



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

# **UNIVERSITE DE LORRAINE**

## **2019**

---

### **FACULTE DE PHARMACIE**

## **T H E S E**

Présentée et soutenue publiquement

Le Vendredi 08 Février 2019, sur un sujet dédié à :

**Propriétés biologiques des flavonoïdes : étude bibliographique et évaluation de l'activité antioxydante**

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par Elise EMERAUX

née le 21/07/1994

### **Membres du Jury**

Président :	Madame LAURAIN-MATTAR Dominique	Professeur des Universités
Juges :	Monsieur LAGRANGE Michel	Pharmacien d'Officine
	Madame SPINA Rosella	Enseignant-chercheur
	Madame CHEBIL Latifa	Enseignant-chercheur

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2018-2019**

***DOYEN***

Raphaël DUVAL

***Vice-Doyen***

Julien PERRIN

***Directrice des études***

Marie SOCHA

***Conseil de la Pédagogie***

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

***Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier***

Présidente, Béatrice DEMORE

***Commission Prospective Facultaire***

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

***Commission de la Recherche***

Présidente, Caroline GAUCHER

***Chargés de Mission***

***Communication***

Marie-Paule SAUDER

***Innovation pédagogique***

Alexandrine LAMBERT

***Référente ADE***

Virginie PICHON

***Référent dotation sur projet (DSP)***

Dominique DECOLIN

***Responsabilités***

***Filière Officine***

Caroline PERRIN-SARRADO

***Filière Industrie***

Julien GRAVOULET

***Filière Hôpital***

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

***Pharma Plus ENSIC***

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

***Pharma Plus ENSAIA***

Xavier BELLANGER

***Pharma Plus ENSGSI***

Igor CLAROT

***Cellule de Formation Continue et Individuelle***

Luc FERRARI

***Commission d'agrément des maîtres de stage***

François DUPUIS

***ERASMUS***

Mihayl VARBANOV

***DOYENS HONORAIRES***

***PROFESSEURS EMERITES***

Chantal FINANCE

Jeffrey ATKINSON

Francine PAULUS

Max HENRY

Claude VIGNERON

Claude VIGNERON

***PROFESSEURS HONORAIRES***

***MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES***

Jean-Claude BLOCK

Monique ALBERT

Pierre DIXNEUF

Mariette BEAUD

Chantal FINANCE

François BONNEAUX

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérald CATAU

Thérèse GIRARD

Jean-Claude CHEVIN

Michel JACQUE

Jocelyne COLLOMB

Pierre LABRUDE  
Vincent LOPPINET  
Alain NICOLAS  
Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD

#### **ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

Bernard DANGIEN  
Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZELIN  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Blandine MOREAU  
Dominique NOTTER  
Francine PAULUS  
Christine PERDICAKIS  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Gabriel TROCKLE  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU  
Colette ZINUTTI

#### **ENSEIGNANTS**

*Section CNU Discipline d'enseignement*

#### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROVICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

#### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Hématologie, Biologie cellulaire</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

#### **MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Alexandre HARLE	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Loïc REPPEL	82	<i>Biothérapie</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>

#### **MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine CAPIZZI BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>

Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAZ	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Reine EL OMAR	86	<i>Physiologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>

#### **ENSEIGNANTS (suite)**

*SectionCNU\** *Discipline d'enseignement*

Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86/01	<i>Droit en Santé</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Arnaud PALLOTTA	86	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Marianne PARENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Guillaume SAUTREY	85	<i>Chimie analytique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Sabrina TOUCHET	86	<i>Pharmacochimie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>

#### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Julien GRAVOULET	86	<i>Pharmacie clinique</i>
------------------	----	---------------------------

#### **PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>
--------------------	----	----------------

*\*Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAires



**je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'** exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**D'**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDERES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

## Remerciements

### Aux membres du jury,

À Madame Dominique Laurain-Mattar, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse d'exercice ainsi que d'avoir supervisé mon travail.

À Madame Latifa Chebil, pour m'avoir accompagnée dans l'élaboration de cette thèse ainsi que pour son soutien durant ma présence au sein des laboratoires de l'ENSAIA.

À Madame Rosella Spina, pour avoir accepté de faire partie des membres du jury.

À Monsieur Michel Lagrange, ami et futur confrère, qui m'a fait l'immense joie de faire partie des membres de ce jury.

### À Monsieur Mohammed Ghoul,

Pour son accueil au sein des laboratoires du LRGP à l'ENSAIA.

### À mes parents,

Pour m'avoir donné les moyens de réussir. Je ne cesserai de les remercier pour leur soutien infaillible face à tous les obstacles surmontés depuis le début de mes études.

### À mes frères Benoît et Christophe,

Qui ont su me montrer l'exemple en tant que grands frères.

### À toute ma famille,

Pour leurs encouragements perpétuels tout au long de ces années d'études.

### À Laurent,

Un grand MERCI pour toutes ces heures passées, du lycée à la PACES et jusqu'à l'ENSIC, pour m'avoir toujours aidée en mathématiques, et son inconditionnel soutien face à toutes les épreuves traversées durant ma vie d'étudiante.

### À Alexia,

Mon binôme de TP durant les 2 années passées ensemble à Nancy. Merci pour ton soutien infaillible et tes bons conseils lors de mes périodes de doute.

### À Dorian, Elodie, Emie, Jules, Mathilde, Mégane, Pierre, Thibault, Thomas, Victor

Merci pour tous ces bons moments passés avec vous, qu'ils soient encore nombreux même si les chemins empruntés sont différents !

# Table des matières

Liste des abréviations .....	3
Liste des tableaux .....	5
Liste des figures .....	6
Liste des équations .....	8
1. Introduction générale .....	9
2. Étude bibliographique .....	11
2.1. Structure des flavonoïdes .....	11
2.1.1. Groupe des flavonols .....	12
2.1.2. Groupe des flavanones .....	13
2.1.3. Groupe des flavanols (flavan-3-ols) .....	14
2.1.4. Groupe des flavones .....	15
2.1.5. Groupe des isoflavonoïdes .....	16
2.1.6. Groupe des anthocyanidines .....	17
2.2. Biosynthèse des flavonoïdes .....	18
2.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques .....	20
2.3.1. Solubilité des flavonoïdes .....	20
2.3.2. Absorption dans l'UV-visible .....	22
2.3.3. Stabilité des flavonoïdes .....	24
2.3.4. Inhibition d'enzymes .....	25
2.3.5. Chélation d'ions métalliques .....	25
2.4. Sources alimentaires et consommation des flavonoïdes .....	27
2.4.1. Sources alimentaires .....	27
2.4.2. Consommation .....	29
2.5. Rôle des flavonoïdes chez les végétaux .....	31
2.5.1. Protection contre les rayonnements UV .....	31
2.5.2. Propriétés antimicrobiennes .....	31
2.5.3. Rôle dans la reproduction des plantes et la fertilité .....	32
2.5.4. Rôle dans les interactions légumineuses-rhizobiums durant la nodulation .....	32
2.5.5. Rôle dans le transport des auxines .....	34
2.5.6. Importance des flavonoïdes dans la protection et la croissance des graines .....	35
2.6. Rôle des flavonoïdes chez l'homme .....	36
2.6.1. Introduction .....	36
2.6.2. Lutte contre le stress oxydant .....	36
2.6.3. Propriété anti-tumorale .....	38
2.6.4. Effet protecteur vasculaire .....	39
2.6.5. Activité anti-inflammatoire .....	40
2.6.6. Propriétés antibactériennes et antivirales .....	41
2.6.7. Effet des flavonoïdes sur la mémoire et la cognition .....	41
2.6.8. Les flavonoïdes dans la prévention de l'ostéoporose chez la femme ménopausée .....	42
2.6.9. Intérêt des flavonoïdes dans la goutte chronique .....	43
3. Étude expérimentale .....	45
3.1. Matériels et méthodes .....	45
3.1.1. Matériels .....	45
3.1.2. Méthodes .....	47
3.2. Résultats .....	56
3.3. Discussion .....	57

<b>4. Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>60</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>62</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>67</b>
Annexe 1 : Résultats obtenus pour la Naringénine par la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la XO .....	67
Annexe 2 : Résultats obtenus pour la Naringine par la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la XO .....	69
Annexe 3 : Résultats obtenus pour la Taxifoline par la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la XO .....	71
Annexe 4 : Résultats obtenus pour la Rutine par la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la XO .....	73

## Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

Abs : Absorbance

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

ANS : Anthocyanidine Synthase

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BA : Baicaline

CE50 : Concentration Efficace Médiane

CHI : Chalcone Isomérase

CHS : Chalcone Synthase

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

COX : Cyclo-oxygénase

DFR : DihydroFlavonol Réductase

DFT : Théorie de la fonctionnelle de la densité (acronyme pour Density Functional Theory)

DMO : Densité Minérale Osseuse

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyle

DPPHH : 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazine

e<sup>-</sup> : Electron

EPF : Phyto-oestrogènes dérivés de l'*Epimedium brevicornum maxim*

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène

F3H : Flavanone-3-Hydroxylase

FLS : Flavonol Synthase

FNR : Flavanone réductase

FS : Flavone Synthase

GLC : Glucose

GT : Glucosyl Transférase

H : Hydrogène

HAT : Hydrogen Atom Transfer

IC50 : Concentration Inhibitrice Médiane

IFS : Isoflavone Synthase

LDL : Low Density Lipoprotein (en français : Lipoprotéine de basse densité)

LOX : Lipoxygénase

NHDC : Néohespéridine dihydrochalcone

PA : Proanthocyanidines

PGHS : Prostaglandine Endoperoxyde Hydrogène Synthase

PLA2 : Phospholipase A2

PNN : Polynucléaire neutrophile

PP : Persulfate de potassium

R<sup>·</sup> : Radical libre

RHA : Rhamnose

RLO : Radicaux Libres dérivés de l'Oxygène

RSA : Radical Scavenger Activity

SD : Standard Deviation (en français : écart-type)

SET : Single Electron Transfer

TEAC : Trolox Equivalent Antioxydant Activity

Trolox : 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid purum

TT4 : Transparent Testa 4

WT : Wild Type (en français : Type Sauvage)

XO : Xanthine Oxydase

## Liste des tableaux

Tableau I - Quelques exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavonols ..	12
Tableau II - Quelques exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavanones ..	13
Tableau III - Molécules appartenant à la sous-classe des flavanols ..	14
Tableau IV - Exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavones ..	15
Tableau V - Molécules appartenant à la sous-classe des isoflavonoïdes ..	16
Tableau VI - Exemples de molécules appartenant à la sous-classe des anthocyanidines ....	17
Tableau VII - Exemples d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes ..	19
Tableau VIII - Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol ..	23
Tableau IX - Quelques sources naturelles de flavonoïdes (18,47) ..	27
Tableau X - Réactifs utilisés dans les différentes méthodes de la mesure de l'activité anti-oxydante des flavonoïdes ..	45
Tableau XI - Mesure de l'activité anti-oxydante de 2 groupes de flavonoïdes par la mesure ABTS, DPPH et l'inhibition de la xanthine oxydase en calculant leur IC50 ..	56
Tableau XII - Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la Naringénine ..	68
Tableau XIII - Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la Naringine ..	70
Tableau XIV - Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la Taxifoline ..	72
Tableau XV - Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la Rutine ..	74

## Liste des figures

Figure 1 - Squelette de base commun aux flavonoïdes (16).....	11
Figure 2 – Structure chimique des flavonols (17).....	12
Figure 3 - Structure chimique des flavanones (20) .....	13
Figure 4 - Structure chimique des flavanols (20).....	14
Figure 5 – Structure chimique des flavones (20).....	15
Figure 6 – Structure chimique des isoflavonoïdes (20) .....	16
Figure 7 – Structure chimique des anthocyanidines (20) .....	17
Figure 8 - Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes (23) .....	18
Figure 9 - Schéma représentant le domaine d'absorption des flavonoïdes dans le domaine UV-visible (29) .....	22
Figure 10 - Sites de chélation des ions métalliques (M) des flavonoïdes (41) .....	26
Figure 11 - Schéma représentant les différentes enzymes et les différents gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes (60) .....	34
Figure 12 - Schéma représentant les éléments structuraux des flavonoïdes essentiels à leur capacité de piégeage des radicaux libres (72).....	38
Figure 13 - Mécanisme d'action suggéré des flavonoïdes sur le cycle de l'inflammation (86) .....	40
Figure 14 - Structure chimique du DPPH· .....	48
Figure 15 - Courbe modèle représentant la détermination graphique de l'IC50.....	55
Figure 16 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Naringénine (mg/L) par la méthode ABTS.....	67
Figure 17 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Naringénine (mg/L) par la méthode DPPH .....	67
Figure 18 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la XO en fonction de la concentration en Naringénine ( $\mu$ M) .....	68
Figure 19 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Naringine (mg/L) par la méthode ABTS .....	69
Figure 20 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Naringine (mg/L) par la méthode DPPH .....	69
Figure 21 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la XO en fonction de la concentration en Naringine ( $\mu$ M) .....	70
Figure 22 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Taxifoline ( $\mu$ M) par la méthode ABTS.....	71
Figure 23 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Taxifoline (mg/L) par la méthode DPPH .....	71

Figure 24 - Pourcentage d'inhibition de la XO en fonction de la concentration en Taxifoline ( $\mu$ M) .....	72
Figure 25 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Rutine (mg/L) par la méthode ABTS .....	73
Figure 26 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Rutine (mg/L) par la méthode DPPH .....	73
Figure 27 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la XO en fonction de la concentration en Rutine ( $\mu$ M) .....	74

## Liste des équations

Équation 1 - Réaction de Fenton.....	25
Équation 2 - Formule permettant de calculer le pourcentage d'inhibition de l'activité anti-radicalaire du DPPH .....	48
Équation 3 - Formule permettant de calculer le pourcentage d'inhibition de l'activité anti-radicalaire par le test ABTS .....	50
Équation 4 - Oxydoréduction de l'hypoxanthine en xanthine .....	52
Équation 5 - Oxydoréduction de la xanthine en acide urique .....	52
Équation 6 - Formule de l'activité enzymatique de la xanthine oxydase .....	54
Équation 7 - Formule du pourcentage d'inhibition de la xanthine oxydase (%).....	54

## 1. Introduction générale

Les flavonoïdes, également appelés composés polyphénoliques, sont largement répandus dans le règne végétal. Ces composés constituent des pigments colorés des plantes allant du jaune au rouge, conférant à ces organismes la multitude de couleurs qu'ils empruntent. Présents en quantités importantes dans les fruits, les légumes, mais aussi dans les boissons (vin rouge, thé, café, bière), on les trouve donc régulièrement à table lors de nos repas.

De plus, les flavonoïdes rentrent dans la composition de divers remèdes à base de plantes utilisés en médecine traditionnelle.

Néanmoins, leur production en faible quantité rend souvent difficile leur utilisation. La complexité des structures chimiques ne permet pas toujours de produire ces composés par la méthode de chimie classique, comme par exemple leur faible solubilité dans les milieux de formulation, leur instabilité thermique et à la lumière (1).

À ce jour, les flavonoïdes forment une vaste famille de plus de 9000 composés naturels (2).

Ils sont connus pour leur puissant pouvoir anti-oxydant *in vitro* mais également leurs nombreuses autres propriétés biologiques : vasculo-protectrice, anti-inflammatoire, antibactérienne, anti-tumorale etc.

Ainsi, les recherches sur les flavonoïdes n'ont cessé d'augmenter depuis la découverte du « French paradox ». Il s'agit de l'observation d'un faible taux de mortalité cardiovasculaire chez les populations méditerranéennes associée à une consommation de vin rouge et un apport élevé en graisses saturées (3).

De par leurs nombreuses propriétés, les flavonoïdes sont utilisés dans de nombreux domaines tels que :

- L'agroalimentaire en tant que colorant alimentaire, antioxydant etc ;
- La cosmétologie (protection du vieillissement de la peau, anti-UV) ;
- L'industrie pharmaceutique (veinotonique, anti-inflammatoire etc).

Dans un premier temps, l'objectif de cette thèse sera d'établir une synthèse bibliographique des connaissances actuelles des flavonoïdes au niveau de : leur structure, leur biosynthèse, leurs propriétés physico-chimiques et biologiques, les aliments dans lesquels on peut en trouver ainsi que leur rôle chez les végétaux et chez l'homme.

Dans un second temps, l'objectif sera de mesurer l'activité anti-oxydante de différents flavonoïdes et d'évaluer leur IC<sub>50</sub> (Concentration Inhibitrice médiane) à l'aide de trois méthodes différentes : la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la xanthine oxydase (XO). Cette dernière méthode présente un intérêt tout particulier. En effet, à la fin des années 1960, les scientifiques McCord et Fridovich se sont aperçus que la XO était impliquée dans la génération de radicaux libres (4). Dès lors, l'intérêt scientifique n'a cessé de croître pour cette oxydoréductase. Des scientifiques du monde entier ont découvert que cette molécule jouait un rôle principal dans différentes maladies telles que les infections virales (5), les problèmes vasculaires (6) mais plus particulièrement la goutte chronique, conséquence directe de l'hyperuricémie (7).

Pour traiter cette maladie, il existe un médicament très largement répandu : l'allopurinol qui appartient à la famille des purines (8,9). Cet hypo-uricémiant est un inhibiteur compétitif de la XO qui intervient dans le métabolisme de l'acide urique et fait diminuer l'uricémie. Cependant, son utilisation reste décriée car des études ont révélé que cet antigoutteux pouvait provoquer de graves réactions cutanées (10) (allergies, éruption cutanée comme le syndrome de Lyell, syndrome de Stevens-Johnson).

Pour cela, les scientifiques sont à la recherche d'alternatives à ce médicament. Une des pistes en voie de développement serait l'utilisation de flavonoïdes (11,12). En effet, certains d'entre eux ont une activité anti-oxydante suffisamment élevée capable d'inhiber l'enzyme XO.

Dans le contexte de ce manuscrit de thèse, nous avons mesuré le pouvoir anti-oxydant de 4 flavonoïdes appartenant à 2 sous-classes différentes en déterminant leur concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) par la méthode de l'inhibition de la XO. Les résultats obtenus ont été comparés à l'aide de deux autres méthodes d'inhibition de radicaux libres : le test 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyle (DPPH) et le test à l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS).

L'intérêt de ces manipulations est de renforcer les résultats d'études déjà existants à ce sujet et de comparer, pour les mêmes molécules testées, trois tests de dosage de l'activité anti-radicalaire. *In fine*, ces tests permettraient de sélectionner les flavonoïdes les plus intéressants au niveau applicatif.

## 2. Étude bibliographique

### 2.1. Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la grande famille des polyphénols. Ces derniers se subdivisent en 10 classes dont les flavonoïdes sont la classe la plus abondante. À eux seuls, ils représentent 60% des composés polyphénoliques (13–15).

Les flavonoïdes sont constitués d'un même élément structural de base formé par deux cycles benzéniques (cycles A et B), reliés par une chaîne linéaire à trois carbones qui forme un hétérocycle oxygéné (cycle C) (Figure 1).

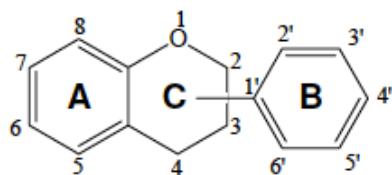


Figure 1 - Squelette de base commun aux flavonoïdes (16)

Les flavonoïdes sont divisés en six sous-classes principales. Les variations de structure au sein d'une même classe de composés se fait par rapport à leur structure moléculaire. Elle se fait en fonction de :

- La position de la liaison entre les cycles B et C ;
- Le degré de saturation du cycle C ;
- Le degré d'oxydation et d'hydroxylation de l'hétérocycle central C.

### 2.1.1. Groupe des flavonols

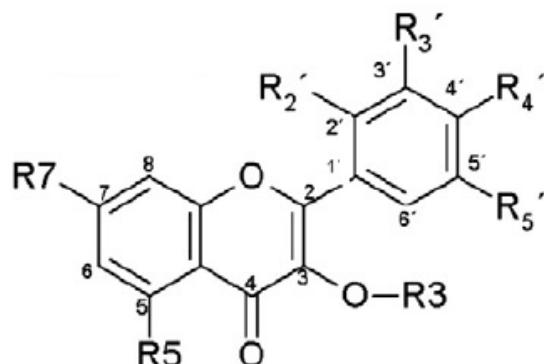


Figure 2 – Structure chimique des flavonols (17)

Les flavonols possèdent la même structure de base avec : un groupe hydroxyle en position 3 (sauf pour la rutine) et une double liaison C2-C3 au niveau du cycle C (Figure 2).

Les flavonols sont ubiquitaires dans les fruits et les légumes. La quercétine est le flavonoïde le plus répandu de cette sous-classe (18). On retrouve des flavonols à hauteur de 15,4 mg / 100 g d'oignon et 9,4 mg / 100 g de brocolis (19).

Tableau I - Quelques exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavonols

Flavonols	Substitution						
	3	5	7	2'	3'	4'	5'
<b>Kaempférol</b>	H	OH	OH	H	H	OH	H
<b>Quercétine</b>	H	OH	OH	H	OH	OH	H
<b>Myrcétine</b>	H	OH	OH	H	OH	OH	OH
<b>Rutine</b>	-Glc-Rha	OH	OH	H	OH	OH	H

(Avec Glc : Glucose ; Rha : Rhamnose)

### 2.1.2. Groupe des flavanones

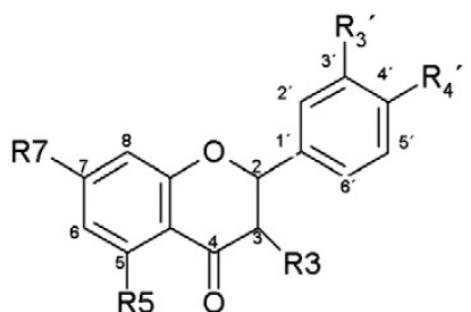


Figure 3 - Structure chimique des flavanones (20)

Au niveau de la famille des flavanones, la double liaison en C2-C3 du cycle C a disparu (Figure 3). On retrouve essentiellement les flavanones dans les agrumes tels que les pamplemousses, les citrons etc. Quant à l'hespéridine, on la retrouve également dans la menthe poivrée et le cumin (18).

Tableau II - Quelques exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavanones

Flavanones	Substitution				
	3	5	7	3'	4'
<b>Naringénine</b>	H	OH	OH	H	OH
<b>Naringine</b>	H	OH	O-Glc-Rha	H	OH
<b>Hespérétine</b>	H	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
<b>Hespéridine</b>	H	OH	O-Glc-Rha	OH	OCH <sub>3</sub>
<b>Taxifoline</b>	OH	OH	OH	OH	OH

### 2.1.3. Groupe des flavanols (flavan-3-ols)

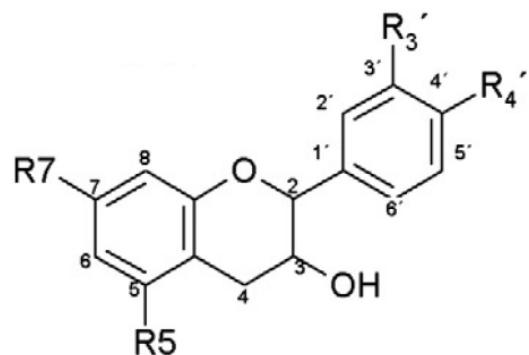


Figure 4 - Structure chimique des flavanols (20)

La classe des flavanols est également appelée flavan-3-ols. Cette sous-famille comprend les 4 formes de la catéchine. Cette molécule possède deux carbones asymétriques, les carbones C2 et C3, donnant lieu à 4 stéréo-isomères (R (-) ou S (+)) (Figure 4).

Dans le règne végétal, on trouvera plus fréquemment la catéchine (+) et l'épicatéchine (-). Les flavan-3-ols sont très présents dans le cacao (environ 132,4 mg/kg de matière fraîche dans le chocolat noir) mais aussi les thés verts et noirs (à hauteur de 132,1 mg de flavonoïdes pour 100 g de thé vert (19)).

Tableau III - Molécules appartenant à la sous-classe des flavanols

Flavanols	Substitution				
	5	7	3'	4'	Conformation
Épicatéchine (- ou +)	OH	OH	OH	OH	2R, 3R (-) ou 2S, 3S (+)
Catéchine (- ou +)	OH	OH	OH	OH	2S, 3R (-) ou 2R, 3S (+)

#### 2.1.4. Groupe des flavones

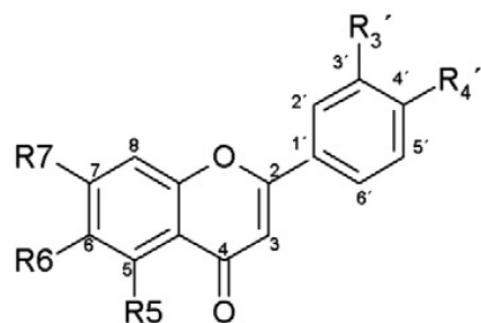


Figure 5 – Structure chimique des flavones (20)

Les flavones ont un squelette de base correspondant au 2-phénylchromén-4-one (Figure 5). Ils sont essentiellement présents dans les pigments jaunes des fleurs. Cette sous-classe est prédominante au niveau des céréales, les herbes aromatiques (jusqu'à 303,2 mg/100 g de persil (19)) et les légumes.

Tableau IV - Exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavones

Flavones	Substitution				
	5	6	7	3'	4'
<b>Flavone</b>	H	H	H	H	H
<b>Chrysine</b>	OH	H	OH	H	H
<b>Apigénine</b>	OH	H	OH	H	OH
<b>Lutéoline</b>	OH	H	OH	OH	OH
<b>Baicaléine</b>	OH	OH	OH	H	H
<b>Diosmine</b>	OH	H	O-Glc-Rha	OH	OCH <sub>3</sub>

## 2.1.5. Groupe des isoflavonoïdes

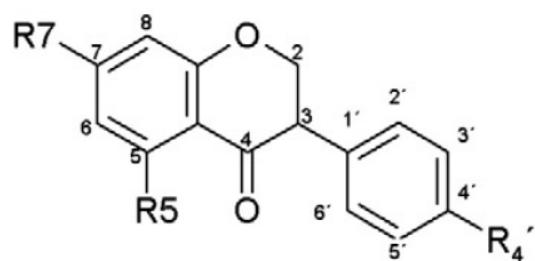


Figure 6 – Structure chimique des isoflavonoïdes (20)

Les isoflavonoïdes (Figure 6) sont exclusivement trouvés dans les légumes, plus particulièrement les graines de soja. On en retrouve par exemple à hauteur de 28,1 mg dans 100 g de tofu (19).

Tableau V - Molécules appartenant à la sous-classe des isoflavonoïdes

Isoflavonoïdes	Substitution		
	5	7	4'
Daidzéine	H	OH	OH
Génistéine	OH	OH	OH

### 2.1.6. Groupe des anthocyanidines

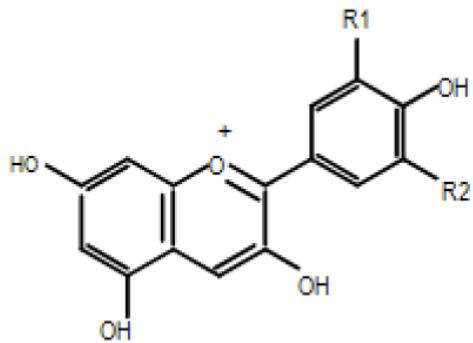


Figure 7 – Structure chimique des anthocyanidines (20)

Les anthocyanidines (Figure 7) sont responsables de la couleur des végétaux. Leur pigment varie du rouge au bleu en fonction du milieu (21) (rouge pour milieu acide, bleu-violet pour milieu alcalin voire neutre) ainsi que du degré d'hydroxylation. On les utilise comme colorants alimentaires.

Tableau VI - Exemples de molécules appartenant à la sous-classe des anthocyanidines

Anthocyanidines	Substitutions					
	3	5	7	3'	4'	5'
Cyanidine	OH	OH	OH	OH	OH	H
Malvidine	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Pétunidine	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OH

## 2.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Elucider la voie de biosynthèse des flavonoïdes d'un point de vue génétique représente un véritable défi pour les chercheurs du monde entier.

Pour comprendre ce mécanisme, les scientifiques ont essentiellement travaillé sur les espèces végétales suivantes : le maïs (*Zea mays*), le muflier (*Antirrhinum majus*) et le pétunia (*Petunia hybrida*). Ces plantes ont servi de modèles expérimentaux. Elles ont notamment été utilisées dans l'isolement de gènes structuraux et régulateurs impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont synthétisés par la voie des phénylpropanoïdes, transformant la phénylalanine en 4-coumaroyl-CoA (22).

Ce thioester est un élément clé dans la synthèse des flavonoïdes. Il va réagir avec 3 molécules de Malonyl-CoA (Figure 8). Cette réaction est catalysée par une enzyme spécifique, la chalcone synthase (CHS). La CHS induit une réaction enzymatique en chaîne (Tableau VII), produisant ainsi un grand nombre de flavonoïdes.

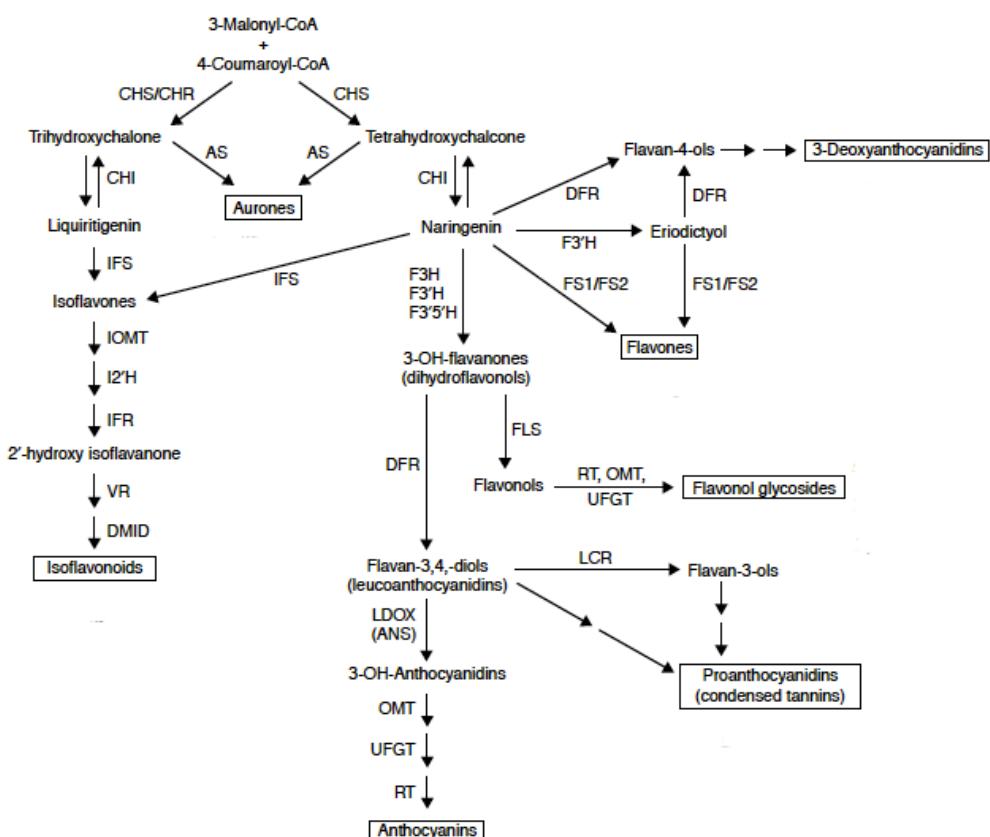


Figure 8 - Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes (23)

Tableau VII - Exemples d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes

<b>Enzymes</b>	<b>Intermédiaires synthétisés</b>
Chalcone synthase (CHS)	Chalcone
Chalcone Isomérase (CHI)	Flavanone
Flavone Synthase (FS)	Flavone
Flavone-3-Hydroxylase (F3H)	Dihydroflavonol
Flavonol Synthase (FLS)	Flavonol
Chaîne enzymatique (FNR, ANS, GT)	Dérivés anthocyaniques

## 2.3. Propriétés physico-chimiques et biologiques

### 2.3.1. Solubilité des flavonoïdes

L'utilisation des flavonoïdes en industrie pharmaceutique est malheureusement limitée par leur manque de solubilité en solution aqueuse, principalement due à la présence de groupes phénoliques.

Il est pratiquement impossible de prédire la solubilité d'un flavonoïde, sans l'avoir étudiée préalablement. La modélisation moléculaire est une méthode *in silico* qui est une étape préliminaire essentielle à la détermination de la solubilité d'une molécule, permettant un gain de temps considérable pour les scientifiques. L'équipe de Chebil (24) a réussi à prédire la solubilité de la quercétine en déterminant son énergie libre de solvatation ( $\Delta G_{\text{solv}}$  en kcal/mol) par modélisation moléculaire. Pour cela, ils ont testé la solubilité de ce flavonoïde en présence de différents solvants : l'eau, l'acetonitrile, l'acétone, l'alcool amylique tertiaire (2-méthyl-2-butanol) et le chloroforme. Les résultats ont montré que la quercétine est peu soluble dans l'eau, le chloroforme et l'acetonitrile. À l'inverse, cette molécule est très soluble dans l'acétone et l'alcool amylique tertiaire, deux composés amphiphiles (-28,99 et -28,88 kcal/mol respectivement). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus expérimentalement.

La détermination expérimentale de la solubilité des flavonoïdes implique de nombreux paramètres : le solvant utilisé, le composé et sa configuration, les conditions environnementales (température de la pièce, luminosité etc). Au sein d'un même sous-groupe, les composés présentent des structures très différentes, entraînant une capacité différente à se solubiliser. Par exemple, les hétérosides sont solubles dans l'eau et les solvants polaires (alcool, acétone). À l'inverse, les génines se solubilisent préférentiellement dans les solvants organiques peu polaires (éther éthylique, hexane) (25).

L'équipe de Benavente-Garcia *et al.* (26) a étudié la solubilité de la néohespéridine dihydrochalcone (NHDC) dans des mélanges eau/éthanol à différents volumes. Cette étude a montré qu'à un mélange eau/éthanol 75/25, la solubilité de la NHDC à 20 °C est de 8 g.L<sup>-1</sup> alors qu'elle est de 123 g.L<sup>-1</sup> pour un mélange 50/50. Cette solubilité se voit réduite lorsque l'on veut solubiliser ce composé dans de l'eau seule (0,4 g.L<sup>-1</sup>) ou bien de l'éthanol seul (12 g.L<sup>-1</sup>).

Par ailleurs, la capacité d'un composé à se solubiliser est également due au pH. Tommasini *et al.* ont montré qu'à pH 1,5, la solubilité de l'hespéridine et de la naringinine est respectivement de  $0,06 \cdot 10^{-3}$  et de  $0,025 \cdot 10^{-3}$  g.L<sup>-1</sup>. Leurs solubilités se voient augmenter d'un facteur 4 lorsque l'on augmente le pH à 8 (27).

Pour pallier à ce manque de solubilité des flavonoïdes, différentes stratégies ont été développées :

- L'acylation des groupements phénols 7-OH et 3'-OH de l'hespéridine (28). Cela a pour but de stabiliser la fonction du phénol et d'augmenter la solubilité du flavonoïde en milieu lipophile.
- La glycosylation de la naringine à l'aide de l'amylose maltogénique (bactérie *Bacillus Stearothermophilus*) et de maltotriose. Ce flavonoïde a vu sa solubilité augmenter de 250 fois dans l'eau (29).
- L'insertion d'une  $\beta$ -cyclodextrine dans l'hespérétine ou la naringinine. Tommasini *et al.* (27) se sont aperçus que plus on augmentait la concentration de  $\beta$ -cyclodextrine dans ces composés, plus la solubilité augmentait.

### 2.3.2. Absorption dans l'UV-visible

Les UV-visibles sont capables de pénétrer la couche d'ozone et potentiellement causer des dommages à la vie végétale.

Les flavonoïdes absorbent les UV visibles et sont capables d'agir comme des filtres anti-UV, protégeant ainsi les tissus photosynthétiques sous-jacents d'éventuels dommages (30).

Les spectres des flavonoïdes présentent deux bandes d'absorption dans l'UV-visible (Figure 9) :

- La bande I, située entre 290 et 385 nm, représentative de l'absorption du cycle B (chromophore cinnamoyle) ;
- La bande II, située entre 240 et 285 nm, représentative de l'absorption du cycle A (chromophore benzoyle).

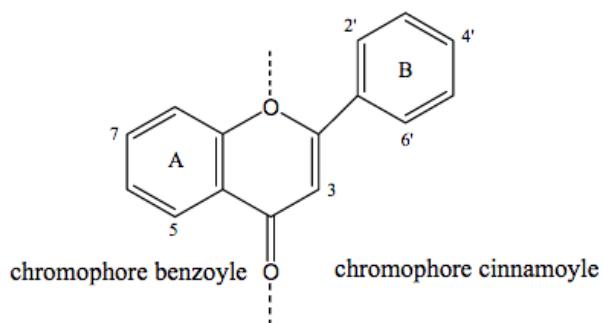


Figure 9 - Schéma représentant le domaine d'absorption des flavonoïdes dans le domaine UV-visible (29)

Les bandes d'absorption des flavonoïdes peuvent se déplacer par l'influence de différents facteurs : la nature et la position de la substitution (hydroxylation, méthoxylation, acylation), le pH, le solvant, les interactions intramoléculaires « fortes » comme les liaisons  $\pi$  ou bien les interactions intermoléculaires « faibles » comme les liaisons hydrogènes.

Une substitution telle qu'une méthoxylation (ajout d'un groupe méthoxy O-CH<sub>3</sub>) ou l'acylation (ajout d'un groupe acyle RCO-) affecte la position d'absorption des bandes qui auront tendance à se déplacer vers les plus courtes longueurs d'onde : c'est l'effet hypsochrome.

A l'inverse, une augmentation du degré d'hydroxylation entraîne un effet bathochrome (déplacement de la position de la bande spectrale vers les plus grandes longueurs d'onde). C'est le cas de la bande I des flavonols qui est plus haute de 30 nm que celle de la flavone

équivalente car cette dernière ne possède pas d'hydroxylation en position 4 (31) (Tableau VIII).

Tableau VIII - Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol

Classe des flavonoïdes	Absorption UV-visible	
	Bande II (nm)	Bande I (nm)
<b>Flavone</b>	250-280	310-350
<b>Flavonol</b>	250-280	330-385
<b>Flavanone</b>	275-295	300-330
<b>Anthocyane</b>	270-280	465-560
<b>Isoflavone</b>	245-275	310-330
<b>Flavanol</b>	270-280	-

### 2.3.3. Stabilité des flavonoïdes

La stabilité des flavonoïdes est influencée par différents paramètres tels la lumière (32,33), le pH (34), la température (35) ou bien encore la présence d'enzymes (36).

- *Effet de la lumière*

Concernant l'étude de la stabilité de certains flavonoïdes à la lumière, Smith *et al.* (32) ont rapporté que les flavones ont une plus grande photostabilité que les flavonols. Les flavonols possèdent un groupe hydroxyle libre (-OH) en position 3 contrairement aux flavones qui n'en ont pas. L'absence de ce groupe chez les flavones leur confère ainsi une plus grande stabilité en présence de lumière.

- *Effet du pH*

Dans leur étude, Ungar *et al.* se sont intéressés à la stabilité thermodynamique de deux flavonoïdes : la génistéine et la daidzéine (35). Pour ce faire, ils ont étudié la cinétique de dégradation de ces deux composés à haute température. La génistéine et la daidzéine ont été étudiées dans 2 milieux, l'un à pH 7 et l'autre à pH 9, à différentes températures (70°, 80° et 90°C). La dégradation de ces flavonoïdes a été suivie par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

Les résultats ont montré qu'à haute température, la génistéine et la daidzéine se dégradaient plus vite dans le milieu alcalin à pH 9. La stabilité de ces composés est plus faible à pH basique en raison d'une augmentation de leur oxydation due à une déprotonation (diminution du potentiel d'oxydation).

- *Effet de la configuration et du nombre de substituants*

La configuration des flavonoïdes et la nature du substituant influencent grandement leur stabilité en solution.

Selon Friedman *et al.* (37), la stabilité de certains acides aromatiques tels que l'acide trans-cinnamique, l'acide férulique, est plus importante que les composés phénoliques grâce à la stabilisation par résonnance des intermédiaires de type phenoxy et quinoïque. Il semblerait que les groupes -OH situés sur l'anneau benzénique sont responsables de la non stabilité des composés phénoliques à pH élevés. Ainsi, les acides aromatiques ont une plus grande stabilité à pH élevé.

#### 2.3.4. Inhibition d'enzymes

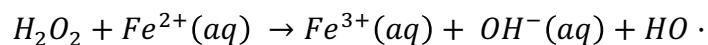
Les flavonoïdes sont capables d'inhiber les enzymes tels que la xanthine oxidase (39) ou encore la protéine kinase (39) qui sont responsables de la production d'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>·</sup>. Il a également été démontré que les flavonoïdes sont capables d'inhiber des composés impliqués dans la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme : la cyclo-oxygénase, la lipoxygénase, la monooxygénase microsomale, la glutathion S-transférase, la succinoxidase mitochondriale et enfin la NADH oxydase (40).

Les flavonoïdes permettent donc de réguler la production d'ERO au sein de l'organisme.

#### 2.3.5. Chélation d'ions métalliques

Certains oligo-éléments tels que le fer, le cuivre, sont indispensables à la vie. Présent en petite quantité dans l'organisme, le fer joue un rôle indispensable dans le métabolisme : transport extra et intra-cellulaire, stockage, ses fonctions sont nombreuses.

Lorsque le fer et le cuivre sont à l'état libre, sous forme Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup>, ils se révèlent dangereux. En effet, ils sont alors capables de donner un électron au profit de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La liaison Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou Cu<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> génère des radicaux hydroxyles HO<sup>·</sup> réactifs et néfastes pour les cellules en oxydant les lipides, les protéines, les sucres et l'ADN. Cette réaction d'oxydation est plus communément appelée la réaction de Fenton (Équation 1)



Équation 1 - Réaction de Fenton

Certains flavonoïdes sont capables de chélater les ions métalliques en formant des complexes flavonoïdes-métaux. Les flavonoïdes piégent les métaux grâce aux doublets non-liants de leurs atomes d'oxygène, plus précisément au niveau de trois sites de chélation (Figure 10) :

- Entre le groupe 5- hydroxy et le groupe 4-carbonyle ;
- Entre le groupe 3- hydroxy et le groupe 4-carbonyle ;
- Entre le groupe 3'-4'-hydroxy du cycle B (groupe catéchol).

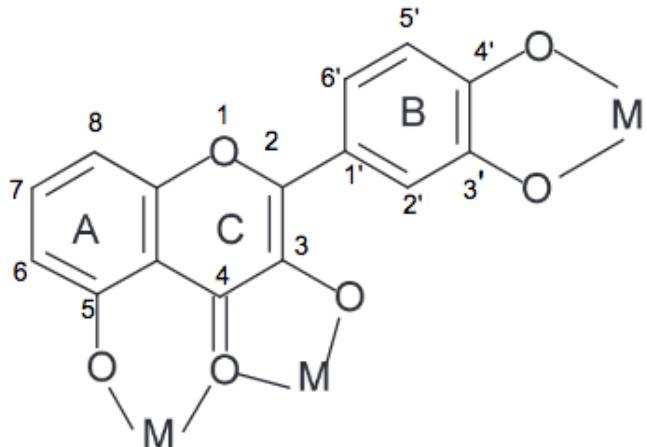


Figure 10 - Sites de chélation des ions métalliques (*M*) des flavonoïdes (41)

Une fois piégés, les ions métalliques sont inactivés et sont incapables de réagir avec les espèces environnantes. De nombreuses études (42–45) ont révélé que les flavonoïdes n'ont pas tous la même capacité à piéger ces ions métalliques.

L'équipe de Ren (42) a étudié le mécanisme de complexation de plusieurs flavonoïdes avec le fer en utilisant des calculs quantiques basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). Ils ont déterminé les sites de chélation les plus probables en observant les énergies de liaison des sites les plus élevés. Leurs résultats ont montré que les sites de chélation les plus probables (par ordre décroissant) sont :

- 1) Le groupe 3-hydroxy-4-carbonyl ;
- 2) Le groupe 5-hydroxy-4-carbonyl ;
- 3) Le groupe catéchol.

A contrario, l'étude *in vitro* de Mladenka *et al.* (17) concernant l'activité chélatante des flavonoïdes sur le fer a montré que les groupes 3-hydroxy-4-carbonyl et catéchol sont largement plus efficaces que le groupe 5-hydroxy-4-carbonyl.

Les résultats divergents entre ces deux études sont dus à la différence de méthode utilisée.

## 2.4. Sources alimentaires et consommation des flavonoïdes

### 2.4.1. Sources alimentaires

Les flavonoïdes constituent une part importante de notre alimentation. On les retrouve dans les fruits mais aussi dans les légumes. Dans les agrumes, les flavonoïdes peuvent représenter jusqu'à 1% de teneur en fruit frais.

Les boissons telles que le thé, le café et la bière contiennent également de grandes quantités de flavonoïdes. On en retrouve dans les herbes fraîches, les épices, le miel (46) mais aussi dans les plantes médicinales.

Les flavonoïdes représentent une famille de plus de 9000 composés naturels, différenciés en une trentaine de sous-groupes. Cinq de ces 30 sous-groupes sont les plus largement répandus au sein de notre alimentation (18). Le tableau IX représente les produits alimentaires les plus communs que l'on peut retrouver dans chaque sous-groupe de flavonoïdes.

Tableau IX - Quelques sources naturelles de flavonoïdes (18,47)

Sous-classes	Flavonoïdes	Source : produits alimentaires
Flavanol	Epicatéchine Catéchine Gallate d'épigallocatéchine	<i>Thé vert, noir</i> <i>Vin rouge</i>
Flavanone	Naringine	<i>Zestes d'agrumes</i>
	Taxifoline	<i>Agrumes</i>
Flavonol	Kaempférol	<i>Endive, poireau, brocoli, radis, pamplemousse, thé noir</i>
	Quercétine	<i>Oignon, laitue, brocoli, canneberge, peau de pommes, olives, thé, vin rouge</i>
	Myricétine	<i>Canneberge, raisin, vin rouge</i>
Flavone	Hydroxyflavones (Apigénine, lutéoline, neodiosmine) Methoxyflavones (Tangérétine, nobilétine)	<i>Céleri, persil</i>
Anthocyanes	Cyanidine	<i>Cerise, framboise, fraise, raisin</i>
	Apigénidine	<i>Coloration des fruits</i>

Dans ce contexte, l'équipe de Merken et Beecher (46) a effectué une revue concernant la quantité de flavonoïdes présente dans divers aliments à l'aide d'une technique de séparation analytique : la CLHP. Les études utilisant cette méthode pour séparer des aliments les différents sous-groupes de flavonoïdes ont révélé que :

- 6 composés appartenant aux anthocyanes sont majoritairement retrouvés dans les fruits rouges, les baies et le raisin. Le composé que l'on retrouve dans chacun d'entre eux est la cyanidine.
- La catéchine, appartenant au sous-groupe des flavanols, est surtout retrouvée au niveau du thé. Les concentrations de catéchine sont plus élevées dans le thé vert que dans le thé noir.
- Au niveau des herbes aromatiques, on retrouve essentiellement des composés appartenant aux flavones. L'apigénine est présente en quantité élevée dans le persil alors que c'est la lutéoline qui est abondante dans le thym.
- Concernant les agrumes, on retrouve surtout des flavanones (1).
- Les flavonoïdes de bas poids moléculaire sont responsables de l'amertume et de l'acidité des fruits. *A contrario*, les flavonoïdes de haut poids moléculaire sont responsables de l'astringence. C'est par exemple le cas lorsqu'un individu boit un vin rouge chargé en tanins qui provoque une crispation des muqueuses.

Cette revue scientifique montre donc que la distribution des flavonoïdes, aussi nombreux soient-ils, varie en fonction de l'espèce végétale, fruit ou légume.

#### 2.4.2. Consommation

La consommation moyenne de flavonoïdes, calculée par Kuhnau *et al* en 1976 (48), est définie à 1 g/jour (160 mg de flavanols, flavones et flavanones ; 170 mg d'anthocyanes ; 200 mg de catéchine et 450 mg de biflavones). Cependant, ces chiffres varient grandement en fonction du pays étudié. En prenant l'exemple de la Finlande, on remarque que la consommation d'anthocyanes peut excéder 200 mg/jour car les finlandais sont de grands consommateurs de baies. Par ailleurs, la consommation de catéchines en Espagne est d'environ 18-31 mg/jour car les espagnols consomment beaucoup de pommes, raisin et vin rouge. En Hollande, la consommation de catéchine s'élève à 50 mg/jour car les habitants consomment beaucoup de thé, de chocolat, des pommes et des poires.

Par ailleurs, le taux de flavonoïdes au sein d'un aliment peut varier en fonction de multiples facteurs :

- Les facteurs environnementaux ont le plus d'influence sur le taux de polyphénols au sein d'un aliment. Il s'agit :
  - o De facteurs climatiques (exposition au soleil, taux de précipitation, type de sol) ;
  - o De facteurs agronomiques (culture sous serre ou en plein champ, culture biologique, rendement de fruits par arbre etc) ;
  - o Du degré de maturité du fruit. Ce dernier facteur affecte grandement les concentrations et les proportions des différents flavonoïdes.
- Les facteurs génétiques : le taux de flavonoïdes varie en fonction de la variété, c'est le cas pour les pommes. Dans leur étude, Hammerstone *et al.* (43) se sont aperçus que le taux de proanthocyanidines variait énormément d'un type de pomme à l'autre. Par exemple, les pommes Red Delicious contiennent 2 fois plus de flavonoïdes que les Golden Delicious.
- Le stockage et les procédés de fabrication industrielle affectent grandement le taux de flavonoïdes à cause des réactions d'oxydation qui s'y produisent. Une telle réaction induit un changement dans la qualité de l'aliment (aspect visuel, caractéristiques organoleptiques) et entraîne une perte des composés d'intérêt.
- La façon de préparer les aliments influence aussi ce paramètre. Peler un fruit ou un légume suffit à enlever une portion importante de flavonoïdes. En effet, ces composés se situent préférentiellement dans la partie externe des végétaux et pas dans la chair (48,49).
- La cuisson peut avoir un effet néfaste sur le taux de flavonoïdes contenus dans certains aliments. Dans leur étude, Crozier *et al* (50) ont montré que cuire des oignons ou des tomates au micro-ondes suffisait à ce qu'ils perdent plus de 65% de leur quantité initiale

en quercétine. Faire bouillir ces aliments pendant plus de 15 minutes a un effet encore plus dévastateur avec une perte estimée à 80% de leur quantité initiale en quercétine.

Une banque de données a été ouverte en 2003 pour répertorier la composition en flavonoïdes de 225 aliments. L'enrichissement de cette banque de données serait intéressante. Cela permettrait d'établir pour chaque individu une consommation journalière en flavonoïdes en fonction de ses besoins.

## 2.5. Rôle des flavonoïdes chez les végétaux

### 2.5.1. Protection contre les rayonnements UV

Les flavonoïdes jouent le rôle d'écran protecteur contre les rayons UV du soleil. Le spectre UV est subdivisé en 3 parties :

- Les UV-A compris entre 320-400 nm, de faible énergie ;
- Les UV-B, de plus forte énergie, compris entre 280-320 nm ;
- Les UV-C, les plus extrêmes, allant de 245 à 280 nm.

Ce sont les UV-B qui causent le plus de dégâts au niveau des plantes. Ils peuvent affecter la photosynthèse, la pollinisation mais aussi créer des dommages au niveau de l'ADN.

Les flavonoïdes, accumulés dans les tissus épidermiques, absorbent les bandes d'UV-B. Ils agissent ainsi comme filtre à UV et permettent la protection de ces tissus.

C'est en particulier les flavonols qui sont les composés les plus largement impliqués dans ce rôle protecteur.

Les plantes ne produisant pas ce composé sont plus sensibles aux UV-B et au stress oxydant qu'ils induisent. Cet effet anti-UV permet d'empêcher les mutations de l'ADN causées par les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Dans ce contexte, Kootstra (51) a démontré *in vitro* que la naringénine et la rutine ont un effet protecteur sur l'ADN lorsque les plantes subissent un rayonnement UV-B.

*In vivo*, Filkowski *et al.* (52) se sont intéressés à la stabilité du génome (tt4, tt5, vtc) chez plusieurs plantes mutantes de l'Arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*). Ces plantes ont été exposées aux UV-B. L'équipe de Filkowski a étudié le mécanisme de protection de ces plantes contre les radicaux libres.

Les résultats ont montré que le mutant tt4 présentait une expression endogène plus élevée des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN. Cette étude est la preuve scientifique que les plantes ont développé *in vivo* des mécanismes sophistiqués de piégeage des radicaux libres.

### 2.5.2. Propriétés antimicrobiennes

Une des fonctions incontestées des flavonoïdes est leur rôle primordial dans la protection des plantes contre les invasions microbiennes.

Ebel *et al.* (53) ont mis en évidence cette activité antimicrobienne des iso-flavonoïdes. Ces derniers appartiennent à un sous-groupe de substances chimiques de différentes structures appelé les phytoalexines.

Les phytoalexines sont rapidement synthétisées par les plantes à la suite d'une exposition à des pathogènes (bactéries, champignons). Dans ce mécanisme de défense complexe, il

semblerait qu'un ensemble de protéines d'origine bactérienne et fongique jouerait le rôle d'éliciteur. Les éliciteurs (du latin *elicere*, « attirer, susciter ») sont des molécules produites par les agents pathogènes induisant en réponse chez les plantes un mécanisme de défense par la production de phytoalexines.

Dans leur étude portée sur des cellules de soja infectées par le champignon *Phytophthora*, l'équipe de Ebel *et al* (53) a ainsi démontré que les éliciteurs fongiques induisent la transcription d'ARNm codant les enzymes impliquées dans la synthèse des isoflavonoïdes. D'autres flavonoïdes sont également reconnus comme pour leur action antifongique chez les plantes tels que flavanols ou bien encore les flavanones.

#### 2.5.3. Rôle dans la reproduction des plantes et la fertilité

Pour pouvoir se reproduire, les plantes ont la faculté d'accumuler des flavonoïdes dans les anthères et le pistil (organe sexuel mâle et femelle, respectivement). On trouve dans les anthères les flavonoïdes suivants : des anthocyanes, des flavonols et des chalcones. L'équipe de Koes (54) a réussi à montrer que la présence de ces flavonoïdes au sein des organes reproducteurs est essentielle au bon développement du pollen.

Pour valider cette hypothèse, ils ont bloqué chez le maïs (*Zea mays*) deux gènes de l'enzyme chalcone synthase (CHS) : C2 et Whp, tous deux impliqués dans la synthèse des flavonoïdes retrouvés dans les anthères et le pistil. Cette inactivation a engendré la production d'un pollen non pigmenté et stérile.

L'expérience, réitérée sur des pétunias transgéniques, a présenté des résultats similaires. Il est bon de préciser que ce rôle des flavonoïdes n'est pas universel. En effet, la même expérience réalisée sur du persil (*Petroselinum crispum*) et du muflier (*Antirrhinum majus*) n'a pas affecté la fertilité des plantes (55).

#### 2.5.4. Rôle dans les interactions légumineuses-rhizobiums durant la nodulation

La nodulation est un phénomène se produisant lors de la symbiose légumineuse/*Rhizobium*. Ce processus, essentiel à la légumineuse, lui permet d'acquérir de l'azote sous forme réduite. Du côté du *Rhizobium*, la nodulation lui permet d'obtenir les nutriments assurant son bon développement. Cette symbiose légumineuse/*Rhizobium* initie le développement d'un nouvel organe végétal : le nodule.

L'équipe de Wasson (56) a démontré que les flavonoïdes, plus précisément les flavones, sont impliquées dans ce phénomène de nodulation. Pour cela, ils ont inhibé l'enzyme CHS impliquée dans la biosynthèse des flavonoïdes chez la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*). Ces plantes mutantes pour qui la CHS a été inhibée présentaient une déficience

en flavones, les rendant ainsi incapables d'initier le développement des nodules et donc des racines.

Wasson *et al.* ont tiré la conclusion que les flavones (apigénine, lutéine) et flavonols (kaempférol, quercétine, myrcétine), présentes dans la racine des légumineuses ont un effet chémo-attracteur sur le *Rhizobium*. Ils déclenchent l'expression des gènes de la nodulation, les gènes Nod. Ces gènes contrôlent les facteurs Nod impliqués dans la reconnaissance mutuelle légumineuse/*Rhizobium* ainsi que dans l'organogenèse nodulaire. Ce développement nodulaire est initié par la légumineuse et déclenché par le *Rhizobium* (57).

## 2.5.5. Rôle dans le transport des auxines

De nombreuses études ont montré que les flavonoïdes jouent le rôle de régulateur dans le transport des auxines (58–61).

Les travaux menés par l'équipe de Jacobs en 1998 (58) ont abouti à l'hypothèse que les flavonols (kaempférol, quercétine, myrcétine) sont capables d'inhiber le transport des auxines. Dans ce contexte, Brown *et al.* (59) ont étudié ce phénomène chez *Arabidopsis* en comparant le type sauvage (WT) et le type Transparent Testa (TT4). TT4 possède une mutation dans le gène codant pour la première enzyme impliquée dans la biosynthèse des flavonoïdes, la Chalcone Synthase (Figure 11).

La culture du mutant WT d'*Arabidopsis* sur des milieux contenant de la naringinine, un précurseur de la synthèse du kaempférol et de la quercétine (Figure 11), a montré une diminution de la croissance des racines et du gravitropisme.

Cette inhibition est similaire aux effets des inhibiteurs synthétiques du transport de l'auxine.

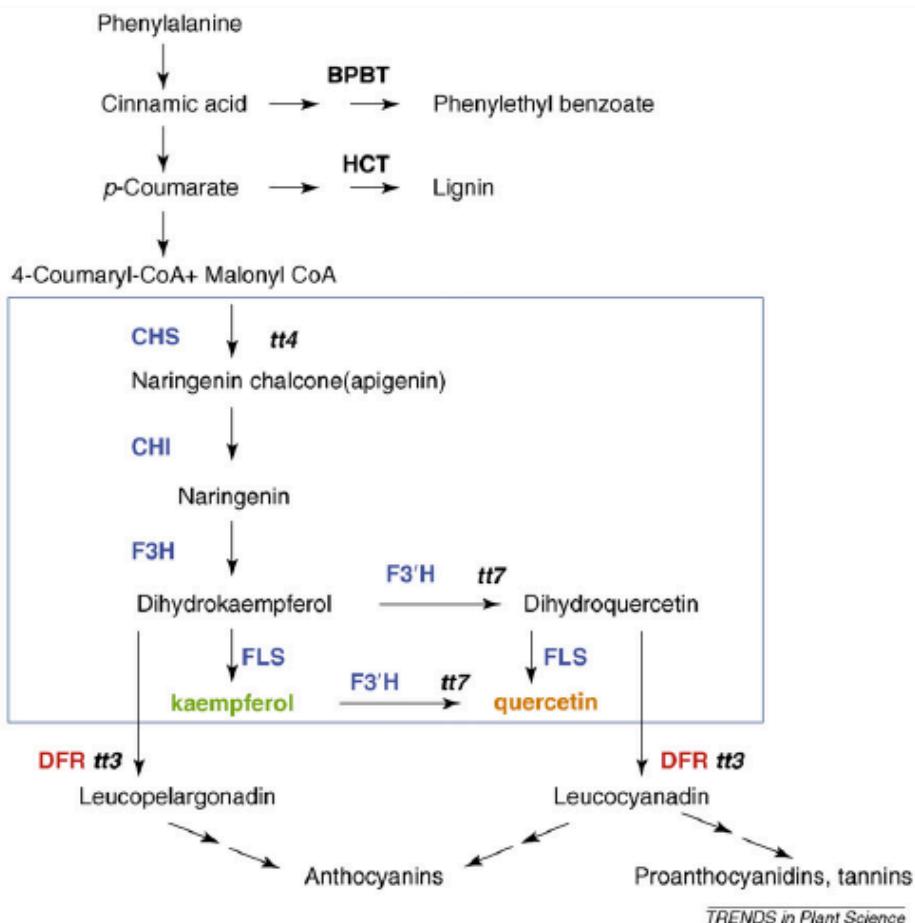


Figure 11 - Schéma représentant les différentes enzymes et les différents gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes (60)

Par ailleurs, la comparaison phénotypique entre les deux plantes a montré que le mutant TT4 possède par rapport au mutant WT :

- Trois fois plus d'inflorescences ;
- Une taille réduite de la plante ;
- Une diminution du diamètre de la tige ;
- Une augmentation du développement des racines secondaires.

*In vitro*, les analyses au niveau de l'inflorescence et de l'hypocotyle des mutants TT4 de *l'Arabidopsis* ont montré que le transport de l'auxine est élevé chez ces plantes dépourvues de flavonoïdes.

Tous ces résultats sont donc en faveur de l'effet négatif des flavonoïdes sur le transport de l'auxine.

#### 2.5.6. Importance des flavonoïdes dans la protection et la croissance des graines

On retrouve des flavonoïdes au niveau des graines de toutes les espèces végétales (38). Anti-pathogène, régulateur négatif du transport des auxines, nodulation... Il existe une multitude de fonctions attribuées aux flavonoïdes. Depuis peu, une nouvelle activité a été conférée à ces composés : la capacité à accumuler des proanthocyanidines (PA), également appelées tannins condensés. Ces flavonoïdes polymériques sont synthétisés dans les chloroplastes puis s'accumulent dans les vacuoles. Au début du développement de la graine, ils sont sous forme de composés incolores avant de s'oxyder en pigments brun au cours de la croissance. Ils sont notamment présents chez les Dicotylédones, les graines de sorgho (*Sorghum bicolor*) mais également les graines d'orge (*Hordeum Vulgare*).

Les PA constituent entre autres :

- Une barrière chimique contre les infections fongiques grâce à leurs propriétés antimicrobiennes ;
- Une barrière physique en augmentant l'imperméabilité de la graine face aux solutés ;
- Une défense contre les pathogènes en empoisonnant ou affamant les larves de Bruchinae qui se nourrissent de graines de haricot Niébé (*Vigna Unguiculata*) (63).

En conclusion, la présence de PA va assurer la longévité des graines.

## 2.6. Rôle des flavonoïdes chez l'homme

### 2.6.1. Introduction

L'intérêt pour les flavonoïdes n'a cessé de croître au cours de ces dernières décennies.

De nombreuses études épidémiologiques ont corrélé l'incidence des maladies chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, avec un certain type d'alimentation. Ces études menées ont largement admis que les régimes riches en fruits et en légumes jouent un rôle positif dans la protection contre les crises cardiaques (64), les accidents vasculaires cérébraux et le cancer (65).

Les effets bénéfiques des fruits et des légumes sur le corps humain ont d'abord été attribués aux vitamines A, C et E qu'ils contenaient (66) puis aux flavonoïdes et leurs fortes propriétés anti-oxydantes.

L'importance des flavonoïdes sur la santé a été traitée pour la première fois en 1936 par Rusznyak et Szent-Gyorgyi (67). Dans leur étude, ces deux scientifiques hongrois ont mis en évidence :

- La capacité des flavonoïdes à réduire la perméabilité des vaisseaux sanguins, ayant pour effet un renforcement de l'élasticité et l'étanchéité des vaisseaux sanguins assurant ainsi leur résistance ;
- L'action synergique des flavonoïdes avec la vitamine C dans le traitement du Scorbute.

### 2.6.2. Lutte contre le stress oxydant

À la suite d'une agression, les différents constituants de l'organisme peuvent subir une oxydation : c'est le stress oxydant (appelé aussi stress oxydatif). Ce phénomène libère des ERO comme :

- Les radicaux libres : les radicaux hydroxyles OH<sup>·</sup>, les anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, les radicaux peroxydes ROO<sup>·</sup>, les radicaux alkoxydes RO<sup>·</sup> (68) ;
- Les ions oxygénés et peroxydes : peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acide hypochloreux HOCl.

Par définition, les ERO « possèdent un électron célibataire sur leur couche périphérique les rendant très réactifs » (69).

Les ERO ne possèdent pas toutes le même degré de réactivité : par exemple, le radical hydroxyle OH<sup>·</sup> est l'espèce la plus réactive alors que l'espèce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> l'est très peu. Elles sont ubiquitaires dans l'organisme mais sont présentes en petite quantité. Leur production est liée à la balance pro-oxydant (ERO) / antioxydant (balance redox). En cas de stress oxydant, l'équilibre de cette balance est rompu, conduisant à une surproduction d'ERO ou bien à une diminution des espèces anti-oxydantes.

Les ERO sont produites dans de nombreux phénomènes physiologiques tels que le mécanisme de l'inflammation. Lors de ce processus, l'organisme va produire différentes cellules intervenant dans la réaction inflammatoire : les macrophages, les polynucléaires neutrophiles (PNN). Ces cellules vont libérer des ERO contre les agents infectieux, permettant ainsi de les éliminer (70).

A l'inverse, en concentration anormalement élevée, les ERO sont néfastes car elles provoquent des dommages cellulaires en oxydant les lipides, les protéines, les sucres et l'ADN (70). Dans ce cas, elles provoquent un vieillissement cellulaire accéléré et peut être à l'origine de nombreuses maladies telle que l'athérosclérose, cancer, maladies cardiaques et neurodégénératives etc.

Pour rétablir l'équilibre de la balance redox, l'organisme est doté d'un puissant système enzymatique antioxydant. Ce système a été découvert en 1969 par McCord et Fridovich qui travaillaient sur du sang de rat. Ils ont isolé l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) et la catalase permettant d'éliminer le radical libre de l'anion superoxyde  $O_2^-$  (71). Ces deux enzymes sont des antioxydants endogènes.

Une alimentation riche en fruits et en légumes nous apporte des antioxydants exogènes tels que : la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les flavonoïdes (71).

Les fruits et légumes n'apportent pas tous la même quantité de flavonoïdes, il en est de même pour la consommation de thé ou de café.

Grâce à leur pouvoir réducteur, les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres. La capacité des flavonoïdes à piéger ces ERO a été évaluée à l'aide de leur structure. L'efficacité de ce piégeage provient de (72–75) (Figure 12) :

- La présence de la fonction catéchol sur le cycle B qui est la meilleure donneuse d'hydrogène. La fonction catéchol permet la délocalisation des électrons.
- La double liaison entre C2 et C3 ainsi que la fonction carbonyle à la position 4 confère à la molécule une délocalisation électronique stabilisante.
- La présence de groupement hydroxyle en position 3 et 5. Enlever le 3-OH, le 5-OH ou créer une insaturation sur le cycle C diminue les propriétés anti-oxydantes des flavonoïdes. Ces groupements sont donc essentiels aux flavonoïdes pour assurer la capacité de piégeage des radicaux libres.

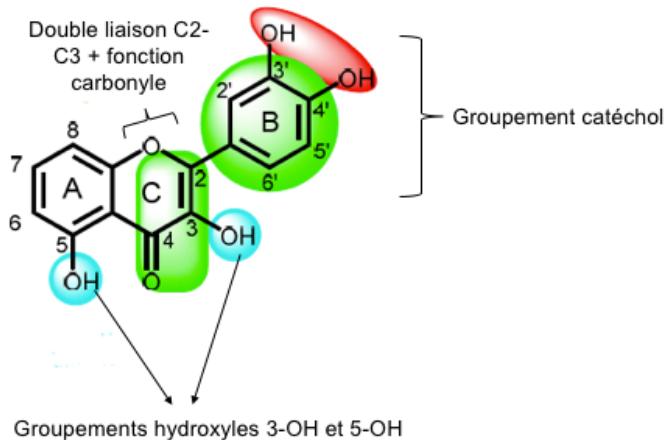


Figure 12 - Schéma représentant les éléments structuraux des flavonoïdes essentiels à leur capacité de piégeage des radicaux libres (72)

Pour finir, dans leur étude relation structure-activité des flavonoïdes, Amic *et al.* se sont aperçus qu'en absence de la fonction catéchol sur le cycle B, le groupement hydroxyle 5-OH du cycle A est capable de compenser cette absence et assurer une meilleure activité anti-radicalaire du flavonoïde (73).

### 2.6.3. Propriété anti-tumorale

Dès les années 1990, les chercheurs se sont intéressés aux propriétés anti-tumorales des flavonoïdes (76).

Actuellement, les études expérimentales (modèles animaux, lignées cellulaires) et épidémiologiques (essais sur les humains) se sont répandues pour pouvoir mettre en évidence le pouvoir anti-cancérigène des flavonoïdes (73,77,78).

Par exemple, l'étude de Conney *et al.* (79) sur l'administration de thé vert/noir chez des souris atteintes de tumeurs a mis en évidence l'activité anti-tumorale des catéchines.

Ces flavonoïdes ont révélé leur pouvoir anti-tumoral sur différents types de cancers tels que les médulloblastomes (80), les cancers colorectaux, de l'estomac, des poumons et du sein (55,56).

Parallèlement à cela, Lamy et ses collaborateurs (82) ont démontré que les anthocyanines sont capables d'inhiber la migration cellulaire du glioblastome, tumeur primitive du cerveau qui est très agressive.

Par ailleurs, Wenzel *et al.* ont (81) montré que les flavones sont capables d'induire la mort cellulaire, la différentiation et l'inhibition de la croissance des cellules produites dans le cancer du côlon.

Pour conclure, on se rend bien compte que toutes ces sous-classes de flavonoïdes peuvent être utiles au développement de nouvelles stratégies de prévention de nombreux types de cancer.

#### 2.6.4. Effet protecteur vasculaire

Au cours de la dernière décennie, il y a eu une résurgence de l'intérêt porté pour les flavonoïdes en raison des liens possibles avec la prévention du cancer ainsi que des maladies cardiovasculaires. On pense que ces composés naturels peuvent protéger les tissus contre les RLO (Radicaux Libres dérivés de l'Oxygène). Une production accrue de RLO provoque des lésions tissulaires impliquées dans différentes pathologies telles que l'athérosclérose ou bien le cancer.

L'athérosclérose joue un rôle important dans le développement de maladies coronariennes ainsi que les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Cette maladie est caractérisée par l'accumulation de corps gras (essentiellement le mauvais cholestérol lié à la présence de lipoprotéines de basse densité (LDL) au sein d'une artère). Cette accumulation va former une plaque d'athérome qui, à terme, risque de provoquer un rétrécissement, gênant le passage du sang et l'apport en oxygène à l'organe que l'artère irrigue (83). Une hypothèse majeure suggère que l'apport d'antioxydants alimentaires chez les personnes à risque pourrait retarder voire éviter l'accumulation de LDL dans les artères du corps humain. Cette hypothèse fournit une stratégie prometteuse dans la prévention de l'athérosclérose et, par conséquent, l'apparition de maladies coronariennes. Cependant, la capacité des antioxydants alimentaires à inhiber le LDL *in vivo* reste à établir (84).

A l'heure actuelle, plusieurs dizaines de médicaments composés de fraction flavonoïque (à base d'Hespéridine ou de Rutine) sont présents sur le marché pour :

- leur rôle protecteur des capillaires sanguins ;
- leur stimulation de la circulation sanguine ;
- la lutte contre l'altération des vaisseaux capillaires.

Les médicaments tels que le Daflon<sup>®</sup>, le Véliben<sup>®</sup> ou l'Esberiven<sup>®</sup> sont indiqués dans le traitement symptomatique des jambes lourdes et impatiences causés par une mauvaise circulation sanguine. Cependant, par manque de preuves suffisantes de leur efficacité, ces médicaments ne sont plus remboursés par l'Assurance Maladie.

## 2.6.5. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des flavonoïdes a été initialement rapportée en 1980 par l'équipe de Baumann (85). Les flavonoïdes sont capables de moduler l'activité enzymatique de l'acide arachidonique (AA), acide gras produit dans le cadre d'une inflammation.

Lorsque les flavonoïdes ont été testés contre le métabolisme de l'AA, nombre d'entre eux se sont révélés efficaces dans l'inhibition des enzymes métabolisantes de l'AA (86) (Figure 13) : la phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), la cyclo-oxygénase (COX), la lipoxygénase (LOX) ainsi que la prostaglandine endoperoxyde hydrogène synthase (PGHS).

Concernant cette dernière enzyme, l'étude de Harborne et Williams (30) a révélé que la cyanidine a un effet inhibiteur sur l'isoforme PGHS-2. Pour cela, ils ont analysé la capacité de 3 anthocyanides de cerises acides et leur aglycone, la cyanidine, à inhiber la PGHS-1 et 2. Les résultats ont montré une activité inhibitrice élevée de la cyanidine sur l'isoforme PGHS-2. Ces résultats sont prometteurs puisque des effets thérapeutiques bénéfiques résultent de l'inhibition de la PGHS-2 alors qu'une inhibition de la PGHS-1 est attribuable à des effets ulcérogènes et indésirables des Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS)

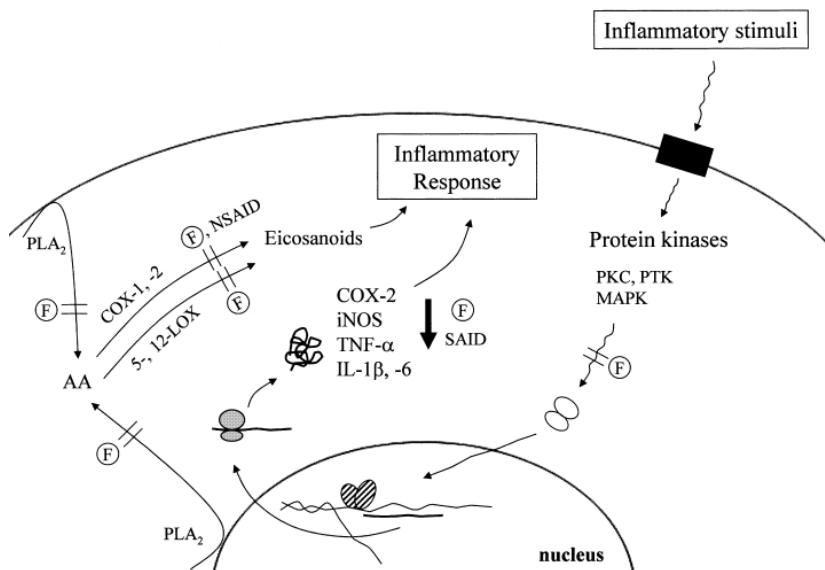


Figure 13 - Mécanisme d'action suggéré des flavonoïdes sur le cycle de l'inflammation (86)

Légende :

F = flavonoïde

**NSAID** = Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

**SAID** = Anti-Inflammatoire Stéroïdien

« = » et ↓ signifient respectivement : inhibition de l'enzyme et régulation négative de l'expression de l'enzyme

## 2.6.6. Propriétés antibactériennes et antivirales

Les flavonoïdes sont capables de protéger les plantes des invasions microbiennes. Nombre de chercheurs se sont intéressés à mettre en évidence cette propriété des flavonoïdes chez l'être humain. Les études ont révélé que certains sous-groupes de flavonoïdes ont une activité inhibitrice contre certains types de bactéries/virus.

L'équipe de Li (87,88) a travaillé sur la Baicaline (BA), composé flavonoïque purifié à partir de l'herbe médicinale chinoise Huang-chin (*Scutellaria baicalensis*). La BA est notamment utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoire et anti-allergique permettant de traiter les cas de bronchite, néphrite, hépatite, asthme et dermite atopique. Malgré la preuve de son activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo*, le mécanisme d'action de cette molécule reste à déterminer. Les études sur ce flavonoïde ont révélé que la BA est capable de réaliser des complexes avec un certain nombre de chimiokines, interférant ainsi leurs interactions avec les récepteurs CCR5 et CXCR4. Or, le virus VIH-1 utilise ces derniers comme co-récepteurs pour la fusion et l'infection des cellules hôtes. Ce mécanisme permet donc d'inhiber l'infection par le VIH-1 au stade précoce de l'infection.

## 2.6.7. Effet des flavonoïdes sur la mémoire et la cognition

L'avancement en âge ainsi que le vieillissement sont liés à des modifications cognitives. Certains chercheurs ont voulu démontrer que la consommation de fruits et de légumes, de par les composés polyphénoliques qu'ils contiennent, peut ralentir le vieillissement des communications neuronales et éviter les troubles cognitifs.

Pour cela, l'équipe de Huntley (89,90) a travaillé sur une centaine de rats. Ils ont évalué sur le long terme les fonctions cognitives (apprentissage et espace) des rats en fonction de l'une des quatre supplémentations alimentaires ci-dessous :

- Vitamine E (500 UI/kg)
- Fraises ou épinards (fournissant la même quantité de Vitamine E)
- Régime témoin.

Les résultats ont montré que la mémoire et la fonction cognitive se sont améliorées grâce à la supplémentation en vitamine E ou en composés polyphénoliques. Une étude similaire a été réalisée sur de vieux rats, en utilisant cette fois-ci des fraises, des myrtilles ou bien des épinards et en l'opposant à un régime alimentaire témoin. L'étude a révélé des résultats similaires, inversant même la tendance des troubles cognitifs, le régime supplémenté en myrtilles étant le plus efficace.

## 2.6.8. Les flavonoïdes dans la prévention de l'ostéoporose chez la femme ménopausée

Les oestrogènes sont des hormones essentielles au bon fonctionnement de l'organisme. Elles possèdent entre autres des propriétés de régulation de la croissance osseuse, régulant la production entre :

- Les ostéoblastes qui produisent de l'os.
- Les ostéoclastes résorbant l'os.

Pendant et à la post-ménopause, les taux d'oestrogènes sont au plus bas, entraînant ainsi une diminution de la masse osseuse qui fragilise le squelette. S'installe alors l'ostéoporose.

Pour prévenir les effets de cette maladie hormono-dépendante, certaines plantes légumineuses sont utilisées : elles sont appelées les phyto-oestrogènes.

Récemment, des chercheurs ont découvert que des plantes non légumineuses étaient riches en phyto-oestrogènes. Il s'agit par exemple de l'Epimède (*Epimedium brevicornum maxim*), une plante médicinale qui est utilisée en médecine chinoise afin de renforcer les os.

Cette plante est composée de 3 phyto-oestrogènes différents :

- L'icariine
- La génistéine
- La daidzéine

L'ensemble formera l'EPF : Phyto-oestrogènes dérivés de l'*Epimedium brevicornum maxim*.

Pour évaluer l'effet bénéfique de l'EPF sur le squelette, Zhang *et al.* (91) ont réalisé une étude randomisée en double aveugle sur 100 femmes ménopausées.

Pour cela, les patientes se sont vues recevoir tous les jours soit 4 gélules d'EFP ( $n = 50$ ) soit des gélules placebo ( $n = 50$ ) dont l'apparence est identique aux gélules d'EFP. Les deux groupes ont également reçu un apport journalier de 300 mg de calcium. Les effets de l'EPF ont été mesurés en évaluant la densité minérale osseuse (DMO) des patientes au mois 0, 12 et 24.

Au niveau du col fémoral, les résultats ont montré que la DMO du groupe placebo a diminué de 1,4% entre le mois 0 et le mois 12. A l'inverse, la DMO a augmenté de 1,1% entre le début de l'étude et le 12<sup>ème</sup> mois pour le groupe recevant de l'EFP. Ces résultats se sont montrés encore plus significatifs au 24<sup>ème</sup> mois.

Cette étude clinique valide donc bien l'hypothèse que les EPF ont un effet bénéfique sur la prévention de la perte osseuse chez la femme ménopausée.

## 2.6.9. Intérêt des flavonoïdes dans la goutte chronique

La goutte est une maladie chronique caractérisée par le dépôt de cristaux d'acide urique au niveau des articulations, plus particulièrement celle du gros orteil (92).

Cette maladie se traduit par de douloureuses crises d'arthrite durant quelques jours puis les symptômes disparaissent pour plusieurs semaines.

En condition normale, l'acide urique contenue dans l'organisme se dissout dans le sang pour être filtrée par les reins puis éliminée dans les urines.

En condition pathologique, c'est-à-dire en présence d'un fort taux d'acide urique, l'organisme n'arrive plus à éliminer cette molécule qui se transforme en cristaux d'acide urique. La goutte est la conséquence directe d'une alimentation trop riche en purines (anchois, harengs, cervelle, ris de veau, haricots sec), en bière, café ou boissons sucrées favorisant une augmentation rapide de la concentration d'acide urique dans le sang. Plus rarement, cette maladie peut être due à un traitement médicamenteux à base de diurétiques de l'anse ou de diurétiques thiazidiques dont le mécanisme d'action bloque la réabsorption de sodium et de chlore entraînant une hypernatriurie, une hyperchloration et surtout une augmentation de la réabsorption tubulaire d'urates lorsque le traitement est prolongé. Pour traiter cette maladie, il existe un médicament très largement répandu : l'allopurinol. Cette molécule appartient à la famille des purines et, de par son analogie structurale avec la xanthine et l'hypoxanthine, est un inhibiteur compétitif de la XO. Cette oxydoréductase intervient dans l'oxydation de la xanthine en acide urique. L'allopurinol est efficace et sûr chez la majorité des patients. On estime les cas d'intolérance de ce médicament à environ 10% des patients traités (93). Les effets indésirables les plus fréquents sont les troubles digestifs mais également les réactions d'hypersensibilité. Ce dernier trouble peut aller de la simple fièvre jusqu'à des cas d'érythème pigmenté fixe, d'éruptions cutanées voire de syndrome de Lyell. Ces cas d'hypersensibilité peuvent survenir après des mois ou des années de traitement. Cela survient principalement chez des patients âgés présentant une insuffisance rénale et prenant des diurétiques thiazidiques ou des diurétiques de l'anse.

Bien que l'allopurinol soit un médicament efficace dans le traitement de la goutte, il présente un faible pouvoir inhibiteur de la XO (valeurs de CI50 comprises entre 0,2 et 50 M). Sa structure moléculaire appartenant à la famille des purines est à l'origine de graves effets secondaires chez les patients âgés. Ces deux inconvénients majeurs poussent à la recherche de nouveaux inhibiteurs de XO avec un motif structural différent de celui des purines. Un tournant inattendu mais fondamental s'est produit lorsqu'en 1969, les scientifiques McCord et Fridovich ont découvert le rôle de la XO dans la génération de radicaux libres. Dès lors, les recherches se sont multipliées sur cette enzyme et les scientifiques se sont aperçus que la XO était impliquée dans diverses pathologies telles que les infections virales, les problèmes

vasculaires mais plus particulièrement la goutte chronique, conséquence directe de l'hyperuricémie. La recherche de molécules piégeuses de radicaux libres n'a alors cessé de s'intensifier. Une variété de nouveaux inhibiteurs de XO, extraits de plantes médicinales, de différentes structures et activités, a alors été découverte : composés phénoliques, coumarines et plus particulièrement les flavonoïdes.

Hanasaki et ses collaborateurs ont été les pionniers dans l'étude du pouvoir d'inhibition des flavonoïdes sur la XO (94). En 1994, ces chercheurs se sont penchés sur la capacité de 15 flavonoïdes à inhiber à la fois la production d'acide urique et celle du radical superoxyde. En 1998, Cos et ses collaborateurs (95) ont confirmé les résultats d'Hanasaki *et al.* en réalisant une étude de relation structure activité en évaluant le pouvoir inhibiteur de plusieurs flavonoïdes.

A l'échelle du laboratoire, nous nous sommes intéressée à l'évaluation du pouvoir anti-oxydant de 4 flavonoïdes : la naringénine, la naringine, la taxifoline et la rutine. Pour cela, on a mesuré le pouvoir anti-oxydant de ces 4 flavonoïdes par la méthode de l'inhibition de la XO. Les résultats obtenus ont été comparés avec la méthode ABTS et la méthode DPPH. L'intérêt de ces manipulations est de renforcer les résultats d'études déjà existantes en vue de trouver un flavonoïde au pouvoir anti-oxydant suffisamment puissant pour ensuite pouvoir l'étudier à l'aide d'une méthode de docking.

### 3. Étude expérimentale

#### 3.1. Matériels et méthodes

##### 3.1.1. Matériels

###### 3.1.1.1. Molécules

Un ensemble de 4 flavonoïdes, appartenant à différentes sous-classes, a été choisi pour réaliser les expériences de mesure de l'activité anti-oxydante. Ils ont tous été acheté chez Sigma-Aldrich. La naringénine, la naringine et la taxifoline appartiennent à la sous-classe des flavanones et la rutine à la sous-classe des flavonols.

###### 3.1.1.2. Réactifs

Pour mener à bien ces expériences, différents réactifs ont été utilisés (Tableau X) :

Tableau X - Réactifs utilisés dans les différentes méthodes de la mesure de l'activité anti-oxydante des flavonoïdes

Méthode	Réactif	Abréviation	Fournisseur
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)	ABTS	Sigma-Aldrich
	Persulfate de potassium	PP	Fluka
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyle	DPPH	Sigma-Aldrich
ABTS & DPPH	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid purum	TROLOX	Fluka
Xanthine oxydase	Phosphate monosodique	-	Prolabo
	Phosphate disodique	-	Sigma Aldrich
	Xanthine	-	Sigma Aldrich
	Xanthine oxydase	XO	Sigma Aldrich

### *3.1.1.3. Appareils*

#### Pour les tests DPPH et ABTS :

Les mesures de l'activité anti-oxydante des flavonoïdes ont été réalisées à l'aide d'un automate, le spectrofluorimètre Xenius (96) (SAFAS, Monaco). Cet appareil est relié à une pompe possédant 2 injecteurs. Au niveau des injecteurs, l'opérateur installe sur 3 voies différentes : le solvant de dilution (éthanol ou méthanol), l'échantillon à analyser (flavonoïdes) et le réactif (ABTS ou DPPH). Le tout est commandé par un logiciel sur ordinateur.

Les mesures sont effectuées sur une microplaquette 96 puits qui est insérée dans l'appareil. La dernière ligne de la microplaquette doit être remplie manuellement avec 300 µL de solvant de dilution (éthanol pour le test ABTS ; méthanol pour le test DPPH). Cette ligne permet à SAFAS de faire le blanc.

Sur les 7 autres lignes de la microplaquette, l'appareil va injecter une certaine concentration en réactif (ABTS ou DPPH), en solvant de dilution et en flavonoïdes. Chaque expérience est répétée 3 fois.

Chaque puit est ainsi rempli de :

- 220 µL de réactif (ABTS ou DPPH) ;
- 80 µL d'un mélange de solvant de dilution + flavonoïdes (quantité de solvant de dilution variant de 0 à 80 µL en fonction de la concentration en flavonoïdes).

L'appareil mesure la densité optique (DO) des échantillons à l'instant initial puis toutes les 3 minutes pendant 15 minutes.

#### Pour le test à la xanthine oxydase :

Les manipulations ont été réalisées manuellement à l'aide de micropipettes. Les mesures d'absorbance et de cinétique de réaction ont été suivies à l'aide d'un spectrophotomètre thermos UV.

### 3.1.2. Méthodes

#### 3.1.2.1. *Méthodes HAT et SET*

La mesure du pouvoir antioxydant des flavonoïdes est utile pour déterminer la valeur nutritive des aliments, leurs effets bénéfiques sur la santé mais aussi pour suivre l'évolution des maladies liées au stress oxydatif (athérosclérose etc).

Les flavonoïdes agissent en tant qu'antioxydant en transférant un atome d'hydrogène (H) ou un électron ( $e^-$ ) à des espèces réactives de l'oxygène, permettant ainsi de les désactiver.

Doser l'activité anti-oxydante des flavonoïdes repose sur le même principe. Il existe deux grandes méthodes de mesure de l'activité anti-oxydante :

- La méthode SET (Single Electron Transfer) est un mécanisme de transfert d'un  $e^-$  non apparié du radical libre ( $R\cdot$ ) vers l'antioxydant. Il s'agit par exemple du test DPPH (97) ;
- La méthode HAT (Hydrogen Atom Transfer) qui est un mécanisme de transfert d'un atome d'hydrogène. Il s'agit de la méthode ABTS ; certains chercheurs disent qu'il s'agit également de la méthode DPPH (Le test DPPH est donc une méthode mixte SET/HAT) (97–99).

Les résultats obtenus avec les tests DPPH et ABTS sont comparés avec une valeur de référence, celle du trolox. Ils sont exprimés en équivalent TROLOX. Cela permet de comparer les mesures de ces deux tests entre elles par rapport à la même référence.

### 3.1.2.1.1. Le test DPPH

#### ❖ Principe de réaction entre le radical libre DPPH<sup>·</sup> et un antioxydant

De par sa structure chimique, le DPPH possède un électron libre sur un atome d'azote se situant au niveau du pont de liaison de la molécule (Figure 14).

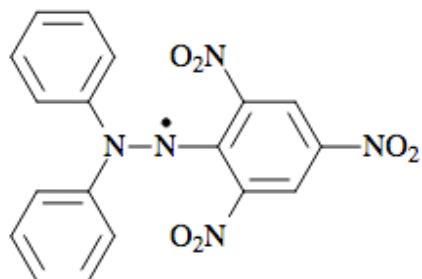


Figure 14 - Structure chimique du DPPH·

Lorsqu'il est sous cette forme, le DPPH· est de couleur pourpre, avec une absorption maximale de 517 nm dans l'éthanol. Au contact d'un antioxydant, le DPPH se voit réduit en une molécule stable, le 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine (DPPHH), et sa couleur passe alors au jaune. La récupération du radical libre du DPPH· par l'antioxydant est suivie par une diminution des lectures d'absorbance au cours du temps par un spectrophotomètre-UV visible.

La capacité de piégeage des radicaux libres par les antioxydants est mesurée de deux manières différentes :

- Par la concentration efficace médiane (CE50). Plus précisément, la CE50 indique la concentration d'antioxydant nécessaire pour inhiber 50% de la concentration initiale de DPPH. Plus la CE50 est petite, plus le pouvoir antioxydant du flavonoïde sera élevé (100) ;
- Par le pourcentage d'inhibition de l'activité anti-radicalaire du DPPH à un temps donné noté %RSA (Radical Scavenger Activity)

Le %RSA est calculé de la manière suivante :

$$\%RSA = \left( \frac{Abs \text{ contrôle} - Abs \text{ échantillon}}{Abs \text{ contrôle}} \right) \times 100$$

Équation 2 - Formule permettant de calculer le pourcentage d'inhibition de l'activité anti-radicalaire du DPPH

Sur Excel est tracé le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon (en µM). Lorsque les mesures sont effectuées dans une gamme de concentration optimale,

on obtient une droite linéaire dont l'équation est de la forme  $y = ax + b$ . Chaque mesure est répétée 3 fois.

Pour obtenir l'IC<sub>50</sub> de chacune des 3 répétitions, on divise 50 par les pentes respectives des droites. À partir des 3 IC<sub>50</sub> obtenues est calculé la moyenne et l'écart-type.

Enfin, la pente de la droite de l'échantillon est divisée par la pente de la droite du trolox (= pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en Trolox (en  $\mu\text{M}$ )). La valeur obtenue correspond à la quantité de Trolox nécessaire pour inhiber une mole de l'échantillon analysé. Il s'agit du TEAC qui est exprimé en  $\mu\text{M}$ .

#### ❖ Mode opératoire

La mesure de l'activité antioxydante par le test DPPH est basée selon la méthode de Burda & Oleszczuk (101).

##### 1) *Préparation des réactifs*

###### Solution de DPPH<sup>·</sup> :

Une solution de DPPH à 46,7 mg/L est préparée (11,7 mg de DPPH<sup>·</sup> dans une fiole jaugée de 250 mL, complétée jusqu'au trait de jaugée avec du méthanol). Cette solution doit être préparée à l'avance (1-2 heures avant les manipulations). Il faut également veiller à ce que le réactif soit entièrement dissout car ce dernier présente une faible solubilité dans les solvants. La solution ne pourra être gardée que 4 jours, de préférence au frais et à l'abri de la lumière.

###### Solution de Trolox :

Une solution mère de Trolox à une concentration de 1,5 mM est préparée (9,37 mg de Trolox dans une fiole jaugée de 25 mL, complétée jusqu'au trait de jaugée avec du méthanol). Une dilution de la solution mère est réalisée pour obtenir une solution fille de 150  $\mu\text{M}$ .

###### Échantillon :

Une solution mère de flavonoïde est préparée dans du méthanol. La concentration choisie est optimale lorsque la courbe représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon est linéaire. Si ce n'est pas le cas, il faut diluer la solution mère jusqu'à obtenir une droite linéaire.

## 2) Expérience

La mesure de l'activité antioxydante des échantillons est détaillée dans la partie Matériels et méthodes, 3.1.1.3. Appareils, page 46. Ces mesures sont effectuées à l'aide de l'automate SAFAS à 517 nm.

### 3.1.2.1.2. Le test ABTS

#### ❖ Principe de réaction entre le radical libre ABTS<sup>·+</sup> et un antioxydant

Il est nécessaire de générer un radical libre de l'ABTS pour pouvoir utiliser ce test. Pour cela, l'ABTS stable est mis au contact de persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ). Le réactif se voit alors oxydé et se transforme en ABTS<sup>·+</sup> qui a une couleur bleue/verte dans l'eau distillée et un spectre d'absorption à 734 nm.

La mise en contact de l'ABTS<sup>·+</sup> avec un antioxydant entraîne le transfert d'un atome d'hydrogène de l'antioxydant vers le réactif. Visuellement, cette réaction est visible pas une décoloration de la solution.

La mesure de l'activité anti-oxydante est exprimée en Trolox Equivalent Antioxydant Activity (TEAC). Elle correspond à la capacité de l'antioxydant à diminuer l'intensité de la coloration bleue/verte de l'ABTS<sup>·+</sup> à 734 nm (102–104).

Le pourcentage d'inhibition est déterminé de la manière suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \left( \frac{\text{Abs témoin} - \text{Abs blanc}}{\text{Abs témoin}} \right) \times 100$$

*Équation 3 - Formule permettant de calculer le pourcentage d'inhibition de l'activité anti-radicalaire par le test ABTS*

Avec *Abs témoin* : absorbance du radical ABTS<sup>·+</sup> méthanol ; *Abs blanc* : absorbance de l'échantillon ABTS + antioxydant

Un des principaux avantages de cette méthode est que l'ABTS<sup>·+</sup> réagit rapidement avec les antioxydants et peut être utilisé sur une gamme de pH étendue. De par sa simplicité d'utilisation, ce test permet d'étudier les capacités antioxydantes de molécules lipophiles et des phases aqueuses.

Sur Excel est tracé le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon (en  $\mu\text{M}$ ). Lorsque les mesures sont effectuées dans une gamme de concentration optimale,

on obtient une droite linéaire dont l'équation est de la forme  $y = ax + b$ . Chaque mesure est répétée 3 fois.

Pour obtenir l'IC<sub>50</sub> de chacune des 3 répétitions, on divise 50 par les pentes respectives des droites. Sur les 3 IC<sub>50</sub> obtenues sont calculés la moyenne et l'écart-type.

Enfin, la pente moyenne de la droite de l'échantillon est divisée par la pente de la droite du trolox (= pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en Trolox (en  $\mu\text{M}$ )). La valeur obtenue correspond à la quantité de Trolox nécessaire pour inhiber une mole de l'échantillon analysé. Il s'agit du TEAC qui est exprimé en  $\mu\text{M}$ .

### ❖ Mode opératoire

La mesure de l'activité antioxydante par le test ABTS est basée selon la méthode modifiée de Re *et al.* (102).

#### 1) *Préparation des réactifs*

##### Solution d'ABTS<sup>·+</sup>:

Une solution mère d'ABTS<sup>·+</sup> à 7 mM est préparée. Pour cela, des masses de 38,4 mg d'ABTS et de 6,62 mg de PP respectivement sont pesées puis introduites dans une fiole jaugée de 10 mL. La fiole est complétée jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée. Cette solution sera incubée dans l'obscurité et à température ambiante durant 12-16 heures de manière à ce que les radicaux de l'ABTS<sup>·+</sup> soient bien activés.

Cette solution mère sera diluée dans de l'éthanol afin que la DO soit égale à 0,95 à la longueur d'onde de 734 nm sur le spectrophotomètre.

##### Solution de Trolox :

Une solution mère de Trolox à une concentration de 2,5 mM est préparée dans l'éthanol.

À l'aide de cette solution est préparée une solution fille de trolox de 62,5  $\mu\text{M}$ .

##### Echantillon :

Une solution mère de flavonoïde est préparée dans de l'éthanol. La concentration choisie est optimale lorsque les courbes représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon est linéaire. Si ce n'est pas le cas, il faut diluer la solution mère jusqu'à obtenir une droite linéaire.

## 2) Expérience

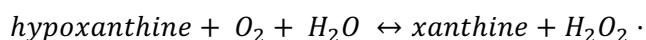
La mesure de l'activité antioxydante des échantillons est détaillée dans la partie Matériels et méthodes, 3.1.1.3. Appareils, page 46. Ces mesures sont effectuées à l'aide de l'automate SAFAS à une DO de 734 nm.

### 3.1.2.2. Test à la xanthine oxydase

#### ❖ Principe de réaction entre la xanthine oxydase et un antioxydant

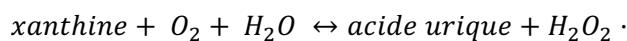
La xanthine oxydase est une enzyme catalysant deux oxydations (95) :

- L'hypoxanthine en xanthine



Équation 4 - Oxydoréduction de l'hypoxanthine en xanthine

- La xanthine en acide urique



Équation 5 - Oxydoréduction de la xanthine en acide urique

Ces réactions s'accompagnent de la formation de peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot$  qui est responsable des dommages oxydatifs des tissus de l'organisme.

La méthode de la xanthine oxydase correspond à la capacité des flavonoïdes à inhiber cette enzyme, permettant ainsi de diminuer la production d'acide urique.

La diminution de l'acide urique est suivie au cours du temps et est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre afin d'évaluer l'activité anti-oxydante de l'échantillon.

#### ❖ Mode opératoire

Ce test d'inhibition est extrait des du livre de Bergmeyer *et al.* (105) et adapté par Anthoni Julie (104).

### 1) Préparation des réactifs

#### Solution tampon phosphate :

Une solution de tampon phosphate de 33 mM à pH 7,5 a été préparée en utilisant une solution phosphate monosodique à 66 mM et une solution d'hydrogénophosphate de sodium dibasique à 66 mM.

#### Solution de xanthine à 150 µM :

Une masse de 5,71 mg de xanthine a été préalablement dissoute dans un volume de 2 mL de soude puis introduite dans une fiole de 250 mL. La fiole est complétée jusqu'au trait de jauge avec la solution de tampon phosphate 33 mM fraîchement préparée.

#### Solution de xanthine oxydase 0,2 U/mL :

Un volume de 160 µL de xanthine oxydase à 10 U/mL est introduit dans un tube à hémolyse. Ce tube est complété avec un volume de 1840 µL de tampon phosphate 33 mM.

#### Echantillon :

Une concentration initiale de flavonoïdes est définie. La masse d'échantillon correspondante est diluée dans un volume minimal de diméthylsulfoxyde (DMSO) puis aussitôt dans du tampon phosphate 33 mM.

## 2) Expérience

Les dilutions de la solution mère de l'échantillon sont effectuées dans des tubes à hémolyse. Le volume total des différentes solutions filles est de 2000 µL (volume de flavonoïde + volume de tampon phosphate variant entre 0 et 2000 µL).

Dans chaque cuve à spectrophotomètre est ajouté :

- 300 µL de solution d'échantillon ;
- 1600 µL de tampon phosphate 33 mM ;
- 1000 µL de xanthine à 150 µM.

Le dosage de l'échantillon est initié par l'ajout de 100 µL de xanthine oxydase (0,2 U/mL). La cinétique de la réaction est suivie à une DO de 290 nm, **toutes les 30 secondes, pendant 6 minutes.**

Sur Excel est tracé l'absorbance de l'échantillon en fonction du temps. On obtient une régression linéaire dont la pente de la droite correspond à la vitesse de dosage de l'échantillon.

Le dosage de l'échantillon témoin repose sur le même principe, sauf qu'il n'y a pas d'ajout de xanthine oxydase. Ce dernier est remplacé par l'ajout de 100 µL de tampon phosphate. La cinétique de la réaction est suivie à une DO de 290 nm toutes les 30 secondes, pendant 6 minutes.

Sur Excel est tracé l'absorbance de l'échantillon témoin en fonction du temps. Comme la pente de l'échantillon témoin est toujours égale à 0, il n'est pas nécessaire d'effectuer cette manipulation.

Chacune de ces mesures citées ci-dessus sera répétée 3 fois.

La détermination de la cinétique des différents échantillons permet de calculer l'activité enzymatique de chaque dilution d'échantillon effectué :

$$XO = \frac{(u_{ech} - u_{tem}) \times V_1 \times df}{C \times V_2}$$

*Équation 6 - Formule de l'activité enzymatique de la xanthine oxydase*

Avec : XO : activité de la xanthine oxydase (U/mL d'enzyme)

$U_{ech}$  : vitesse du dosage de l'échantillon (en Absorbance/min à 290 nm)

$U_{tem}$  : vitesse du dosage de l'échantillon témoin (en Absorbance/min à 290 nm ; égale à 0)

$V_1$  : volume total du dosage en millilitre (ici **3 mL**)

df : facteur de dilution de la solution mère de l'échantillon

C : coefficient d'extinction molaire de l'acide urique à 290 nm (ici **12,2**)

$V_2$  : volume de l'enzyme utilisée en millilitre (ici **0,1 mL**)

*NB : Lorsqu'il s'agit de l'activité de la XO à une concentration en échantillon de 0 µM, le facteur de dilution df ne sera pas pris en compte*

Les valeurs de l'activité de la XO pour chaque concentration d'échantillon permettent de calculer le pourcentage d'inhibition de l'enzyme :

$$\text{Inhibition XO (\%)} = \frac{XO_{tamp} - XO_{éch}}{XO_{tamp}} \times 100$$

*Équation 7 - Formule du pourcentage d'inhibition de la xanthine oxydase (%)*

L'inhibition de la XO est exprimée comme la concentration permettant de diminuer de 50% l'activité enzymatique. Il s'agit de la concentration inhibitrice médiane (IC50). En figure 15 est représenté une allure de courbe modèle à obtenir, représentant le pourcentage d'inhibition de la XO en fonction des concentrations en échantillon testées.

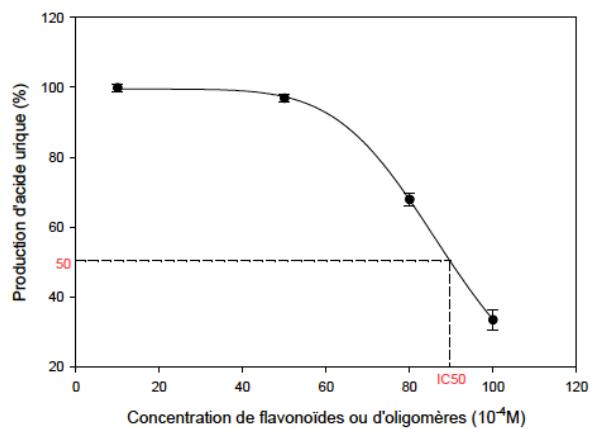


Figure 15 - Courbe modèle représentant la détermination graphique de l'IC<sub>50</sub>

### 3.2. Résultats

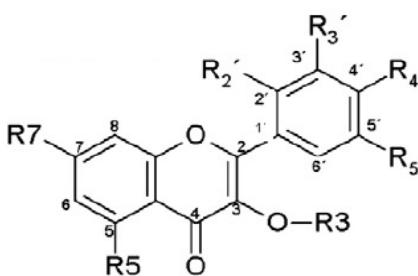
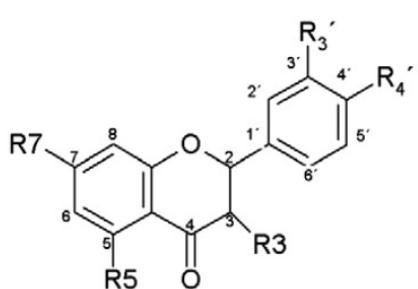
2 sous-classes de flavonoïdes ont été étudiées : les flavanones et les flavonols. Leur activité anti-oxydante a été évaluée grâce à la méthode de l'inhibition de la xanthine oxydase et les tests ABTS et DPPH. Ces deux derniers utilisent le même mécanisme réactionnel, ils diffèrent juste par l'utilisation de radicaux différents.

Le tableau XI montre pour les différentes sous-classes de flavonoïdes l'IC50 mesurée à l'aide de la méthode ABTS, DPPH et de l'inhibition de la xanthine oxydase.

Tous les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (Standard Deviation).

Tableau XI - Mesure de l'activité anti-oxydante de 2 groupes de flavonoïdes par la mesure ABTS, DPPH et l'inhibition de la xanthine oxydase en calculant leur IC50

<b>Sous-classe</b>	<b>Molécule</b>	<b>IC50 (<math>\mu</math>M)</b>		
		ABTS	DPPH	Xanthine Oxydase
<b>Flavanone</b>	Naringénine	49,5 $\pm$ 0,795	7440,341 $\pm$ 993,423	254
	Naringine	101,352 $\pm$ 6,111	4277 $\pm$ 965	273
	Taxifoline	15,6 $\pm$ 0,5	27,571 $\pm$ 0,756	250
<b>Flavonol</b>	Rutine	17,3 $\pm$ 0,3	15,411 $\pm$ 0,387	170



### 3.3. Discussion

L'observation des résultats montre que par la méthode ABTS, la naringine possède l'IC50 la plus élevée ( $101,352 \pm 6,111$ ). Cette dernière est 6 fois plus grande que celle de la rutine ( $17,353 \pm 0,307$ ). Ce résultat relève le fait que la naringine a un faible pouvoir anti-oxydant car il faudra une quantité importante de ce composé pour atteindre 50% d'inhibition de sa concentration initiale.

On observe également que la taxifoline et la rutine ont les IC50 les plus faibles et que leurs valeurs sont proches ( $15,631 \pm 0,449$  et  $17,353 \pm 0,307$  pour la taxifoline et la rutine respectivement). Il semble que ces deux molécules ont un pouvoir anti-oxydant élevé car leurs concentrations permettant d'inhiber 50% de la concentration initiale est faible. Cela reste à démontrer avec les deux autres tests.

Concernant les résultats obtenus par la méthode DPPH, on remarque là encore que la taxifoline ( $27,571 \pm 0,756$ ) et la rutine ( $15,411 \pm 0,387$ ) ont les IC50 les plus faibles. À l'inverse, la naringine et la naringénine ont des IC50 très élevées avec des valeurs de  $4277,926 \pm 965,554$  et  $7440,341 \pm 993,423$  respectivement. Cela signifie qu'elles ont un pouvoir anti-oxydant très faible. Il faudra une grande quantité de ces composés pour obtenir 50% d'inhibition de la quantité initiale de ces flavonoïdes.

Au sujet de la méthode de l'inhibition de la xanthine oxydase, la rutine est la molécule ayant l'IC50 la plus faible. Cela confirme les résultats précédents qui montrent que cette molécule a un pouvoir anti-oxydant supérieur à celui des molécules appartenant à la sous-classe des flavanones.

La mesure de l'IC50 de la naringénine, la naringine et la taxifoline a révélé des résultats presque identiques entre eux avec des concentrations inhibitrices comprises entre 250 et 273  $\mu\text{M}$ . Ces résultats sont contradictoires par rapport à ceux obtenus avec les autres méthodes. En effet, avec le test ABTS et DPPH, la taxifoline a un pouvoir anti-oxydant identique à celui de la rutine ce qui n'est pas le cas ici (250  $\mu\text{M}$  pour la taxifoline contre 170  $\mu\text{M}$  pour la rutine).

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse à ces résultats, il est nécessaire de s'intéresser à la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice sur la XO. C'est ce qu'ont fait Cos et ses collaborateurs à la fin des années 90 (95). Dans leur étude, ils ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production de l'acide urique par la XO. Leur étude a révélé que le groupe des flavonols auquel appartient la rutine est l'un des seuls groupes avec celui des flavones à pouvoir inhiber cette oxydoréductase. Cos *et al.* ont expliqué que les groupements hydroxyles en position 5 et 7 du cycle C, ainsi que la double

liaison en C2-C3 jouent un rôle important dans cette inhibition de l'enzyme. C'est le cas de la rutine qui possède ces éléments dans sa structure chimique. Cela explique donc le fait qu'elle ait une IC<sub>50</sub> plus faible que les autres car elle a un pouvoir anti-oxydant plus élevé.

À l'inverse, cette étude a montré que la sous-classe des flavanones (naringénine, naringine et taxifoline) n'est pas capable d'inhiber cette enzyme. Cette sous-classe présente une différence de structure par rapport aux flavonols.

Les flavanones ne possèdent pas la double liaison en C2-C3 qui, lorsqu'elle est présente, permet au cycle B d'être coplanaire avec les cycles A et C.

L'étude de Van Hoorn *et al.* menée au début des années 2000 (106) confirme les résultats de l'équipe de Cos en renforçant l'idée que la structure plane des flavonoïdes est essentielle à une inhibition efficace de la xanthine oxydase.

Il serait intéressant de compléter le travail obtenu en l'extrapolant à des flavonoïdes appartenant à d'autres sous-classes.

Néanmoins, le problème de solubilité est un facteur limitant à la réalisation de ces expériences, surtout pour les tests à la xanthine oxydase. De ce fait, les molécules étudiées sont diluées dans du tampon phosphate et peu de molécules présentent une affinité avec ce solvant.

L'objectif, à long terme au laboratoire, sera de trouver un flavonoïde dont le pouvoir anti-oxydant serait suffisamment élevé pour pouvoir l'étudier à l'aide de la technique de docking. Cette méthode permet d'étudier informatiquement les interactions enzyme-ligand tout en prenant en compte les propriétés physicochimiques, biologiques et les structures moléculaires dans une unité de temps et de lieu. Cela permet de prédire les orientations et les modes de liaisons privilégiés entre une protéine et un ligand dans un processus imitant la formation d'un complexe stable.

C'est ce qu'a réalisé l'équipe de Santi en 2018 (107) sur sept flavones isolées à partir d'un arbre de Nouvelle Calédonie, le *Gardenia Oudiepe*. Ils ont évalué la capacité de ces flavonoïdes à inhiber la XO et ont comparé les résultats avec ceux obtenus pour l'allopurinol. C'est le 3-methoxykaempferol qui s'est révélé être le flavonoïde le plus puissant avec une IC<sub>50</sub> de  $0,004 \pm 0,001 \mu\text{M}$  contre  $0,25 \pm 0,004 \mu\text{M}$  pour l'allopurinol.

L'étude de docking a, quant à elle, permis de localiser avec précision le site actif des flavonoïdes et déterminer les configurations spatiales préférentielles des molécules étudiées. Les résultats ont montré que les acides aminés Glu1261, Glu802 et Arg880 sont essentiels à une inhibition correcte de la xanthine oxydase. L'étude de docking a également permis de confirmer les hypothèses de Cos *et al* selon lesquelles les groupements hydroxyles en position 5 et 7 du cycle C ainsi que la double liaison C2-C3 du cycle B sont essentiels à une puissante inhibition de la XO.

Cependant, des études complémentaires telles que de la dynamique moléculaire sont essentielles pour obtenir une évaluation complète de l'interaction flavone-XO.

Cette étude a ouvert la voie à une méthode efficace permettant d'évaluer l'efficacité des flavonoïdes à inhiber la XO. Les études de docking permettent de déterminer quels flavonoïdes peuvent être considérés comme candidats idéaux dans le traitement de la goutte (impliquant l'inhibition de la XO). Il serait intéressant d'approfondir les recherches à l'ENSAIA avec cette étude de docking.

## 4. Conclusion générale et perspectives

Grâce à leurs nombreuses propriétés, les flavonoïdes représentent un intérêt majeur dans le domaine de la santé. De par leur pouvoir réducteur, les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres et ont donc un pouvoir antioxydant plus ou moins élevé (en fonction de leur structure) qu'il serait intéressant de valoriser en industrie pharmaceutique.

Dans ce but, de nombreux chercheurs se sont penchés sur le sujet et, depuis plusieurs années, les tests permettant de mesurer le pouvoir anti-oxydant des flavonoïdes se sont multipliés. Nous nous sommes intéressés à 3 de ces tests : ABTS, DPPH et inhibition de la xanthine oxydase. Cette dernière méthode nous a tout particulièrement intéressée car elle présenterait un intérêt pharmaceutique tout particulier. En effet, la xanthine oxydase est une enzyme qui est impliquée dans la goutte chronique. Elle induit la formation d'acide urique, provoquant de douloureuses crises articulaires aux malades. Actuellement, l'allopurinol est le traitement le plus répandu pour traiter cette maladie. L'allopurinol, une molécule appartenant à la famille des purines, est un puissant inhibiteur de la XO, diminuant ainsi la production d'acide urique. Malheureusement, son utilisation reste controversée car de nombreux patients ayant présenté des effets secondaires ont été relevés (éruption cutanée, hépatites toxiques, néphropathies). Une alternative à ce médicament serait l'utilisation de flavonoïdes dont certains présentent un fort pouvoir anti-oxydant.

L'étude du pouvoir anti-oxydant de la rutine, naringénine, naringine et taxifoline a révélé que c'est ce premier flavonoïde qui présente le plus fort pouvoir anti-oxydant. La comparaison de ces résultats avec des études déjà réalisées sur ce sujet montre que la rutine présente un fort pouvoir anti-oxydant de par sa structure chimique. Les groupements hydroxyles en position 5 et 7 du cycle C, ainsi que la double liaison en C2-C3 jouent un rôle important dans cette inhibition de l'enzyme. La rutine possède ces caractéristiques mais pas les 3 autres flavonoïdes étudiés.

Les résultats obtenus ne constituent qu'une ébauche à la mesure du pouvoir anti-oxydant des flavonoïdes. Il serait intéressant d'étayer ces résultats en étudiant d'autres flavonoïdes appartenant à d'autres sous-classes. Pour élargir la méthode à d'autres molécules, il serait nécessaire d'automatiser la méthode afin de gagner du temps. Le seul facteur limitant est la confrontation aux problèmes de solubilité. De ce fait, peu de flavonoïdes sont solubles dans le tampon phosphate.

Approfondir cette méthode permettrait de réaliser une banque de données répertoriant le pouvoir anti-oxydant de différents polyphénols. Un classement de ces résultats serait utile pour

identifier les molécules ayant les plus puissants pouvoirs anti-oxydants. Cela ouvrirait la voie à une étude de docking (107) en vue de comprendre le mode de liaison lors de la formation d'un complexe XO - flavonoïde le plus « actif ». Cette étude permettrait de trouver le meilleur « candidat » potentiel qui présenterait la meilleure alternative à l'allopurinol.

## Bibliographie

1. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 18 juin 1999;65(4):337-53.
2. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res.* 1 oct 2004;24(10):851-74.
3. Nijveldt RJ, van Nood E, Hoorn V, Ec D, Boelens PG, van Norren K, et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 1 oct 2001;74(4):418-25.
4. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem.* 10 nov 1968;243(21):5753-60.
5. Akaike T, Ando M, Oda T, Doi T, Ijiri S, Araki S, et al. Dependence on O<sub>2</sub>- generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice. *J Clin Invest.* 1 mars 1990;85(3):739-45.
6. Granger DN, McCord JM, Parks DA, Hollwarth ME. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology.* janv 1986;90(1):80-4.
7. Many A, Hubel CA, Roberts JM. Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *Am J Obstet Gynecol.* janv 1996;174(1):288-91.
8. Rundles W. Allopurinol in the Treatment of Gout. *Ann Intern Med.* 1 févr 1966;64(2):229.
9. Klinenberg JR. The Effectiveness of the Xanthine Oxidase Inhibitor Allopurinol in the Treatment of Gout. *Ann Intern Med.* 1 avr 1965;62:639.
10. Young JL. Severe Allopurinol Hypersensitivity: Association With Thiazides and Prior Renal Compromise. *Arch Intern Med.* 1 sept 1974;134(3):553.
11. Masuoka N, Matsuda M, Kubo I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. *Food Chem.* mars 2012;131(2):541-5.
12. Anthoni J, Lionneton F, Wieruszski J-M, Engasser J-M, Chebil L, Humeau C, et al. Investigation of enzymatic oligomerization of rutin. 2008;14.
13. Ramos S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem.* juill 2007;18(7):427-42.
14. Beecher GR. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J Nutr.* 1 oct 2003;133(10):3248S-3254S.
15. Williams CA, Grayer RJ. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep.* 2004;21(4):539.
16. Anthoni J. Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomères de flavonoïdes. [2007]: Lorraine;
17. Mladěnka P, Macáková K, Filipský T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem.* mai 2011;105(5):693-701.
18. Dwyer JT, Peterson JJ. Measuring flavonoid intake: need for advanced tools. *Public Health Nutr.* déc 2002;5(6a):925-30.
19. Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence. *J Med Food.* sept 2005;8(3):281-90.
20. Achat S. Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques [Internet]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00978529>
21. Košir IJ, Laporník B, Andrenšek S, Wondra AG, Vrhovšek U, Kidrič J. Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Anal Chim Acta.* juin 2004;513(1):277-82.
22. Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* [Internet]. 28 sept 2012 [cité 20 juin 2018];3. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3460232/>
23. Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol.*

juin 2002;5(3):218-23.

24. Chebil L, Chipot C, Archambault F, Humeau C, Engasser JM, Ghoul M, et al. Solubilities Inferred from the Combination of Experiment and Simulation. Case Study of Quercetin in a Variety of Solvents. *J Phys Chem B*. 30 sept 2010;114(38):12308-13.
25. Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* 1 févr 2005;89(2):191-8.
26. Benavente-García O, Castillo J, Del Baño MJ, Lorente J. Improved Water Solubility of Neohesperidin Dihydrochalcone in Sweetener Blends. *J Agric Food Chem.* janv 2001;49(1):189-91.
27. Tommasini S, Raneri D, Ficarra R, Calabò ML, Stanganelli R, Ficarra P. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal.* 16 avr 2004;35(2):379-87.
28. Boumendjel A, Mariette A-M, Bresson-Rival D, Perrier E. Hesperitin Esters: Highly Stable Flavanones with Both Free Radical Scavenging and Anti-Elastase Activities. *Pharm Biol.* 1 janv 2003;41(7):546-9.
29. So Jin Lee †, Jae-Cherl Kim †, Myo Jeong Kim †, Motomitsu Kitaoka ‡, Cheon Seok Park †, Su Yong Lee †, et al. Transglycosylation of Naringin by *Bacillus stearothermophilus* Maltogenic Amylase To Give Glycosylated Naringin [Internet]. 1999 [cité 23 juin 2018]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf990034u>
30. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 1 nov 2000;55(6):481-504.
31. Dey PM. *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press; 2012. 565 p.
32. Smith GJ, Thomsen SJ, Markham KR, Andary C, Cardon D. The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *J Photochem Photobiol Chem.* août 2000;136(1-2):87-91.
33. Ishihara K, Nakajima N. Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *J Mol Catal B Enzym.* sept 2003;23(2-6):411-7.
34. Mochizuki M, Yamazaki S, Kano K, Ikeda T. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* janv 2002;1569(1-3):35-44.
35. Ungar Y, Osundahunsi OF, Shimoni E. Thermal Stability of Genistein and Daidzein and Its Effect on Their Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem.* juill 2003;51(15):4394-9.
36. Makris DP, Rossiter JT. An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. *Food Chem.* mai 2002;77(2):177-85.
37. Friedman M, Jürgens HS. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem.* juin 2000;48(6):2101-10.
38. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* juin 1994;16(6):845-50.
39. Ursini F, Maiorino M, Morazzoni P, Roveri A, Pifferi G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic Biol Med.* mai 1994;16(5):547-53.
40. Brown EJ, Khodr H, Hider CR, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J.* 15 mars 1998;330(3):1173-8.
41. Marzena S, Mateusz K. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. 2012;7.
42. Ren J, Meng S, Lekka CE, Kaxiras E. Complexation of Flavonoids with Iron: Structure and Optical Signatures. *J Phys Chem B.* févr 2008;112(6):1845-50.
43. Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH. Procyanidin Content and Variation in Some Commonly Consumed Foods. *J Nutr.* 1 août 2000;130(8):2086S-2092S.
44. Cheng IF, Breen K. On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and

- quercetin, to suppress the fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals*. 1 mars 2000;13(1):77-83.
45. Fernandez MT, Mira ML, Florêncio MH, Jennings KR. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J Inorg Biochem*. 11 nov 2002;92(2):105-11.
46. Merken HM, Beecher GR. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *J Agric Food Chem*. mars 2000;48(3):577-99.
47. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1 janv 1996;20(7):933-56.
48. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémesy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 1 mai 2004;79(5):727-47.
49. Justesen U, Knuthsen P, Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. mars 1998;799(1-2):101-10.
50. Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *J Agric Food Chem*. mars 1997;45(3):590-5.
51. Kootstra A. Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol Biol*. 1 oct 1994;26(2):771-4.
52. Filkowski J, Kovalchuk O, Kovalchuk I. Genome stability of vtc1, tt4 and tt5 *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in protection against oxidative stress. *Plant J*. avr 2004;38(1):60-9.
53. Ebel J, Grisebach H. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*: a molecular analysis. *Trends Biochem Sci*. 1 janv 1988;13(1):23-7.
54. Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays*. 16(2):123-32.
55. Burbulis IE, Winkel-Shirley B. Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 26 oct 1999;96(22):12929-34.
56. Wasson AP, Pellerone FI, Mathesius U. Silencing the Flavonoid Pathway in *Medicago truncatula* Inhibits Root Nodule Formation and Prevents Auxin Transport Regulation by Rhizobia. *Plant Cell*. 1 juill 2006;18(7):1617-29.
57. Les étapes de la nodulation [Internet]. [cité 2 juill 2018]. Disponible sur: <http://biosol.free.fr/liens/rhizo2003/nodulation.htm>
58. Jacobs M, Rubery PH. Naturally Occurring Auxin Transport Regulators. *Science*. 15 juill 1988;241(4863):346-9.
59. Brown DE. Flavonoids Act as Negative Regulators of Auxin Transport in Vivo in *Arabidopsis*. *PLANT Physiol*. 1 juin 2001;126(2):524-35.
60. Peer WA, Murphy AS. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci*. déc 2007;12(12):556-63.
61. Murphy A, Peer WA, Taiz L. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*. 10 août 2000;211(3):315-24.
62. Shirley BW. Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci Res* [Internet]. déc 1998 [cité 2 juill 2018];8(04). Disponible sur: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0960258500004372](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0960258500004372)
63. Rajjou L, Debeaujon I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C R Biol*. oct 2008;331(10):796-805.
64. Verlangieri AJ, Kapeghian JC, el-Dean S, Bush M. Fruit and vegetable consumption and cardiovascular mortality. *Med Hypotheses*. 1 janv 1985;16(1):7-15.
65. Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. Cancer-Protective Factors in Fruits and Vegetables: Biochemical and Biological Background. *Pharmacol Toxicol*. 1993;72(s1):116-35.
66. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*. 23 sept 1983;221(4617):1256-64.
67. Rusznyák S, Szent-Györgyi A. Vitamin P: Flavonols as Vitamins. *Nature*. juill

- 1936;138(3479):27.
68. Ghedira K. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*. 1 août 2005;3(4):162-9.
69. Migdal C, Serres M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*. avr 2011;27(4):405-12.
70. Pasquier C. Stress oxydatif et inflammation. *Rev Fr Lab*. juin 1995;1995(276):87-92.
71. Defraigne JO, Pincemail J. Stress oxydant et antioxydant. *Rev Med Liège*. 2008;10.
72. Pessel F. Synthèse éco-compatible de flavonoïdes fonctionnalisés par le glucose comme antioxydants potentiels [Internet] [phdthesis]. Université Paris Sud - Paris XI; 2013 [cité 12 juill 2018]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00986261/document>
73. Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Rastija V, Lucic B, Trinajstic N. SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Curr Med Chem*. 1 mars 2007;14(7):827-45.
74. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. oct 2002;13(10):572-84.
75. Van Acker SABE, Van Den Berg D, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJF, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. janv 1996;20(3):331-42.
76. Wattenberg LW. Inhibition of Carcinogenesis by Minor Dietary Constituents. *Cancer Res*. 1 avr 1992;52(7 Supplement):2085s-2091s.
77. Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*. mai 2001;90(2-3):157-77.
78. Tosetti F, Ferrari N, De Flora S, Albini A. 'Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB J*. janv 2002;16(1):2-14.
79. Conney AH, Lu Y-P, Lou Y-R, Xie J-G, Huang M-T. Inhibitory Effect of Green and Black Tea on Tumor Growth. *Exp Biol Med*. 1 avr 1999;220(4):229-33.
80. Pilorget A, Berthet V, Luis J, Moghrabi A, Annabi B, Béliceau R. Medulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (-)epigallocatechin-3-gallate: EGCG Regulates β1 Integrin in Medulloblastoma. *J Cell Biochem*. 1 nov 2003;90(4):745-55.
81. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary Flavone Is a Potent Apoptosis Inducer in Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Res*. 15 juill 2000;60(14):3823-31.
82. Lamy S, Lafleur R, Bédard V, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, et al. Anthocyanidins inhibit migration of glioblastoma cells: Structure-activity relationship and involvement of the plasminolytic system. *J Cell Biochem*. 1 janv 2007;100(1):100-11.
83. FEDECARDIO | L'athérosclérose [Internet]. <https://www.fedecardio.org>. [cité 1 juin 2018]. Disponible sur: <https://www.fedecardio.org/Les-maladies-cardio-vasculaires/Les-pathologies-cardio-vasculaires/latherosclerose>
84. Hollman, Hertogt, Katan. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Bioact Compon Food*. 1996;
85. Baumann J, v. Bruchhausen F, Wurm G. Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins*. oct 1980;20(4):627-39.
86. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *J Pharmacol Sci*. 2004;96(3):229-45.
87. Li BQ, Fu T, Dongyan Y, Mikovits JA, Ruscetti FW, Wang JM. Flavonoid Baicalin Inhibits HIV-1 Infection at the Level of Viral Entry. *Biochem Biophys Res Commun*. sept 2000;276(2):534-8.
88. Li BQ, Fu T, Yan YD, Baylor NW, Ruscetti FW, Kung HF. Inhibition of HIV infection by baicalin--a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell Mol Biol Res*. 1993;39(2):119-24.
89. Huntley AL. Grape flavonoids and menopausal health. *Menopause Int*. 1 déc 2007;13(4):165-9.
90. Huntley AL. The health benefits of berry flavonoids for menopausal women: Cardiovascular disease, cancer and cognition. *Maturitas*. août 2009;63(4):297-301.
91. Zhang G, Qin L, Shi Y. Epimedium-Derived Phytoestrogen Flavonoids Exert Beneficial Effect on Preventing Bone Loss in Late Postmenopausal Women: A 24-Month Randomized,

- Double-Blind and Placebo-Controlled Trial. *J Bone Miner Res.* 9 avr 2007;22(7):1072-9.
92. Dalbeth N, Merriman TR, Stamp LK. Gout. *The Lancet*. oct 2016;388(10055):2039-52.
93. Pacher P. Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacol Rev.* 1 mars 2006;58(1):87-114.
94. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* juin 1994;16(6):845-50.
95. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, et al. Structure–Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *J Nat Prod.* 1 janv 1998;61(1):71-6.
96. SAFAS fabricant de Spectrophotomètres UV-Visible, VISIBLE, Absorption Atomique, Infra-Rouge, Spectrofluorimètres, Luminomètres, Lecteurs de microplaques multidétection, Elisa, Analyseurs [Internet]. [cité 31 juill 2018]. Disponible sur: <http://safas.com/?Spectrofluorimetre-pour&lang=fr>
97. Liang N, Kitts D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. Vol. 19. 2014. 19180 p.
98. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. *J Agric Food Chem.* 10 févr 2016;64(5):1028-45.
99. Ioannou I, Chaaban H, Slimane M, Ghoul M. Origin of the Variability of the Antioxidant Activity Determination of Food Material. In: Ekinci D, éditeur. Biotechnology [Internet]. InTech; 2015 [cité 30 juill 2018]. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/biotechnology/origin-of-the-variability-of-the-antioxidant-activity-determination-of-food-material>
100. Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Rev Génie Ind.* 1 janv 2009;4:25-39.
101. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J Agric Food Chem.* juin 2001;49(6):2774-9.
102. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1 mai 1999;26(9):1231-7.
103. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J.* 1 avr 2013;21(2):143-52.
104. Montoro P, Braca A, Pizza C, De Tommasi N. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chem.* 1 sept 2005;92(2):349-55.
105. Bergmeyer HU, Williamson DH, Gawehn K, éditeurs. Methods of enzymatic analysis. 2. engl. ed. Weinheim: Verl. Chemie [u.a.]; 1974.
106. Van Hoorn DE., Nijveldt RJ, Van Leeuwen PA., Hofman Z, M'Rabet L, De Bont DB., et al. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Eur J Pharmacol.* sept 2002;451(2):111-8.
107. Santi MD, Paulino Zunini M, Vera B, Bouzidi C, Dumontet V, Abin-Carriquiry A, et al. Xanthine oxidase inhibitory activity of natural and hemisynthetic flavonoids from Gardenia oudiepe (Rubiaceae) in vitro and molecular docking studies. *Eur J Med Chem.* janv 2018;143:577-82.

## Annexes

Annexe 1 : Résultats obtenus pour la Naringénine par la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la XO

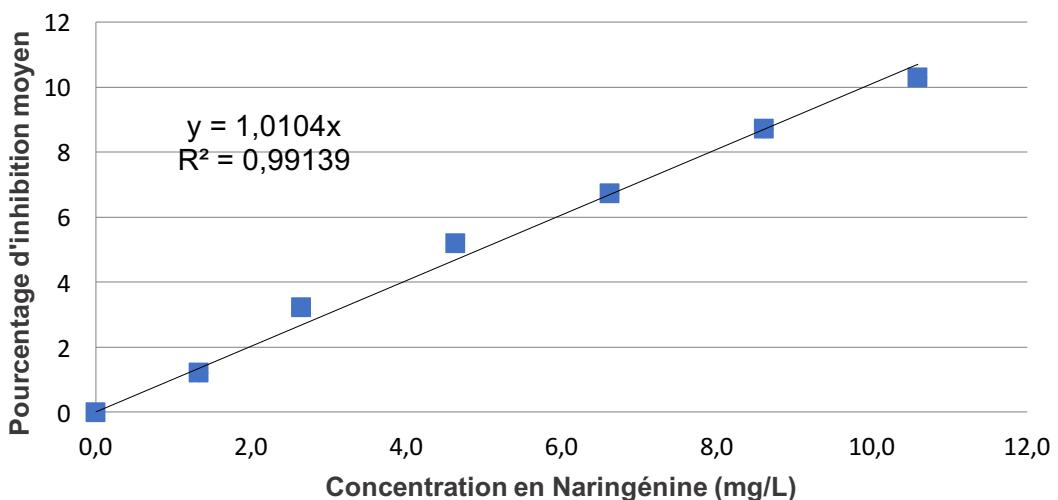


Figure 16 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Naringénine (mg/L) par la méthode ABTS

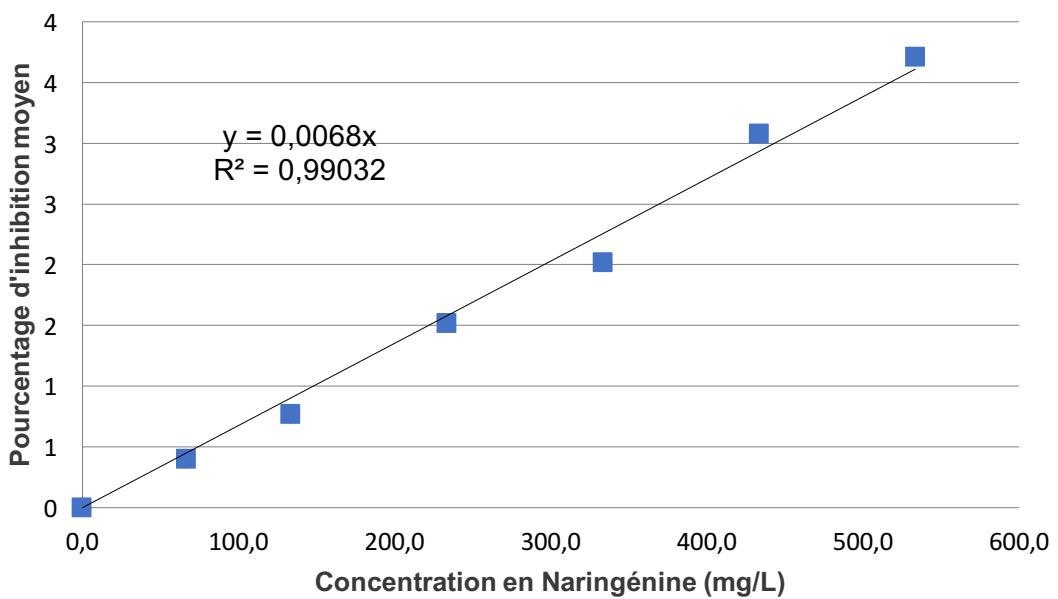


Figure 17 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Naringénine (mg/L) par la méthode DPPH

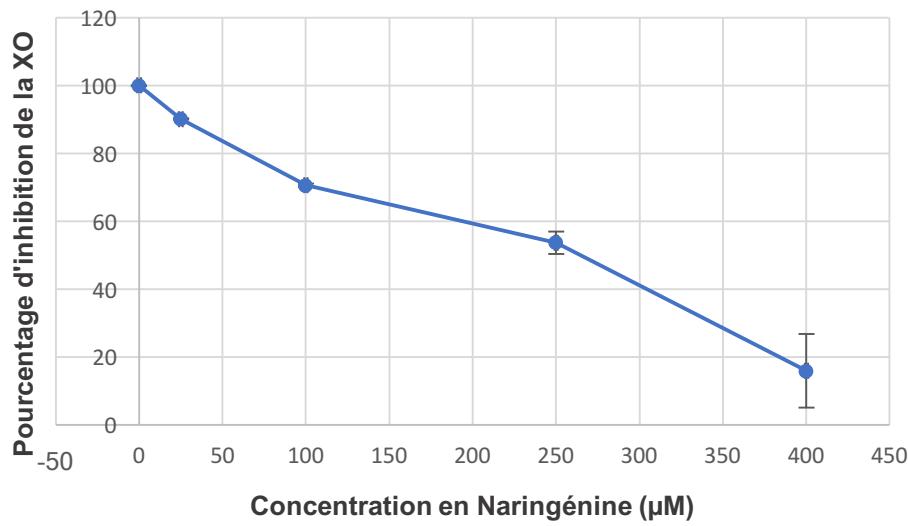


Figure 18 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la XO en fonction de la concentration en Naringénine (μM)

Tableau XII - Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la Naringénine

Méthode utilisée	Concentration solution utilisée (μM)	Pente de la droite moyenne (noté a)	IC50	Écart-type
ABTS	39,7	1,010	$\frac{50}{a} = 49,500$	0,795
DPPH	2001,1	0,007	7440,341	993,423
Inhibition XO	400		254	

Annexe 2 : Résultats obtenus pour la Naringine par la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la XO

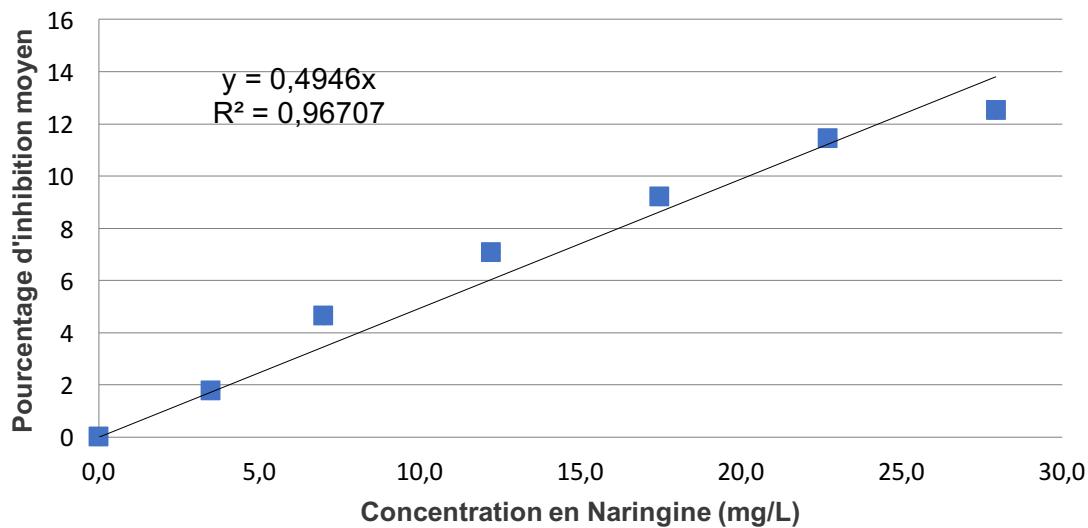


Figure 19 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Naringine (mg/L) par la méthode ABTS

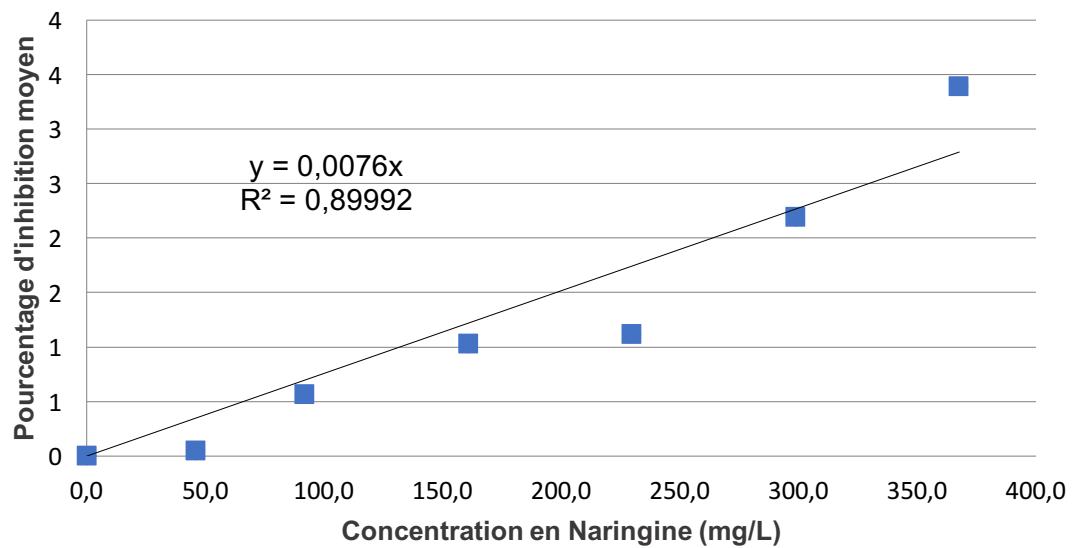


Figure 20 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Naringine (mg/L) par la méthode DPPH

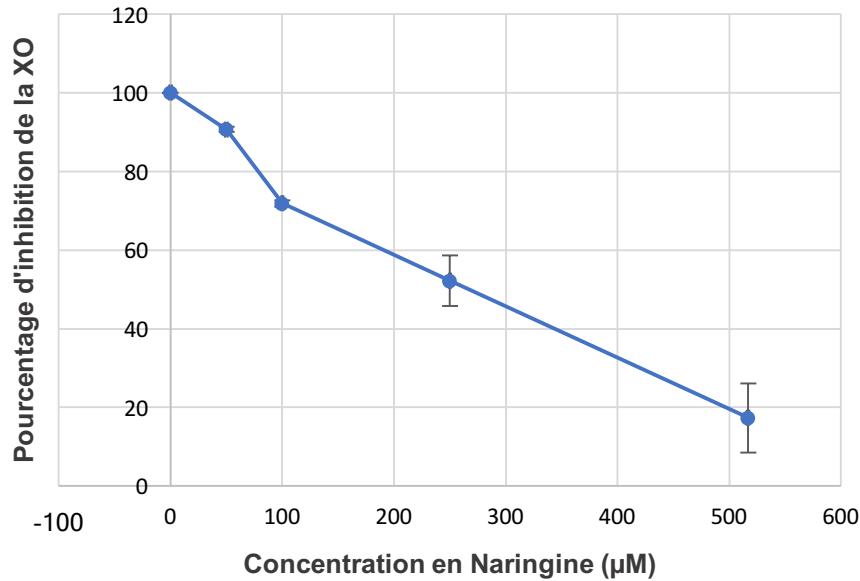


Figure 21 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la XO en fonction de la concentration en Naringine ( $\mu\text{M}$ )

Tableau XIII - Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la Naringine

Méthode utilisée	Concentration solution utilisée ( $\mu\text{M}$ )	Pente de la droite moyenne (noté a)	IC50	Écart-type
ABTS	104,72	0,495	$\frac{50}{a} = 101,352$	6,111
DPPH	1378,1	0,008	4277,926	965,554
Inhibition XO	517		273	

Annexe 3 : Résultats obtenus pour la Taxifoline par la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la XO

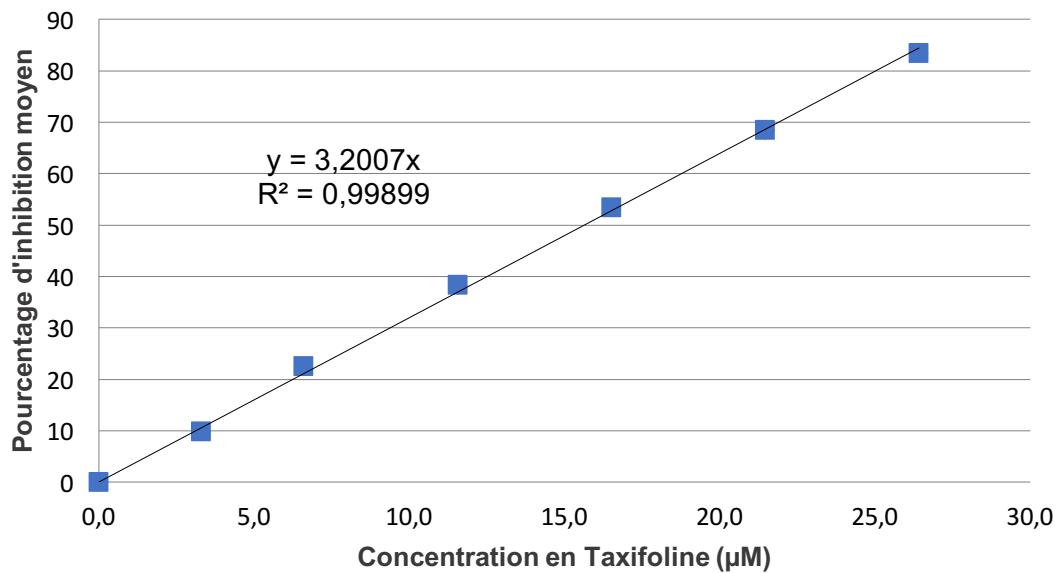


Figure 22 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Taxifoline ( $\mu\text{M}$ ) par la méthode ABTS

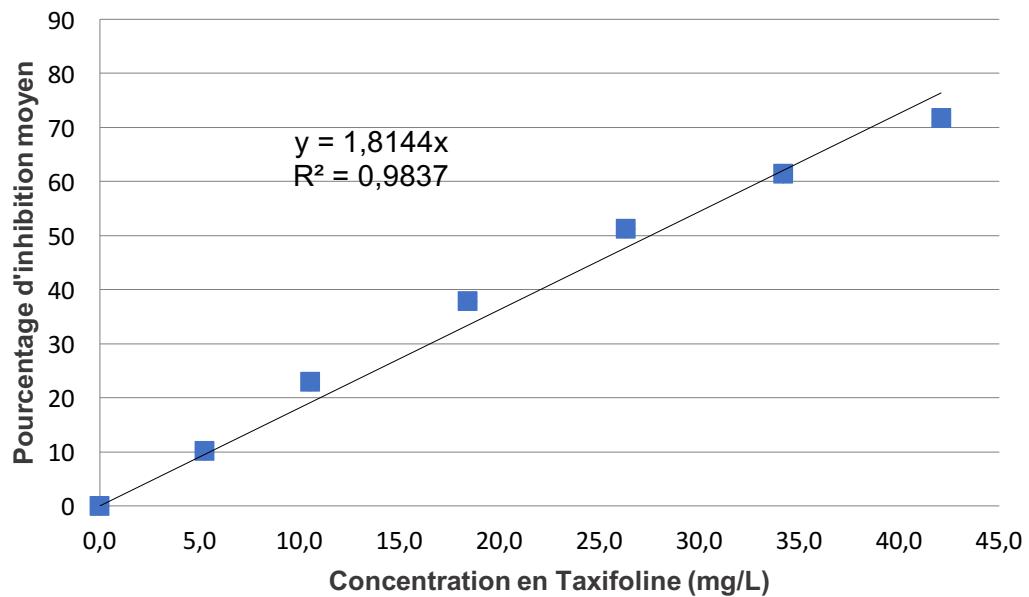


Figure 23 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Taxifoline (mg/L) par la méthode DPPH

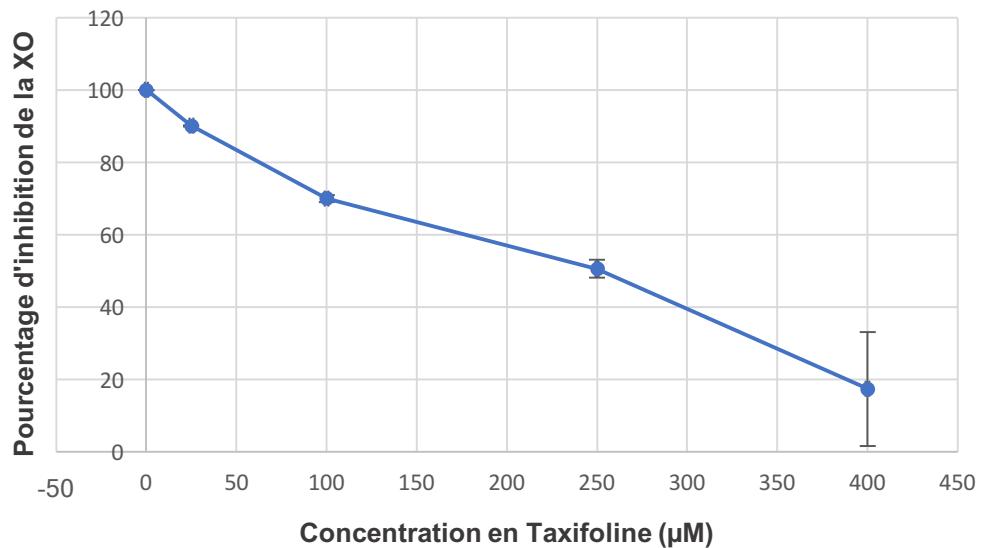


Figure 24 - Pourcentage d'inhibition de la XO en fonction de la concentration en Taxifoline ( $\mu\text{M}$ )

Tableau XIV - Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la Taxifoline

Méthode utilisée	Concentration solution utilisée ( $\mu\text{M}$ )	Pente de la droite moyenne (noté a)	IC50	Écart-type
ABTS	99	3,201	$\frac{50}{a} = 15,631$	0,449
DPPH	157,8	1,814	27,571	0,756
Inhibition XO	400	X	250	2,49

Annexe 4 : Résultats obtenus pour la Rutine par la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la XO

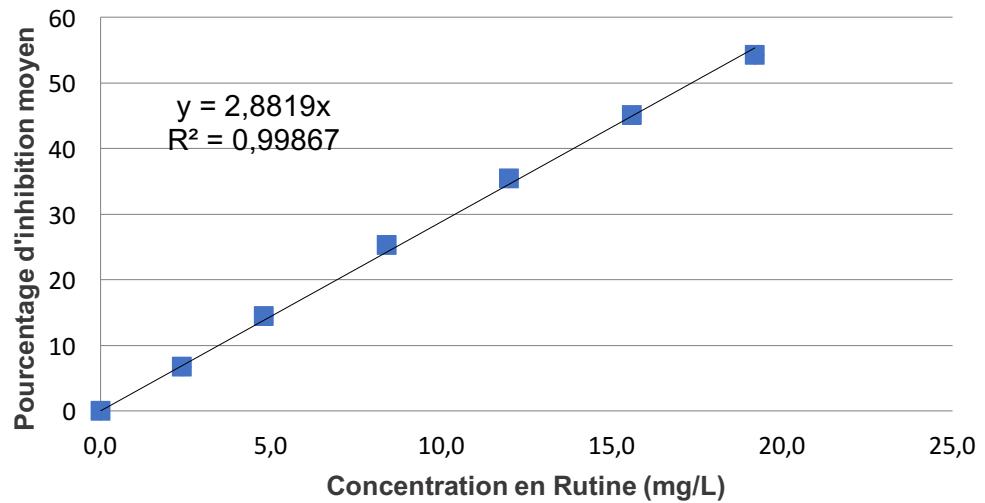


Figure 25 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Rutine (mg/L) par la méthode ABTS

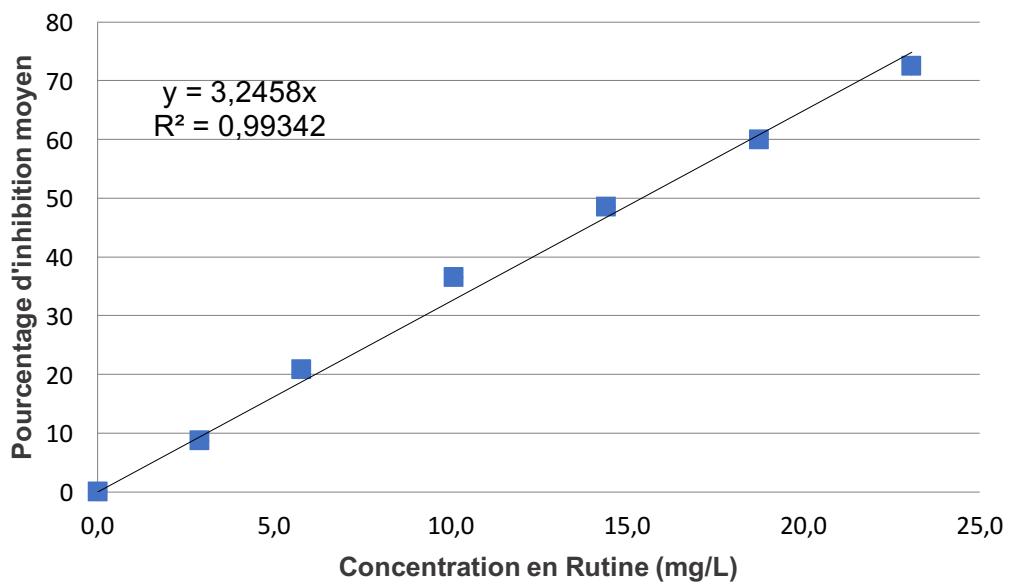


Figure 26 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition moyen en fonction de la concentration en Rutine (mg/L) par la méthode DPPH

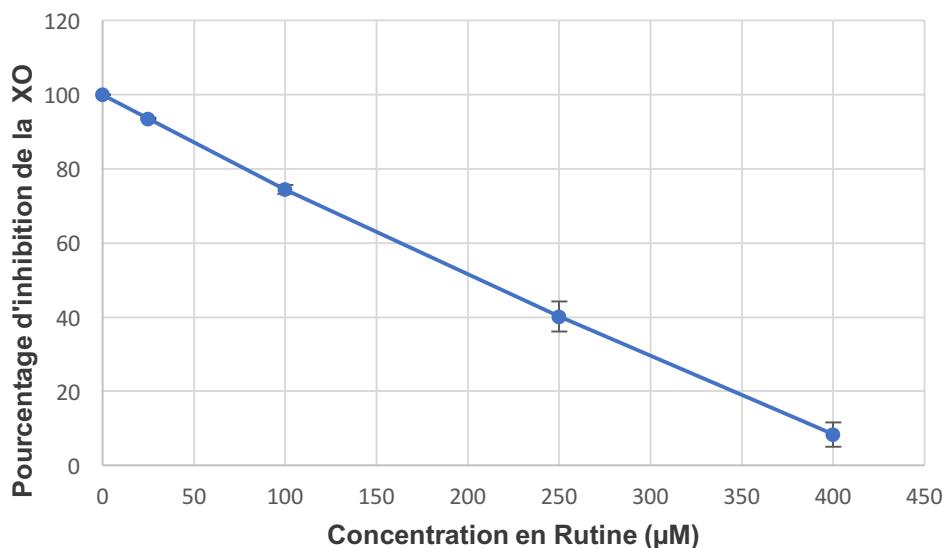


Figure 27 - Courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la XO en fonction de la concentration en Rutine ( $\mu\text{M}$ )

Tableau XV - Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la Rutine

Méthode utilisée	Concentration solution utilisée ( $\mu\text{M}$ )	Pente de la droite moyenne (noté a)	IC50	Écart-type
ABTS	72	2,882	$\frac{50}{a} = 17,353$	0,307
DPPH	86,5	3,246	15,411	0,387
Inhibition XO	400		170	

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : Vendredi 08 Février 2019

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE**

présenté par : Elise Emeraux

Sujet : « Propriétés biologiques des flavonoïdes: étude bibliographique et évaluation de l'activité antioxydante »Jury :Président : Mme. Dominique LAURAIN-MATTAR,  
Enseignant/ChercheurDirecteur : Mme. Dominique LAURAIN-MATTAR,  
Enseignant/ChercheurJuges : M. Michel LAGRANGE, Pharmacien  
Mme Rosella SPINA, Enseignant/Chercheur  
Mme Latifa, CHEBIL, Enseignant/ChercheurVu,  
Nancy, le 13/12/2018

Le Président du Jury &amp; Directeur de Thèse

Mme. Dominique LAURAIN-MATTAR.

Vu et approuvé,

Nancy, le 7.01.2019

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université de Lorraine,

Vu,

Nancy, le 10 JAN. 2018

Le Président de l'Université de Lorraine,



Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 10592

N° d'identification : 10592

**TITRE**

PROPRIETES BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ET  
EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Thèse soutenue le Vendredi 08 Février 2019

Par Elise EMERAUX

**RESUME :**

Les flavonoïdes sont largement répandus dans le règne végétal. Ils sont connus pour leur puissant pouvoir anti-oxydant *in vitro* mais également leurs nombreuses autres propriétés biologiques : vasculo-protectrice, anti-inflammatoire, antibactérienne, anti-tumorale etc. L'objectif premier de ce travail est d'établir une synthèse bibliographique des connaissances actuelles des flavonoïdes (structure, biosynthèse, propriétés physico-chimiques et biologiques). Dans un second temps, l'objectif est de mesurer l'activité anti-oxydante de 4 flavonoïdes : rutine, naringénine, naringine et taxifoline appartenant à 2 sous-classes différentes. Leur pouvoir anti-oxydant a été évalué à l'aide de trois méthodes différentes : la méthode ABTS, DPPH et l'inhibition de la xanthine oxydase (XO). Cette enzyme, génératrice de radicaux libres, est notamment impliquée dans la goutte chronique. Actuellement, le traitement le plus largement utilisé pour la goutte chronique est l'allopurinol. Son utilisation reste décriée car des études ont révélé que cet antigoutteux pouvait provoquer de graves réactions cutanées (allergies, éruption cutanée, syndrome de Lyell). Les scientifiques sont à la recherche d'alternatives à ce médicament et la piste des flavonoïdes est privilégiée. Les résultats obtenus en laboratoire, qui corroborent avec ceux de la littérature, ont montré que la rutine présente le plus fort pouvoir anti-oxydant. Cela s'explique par la présence de groupements chimiques que les autres molécules étudiées n'ont pas. L'objectif à long terme est d'étendre les résultats à d'autres sous-classes de flavonoïdes et de les classer en fonction de leur pouvoir anti-oxydant. Une relation structure-activité pourra être réalisée sur les flavonoïdes les plus puissants pour trouver un candidat potentiel pouvant remplacer l'allopurinol.

**MOTS CLES :** flavonoïdes, anti-oxydant, goutte chronique, allopurinol, relation structure-activité

<b>Directeur de thèse</b>	<b>Intitulé du laboratoire</b>	<b>Nature</b>	
Madame Dominique LAURAIN-MATTAR	UMR 7053-L2CM Faculté de Pharmacie de Nancy	Expérimentale Bibliographique Thème	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 5

<b>Thèmes</b>	<b>1 – Sciences fondamentales</b> <b>3 – Médicament</b> <b>5 - Biologie</b>	<b>2 – Hygiène/Environnement</b> <b>4 – Alimentation – Nutrition</b> <b>6 – Pratique professionnelle</b>
---------------	---	--