi Uganda : plants, use and administration, *Journal of Ethnopharmacology*, 88: 19-44.
- 85) Tackholm V. 1974. *Students Flora of Egypt 2nd Edition*. The Cooperative Printing Company, Cairo, Egypt; 170-171.

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIE

- 86) Todd D. Engerson, T. Greg Mckelvey, Darryl B. Rhyne, Elizabeth B. Boggio, Stephanie J. Snyder, And Harold P. Jones, (1987), Conversion Of Xanthine Dehydrogenase To Oxidase In Ischemic Rat Tissues, *J. Clin. Invest.* Volume 79, June 1987, 1564-1570
- 87) toxicity.pdf
- 88) Xu H., Li C., Mozziconacci O., Zhu R., Xu Y., Tang Y., Chen R., Huang Y., Holzbeierlein J. M., Schöneich C., Huang J., and Li B. (2019). Xanthine oxidase-mediated oxidative stress promotes cancer cell-specific apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 139, pp.70-79.
- 89) Xu P, Huecksteadt T, Hoidal JR (1996). Molecularcloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH) *Genomics*. 34:173–180.
- 90) Yezza, S., Bouchama, S., 2014. Index des métabolites secondaires végétaux. Mémoire de Licence. Université Kasdi Merbah Ouargla. Ouargla, Algérie. p. 47.
- 91) Yu, T.-F. And Cutman, A. B. (1964} Effect Of Allopurinol (4-Hydroxyl~Yrazolo[3,4-D]Pyrimidine) On Serum And Urinary Uric Acid In Primary And Secondary Gout. *Am. J. Med.* 37: 885-898.

Nom : Saidi Douaa Elferdous

Date de Soutenance : 18/06/2023

Nom : Boulcherab Inès

Nom : Zaiter Rachik

Année Universitaire : 2022 / 2023

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention de diplôme de Master en Biochimie Appliquée

**Thème : Étude Phytochimique et évaluation de l'activité anti-oxydante d'une plante médicinale
(*Diplotaxis harra*).**

Résumé

Le présent travail de recherche a porté sur le screening phytochimique des métabolites secondaires des extraits de la plante *Diplotaxis harra* et l'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* ; avec un test enzymatique ; inhibition de l'enzyme xanthine oxydoréductase (XOR) et un test non enzymatique ; effet scavenger du radical hydroxyle (OH•).

Le screening phytochimique des extraits (méthanolique, éther de pétrole, hexane, dichlorométhane) des parties aériennes : feuilles, fleurs, tiges, de la plante, a mis en évidence une richesse en tanins, coumarines et alcaloïdes.

L'activité inhibitrice de l'enzyme xanthine oxydoréductase (enzyme génératrice des espèces réactives de l'oxygène) a montré que les extraits méthanoliques des différentes parties de la plante étudiées (MeOH Fe, MeOH Fl et MeOH Ti) possèdent un pouvoir inhibiteur important contre l'enzyme XOR. De plus, le deuxième test de piégeage du radical hydroxyle (OH•) a révélé que l'extrait MeOH de feuilles possède la plus forte capacité inhibitrice du radical hydroxyle.

En conclusion, nos travaux de recherche ont permis de montrer que les extraits MeOH des tiges et des fleurs de la plante *Diplotaxis harra* ont un intérêt thérapeutique important comme agents antioxydants.

Mots clés : *Diplotaxis harra*, screening phytochimique, métabolite secondaire, activité anti-oxydante, xanthine oxydoréductase (XOR), radical hydroxyle (OH•).

Membre du jury :

Président du jury : Pr.BENSEGUENI A.

(Professeur- Université Constantine 1).

Examineur : Dr.GUENDOUZE A.

(MCB – Université Constantine 1).

Encadreur : Dr.MOSBAH A.

(MCA – Université Constantine 1).

