



HAL
open science

Oligomérisation enzymatique de flavonoïdes et évaluation des activités biologiques des oligomères synthétisés

Ghada Ben Rhouma-Martin

► **To cite this version:**

Ghada Ben Rhouma-Martin. Oligomérisation enzymatique de flavonoïdes et évaluation des activités biologiques des oligomères synthétisés. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0017 . tel-01749905

HAL Id: tel-01749905

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749905v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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-theses-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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Université de Monastir

École Doctorale de Monastir

Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir

Unité de Recherche Pharmacognosie/Biologie Moléculaire et Cellulaire



Université de Lorraine

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

École Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat en « Sciences Biologiques et Biotechnologies »

et

Doctorat en « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

Présentée par: Ghada BEN RHOUMA-MARTIN

Oligomérisation enzymatique de flavonoïdes et évaluation des activités biologiques des oligomères synthétisés

Travaux réalisés dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre l'institut Supérieur de Biotéchnologie de
Monastir et l'institut Nationale Polytechnique de Lorraine

Soutenue publiquement le 11 Février 2013 devant la commission d'examen

Président : Mr. Kamel Ghedira (Professeur à la faculté de Pharmacie de Monastir)

Rapporteurs : Mr. Naceur Slimane (Professeur à la faculté de Médecine de Monastir)

Mme Florence Husson (Maître de conférences à l'Université de Bourgogne)

Examineurs : Mme Latifa Chebil (Maître de conférences à l'ENSAIA-Université de Lorraine)

Directeurs : Mr. Mohammed Ghoul (Professeur à l'ENSAIA- Université de Lorraine)

Mme Leila Chekir-Ghedira (Professeur à la faculté de médecine dentaire de Monastir)



Année Universitaire 2012-2013



Dédicaces

A mes parents Néji et Najwa, pour votre amour, votre patience et votre générosité, pour tous les efforts que vous avez consentis en ma faveur. J'espère avoir été digne de votre affection et de votre confiance. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma grande reconnaissance et de mon éternel amour. Que Dieu vous donne longue vie et bonne santé. Soyez assurés de ma grande gratitude et de ma sincère reconnaissance pour le soutien moral et matériel que vous m'avez généreusement offert.

A mon mari Hugo, je te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi, tu as toujours été là pour me remonter le moral quand je ne vais pas bien, tu as dû me supporter et me soutenir durant toutes ces années. Merci pour tout mon amour, je t'aime de tout mon cœur, même si tu n'as pas su corriger mes fautes d'orthographe !!!

A Ma belle mère Jocelyne, qui m'a corrigée mon orthographe, qu'est ce que j'aurais fait sans toi ? T'as vraiment su être une deuxième mère pour moi, tu as toujours su reconforter. Tes sourires permanents ont toujours dissipé ma fatigue et doubler mon énergie.

A ma fidèle amie Chirine, c'est vrai que je n'ai pas de sœur ; mais tu as toujours été la sœur que je n'ai pas eue et celle qui m'a sans cesse soutenue dans les moments les plus délicats en m'inspirant un nouveau souffle et un nouvel élan. Je te remercie car tu as été toujours à côté de moi.

*A tous ceux qui ont une place dans mon cœur et surtout mes frères : **Amine** (le sage), **Marouan** (le beau gosse) et **Souhaib** (le fêtard), je vous aime très fort.*

Remerciement

C'est avec grand respect et gratitude que je transmets mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à avoir l'opportunité de réaliser ma thèse dans de si bonnes conditions.

*Je veux tout d'abord remercier particulièrement **Ma directrice de thèse, Madame Leila Chekir-Ghedira** Professeur à la Faculté de Biologie Moléculaire et cellulaire à la faculté de Médecine dentaire de Monastir, d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils, je lui adresse également mes remerciements distingués de m'avoir consacré son temps précieux, pour ses critiques constructives, son enthousiasme et ses qualités personnelles et professionnelles. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.*

*À mon directeur de thèse, **Monsieur Mohamed Ghouf**, Professeur à l'école nationale supérieure d'agronomie et des Industries alimentaires. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir soutenu durant toutes ces années. Votre intérêt, votre curiosité, votre rigueur, votre compétence ainsi que votre disponibilité ont été des éléments indispensables pour la réalisation de ce travail. Je tiens ici à vous exprimer toute ma reconnaissance pour ces années de travail au sein du votre laboratoire, vous m'avez appris à être plus rigoureuse et plus curieuse dans le travail. Je vous suis également très reconnaissante pour le travail que vous avez fourni pour la recherche scientifique et ainsi nous permettre à nous les étudiants de continuer sans soucis nos travaux*

À ma co-directrice de thèse, Madame le docteur Latifa Chebil, Je vous exprime mes sincères remerciements pour les discussions enrichissantes que nous avons eu à plusieurs reprises sur les parties de la thèse, qui m'a permis d'améliorer mes connaissances et de faire progresser mon travail. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour les conseils éclairés et votre disponibilité qui m'ont permis d'élaborer ce travail. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour vos qualités scientifiques et humaines.

À Monsieur le professeur Kamel Ghedira, Je vous remercie tout d'abord pour m'avoir permis d'être membre de votre unités de recherche, de même que pour vos judicieux conseils et l'aide précieuse que vous m'avez apportée lors de mes recherches. Vos hautes qualités humaines, l'étendue de votre patrimoine scientifique et votre sérieux qui ont toujours suscité mon profond respect. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde gratitude et d'un très grand respect.

Je tiens également à remercier l'Institut Française de Coopération (IFC) de m'avoir fournis une bourse, ce qui m'a permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions.

Je remercie également Monsieur Hassen Bacha, Madame Safwa Abid et tout les membres du Laboratoire de recherche sur les substances biologiquement compatibles de m'avoir accueil au sein de leurs laboratoire et pour leur précieuse aide.

Je remercie aussi Monsieur Naceur Slimane, professeur à la faculté de médecine de Monastir, Madame Florence Husson, maître de conférences à l'Université de Bourgogne, pour l'immense honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail, je vous exprime mon admiration pour votre modestie et votre disponibilité. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma reconnaissance et un témoignage de ma haute considération

Enfin je présente mes remerciements les plus distingués à tous les techniciens et mes collègues qui ont contribué au bon fonctionnement des laboratoires dans lesquels j'ai évolué : Céline Charbonel, Mounira Krifa, Ines Bouhlel, Ines Skandrani, Jihed Boubaker, Nadia Mustapha, Soumaya Kjlani, Imen Chouik, Nouha Nasr, Zied Ghedira, Wissem Bhourri, Fadwa Chaabane, Imen Mokded, Ahmed Bedoui, Aicha Sassi.

Abréviations

\overline{M}_n	Masse moléculaire moyenne en nombre
\overline{M}_w	Masse moléculaire moyenne en poids
ABTS	3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
ATR	Cristal à réflexion totale atténuée
B_0	Champ magnétique
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i> , RMN 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$, couplage scalaire
DMF	Diméthylformamide
DOSY	Spectroscopie RMN par ordre de diffusion
DPPH	1-diphenyl-2-picrylhydraxyl
EDTA	Acide EthyleneDiamineTetraAcétique
FTIR	Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i> : 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, couplage scalaire
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HRP	<i>Horseradish</i> peroxydase : peroxydase de raifort
IC50	Concentration aboutissant à 50% de l'activité détectée
I_m	Indice de masse moléculaire moyenne en poids
IR	Rayonnement infra-rouge
J	Constante de couplage en RMN
Log P	Coefficient de partition octanol/eau
MM	Masse molaire (g/mol)
PDI	Polydispersité
PS	Polystyrène
RMN	Résonance magnétique nucléaire
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , espèce radicalaire portée par l'oxygène
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> , chromatographie par exclusion de taille
T	Température

Sommaire

Abréviations	5
Introduction	1
Chapitre bibliographique	5
I. Les flavonoïdes	5
1. Définition et structure des flavonoïdes	5
2. Classification des flavonoïdes	6
3. Biosynthèse des flavonoïdes	8
4. Substitutions de squelette flavonique	10
4.1. L'hydroxylation	10
4.2. La méthylation	10
4.3. La glycosylation	11
4.4. La C-méthylation	13
5. Distribution et localisation des flavonoïdes	13
6. Propriété physico-chimiques des flavonoïdes	14
6.1. La solubilité des flavonoïdes	14
6.2. La stabilité des flavonoïdes	16
6.3. Absorption des rayons UV par les flavonoïdes	17
7. Pharmacologie des flavonoïdes	19
7.1. La biodisponibilité	19
7.2. Pharmacocinétique	19
8. Absorption et métabolisme de la rutine	20
9. Propriétés pharmacologique des flavonoïdes	21
9.1. Effets protecteurs vasculaires (propriétés vitaminiques « P »)	21
9.2. Propriétés anti-inflammatoires et immunologiques	22
9.3. Propriétés antivirales et antibiotiques	22
9.4. Propriétés antinéoplasiques	23
9.5. Activité antioxydante des flavonoïdes	24
9.6. Propriété pro-oxydante des flavonoïdes	29
9.7. Propriétés antihépatotoxiques	30
9.8. Activité anti-ulcérogène	30
9.9. Activité antibactérienne et antivirale	31
II- Les coumarines	31
1. Définition des coumarines	31
2. Distribution et localisation des coumarines	31
3. Structure et classification	32
4. Propriétés physico-chimiques	34
5. Absorption et métabolisme chez l'homme	35
6. Utilisations et activités biologiques	36
III- Polymérisation enzymatique des flavonoïdes et des coumarines	38
III.1. Mécanisme de la polymérisation enzymatique par des oxydoréductases	38
III.1.1. Les laccases	38
III.1.2. Les peroxydases	41
III.2. L'effet des conditions opératoires sur la polymérisation	43
III.2.1. Effet du type, de l'origine et de la concentration de l'enzyme sur la polymérisation	44
III.2.2. Effet du pH	50

III.2.5. Effet du solvant sur la polymérisation.....	53
III.3. Type de pontage mis en évidence au cours de la polymérisation enzymatique	54
Matériels et Méthodes	59
A. Matériels.....	59
I. Matériels biologiques.....	59
I.1. Bactéries utilisées.....	59
I.2. Lignées cellulaires utilisées	60
III. Composition des milieux de culture et des tampons	60
IV- Mutagènes et génotoxiques de références utilisés	63
IV. 1. Le méthyle méthane sulfonate	63
IV.2. Le 2-aminoanthracène.....	64
IV.3. Le peroxyde d'Hydrogène (H ₂ O ₂)	64
B- Méthode.....	65
I. Conduite de l'oligomérisation.....	65
II. Séparation des oligomères par filtration tangentielle	65
II.1. Protocole.....	66
III. Méthodes analytiques.....	66
III.1. Analyse des flavonoïdes et de leurs oligomères par chromatographie d'exclusion stérique	66
IV. Analyses par spectre infrarouge des flavonoïdes et de leurs fractions d'oligomères	69
IV.1. Principe	69
IV.2. Matériels et protocole.....	69
V. Analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des monomères et de leurs fractions d'oligomères.....	70
V.1. Principe.....	70
V.2. RMN COSY ¹ H - ¹ H (Correlated spectroscopy).....	70
V.3. RMN HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)	71
V.4. RMN HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation).....	72
V.5. Protocole.....	72
VI. Etude de la solubilité.....	72
VII. Etude des activités biologiques à l'aide de systèmes procaryotes	72
VII.1. Méthode générale de culture bactérienne	73
VII.2. Méthode d'étude de l'activité mutagène directe et indirecte à l'aide du test d'Ames	76
VII.3. Méthode d'étude de l'activité antimutagène directe et indirecte à l'aide du test d'Ames	78
VIII. Etude des activités antioxydantes et antiradicalaires.....	79
VIII.1. Etude de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	79
VIII.2. Etude de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical ABTS ^{•+}	80
VIII.5. Méthode d'étude de l'activité antioxydante à travers la capacité de réduire le cuivre d'établir l'équilibre Redox, à l'aide de test CUPRAC	88
VIII.5.1. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)	88
IX. Etude des activités biologiques à l'aide de systèmes eucaryotes.....	88
IX.1. Méthode générale de culture cellulaire. Culture et entretien des lignées cellulaires	88
IX.1.2. Repiquage des cellules	89
IX.1.3. Numération cellulaire au bleu de trypan	89
IX.1.4. Conservation des cellules.....	90

IX.2. Méthode d'étude de l'influence des monomères et leurs fractions d'oligomères testées sur la viabilité cellulaire en utilisant le test de réduction de Formazan : 3(4,5 dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)	90
IX.2.1. Evaluation de la cytotoxicité par le test au 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)	91
IX.2.2. Traitement des cellules.....	92
IX.3. Méthode d'étude de l'effet des monomères et de leurs fractions d'oligomères testés sur l'ADN nucléaire des cellules K562: Test des comètes	92
IX.3.1. Traitement des cellules.....	93
IX.3.2. Inclusion des cellules dans le gel d'agarose 1%	93
IX.3.3. Lecture et analyse des résultats	94
IX.4. Etude de l'activité immunomodulatrice des monomères et de leurs fractions d'oligomères.....	96
IX.4.1. Etude de l'effet de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur la prolifération des splénocytes	96
IX.4.2. Etude de l'effet de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur la prolifération de macrophages	98
Résultats et Discussion.....	103
Partie I : Oligomérisation enzymatique de la rutine et de l'esculine.....	103
I. Oligomérisation enzymatique de la rutine et de l'esculine	103
I.1. Séparation des oligomères	105
I.2. Analyse de la structure des fractions d'oligomères obtenus	106
I.2.1. Analyses Ultraviolet des oligomères.....	107
I.2.2. Analyse FTIR (Infrarouge à Transformée de Fourier) des fractions d'oligomères	107
I.2.3. Les analyses par résonance magnétique nucléaire du proton (¹ H-RMN) des oligomères obtenus.....	108
Partie II- Etude de la solubilité des oligomères obtenus	114
Partie III- Etudes des activités biologiques des oligomères obtenus.....	119
I. Etude des activités mutagène et antimutagène à l'aide de test d'Ames.....	119
I.1. Vérification des caractéristiques des souches utilisées	119
I. 1.1. Besoin en histidine	119
I. 1.2. Caractère « deep rough » (rfa)	119
I.1.3. Résistance à l'ampicilline et à la tétracycline	120
I.1.4. Test aux rayons ultraviolets	120
I.1.5. Le taux de réversions spontanées.....	120
I.2. Etude de l'activité mutagène à l'aide du test d'Ames.....	120
I.3. Etude de l'activité antimutagène à l'aide du test d'Ames.....	121
I.3.1. Etude de l'activité antimutagène directe.....	122
I.3.2. Etude de l'activité antimutagène indirecte vis-à-vis du 2-aminoanthracène (2-AA)	124
II. Etude de l'activité cytotoxique des fractions d'oligomères de rutine et d'esculine	128
III. Etude des activités génotoxique et antigénotoxique de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur un système eucaryote à l'aide du test des comètes.....	130
III.1. Etude de l'activité génotoxique.....	130
III.2. Etude de l'activité antigénotoxique des molécules testées vis-à-vis d'un génotoxique ; le H ₂ O ₂ à l'aide du test des comètes.....	132
Partie IV- Etude des activités antiradicalaire et antioxydante.....	136
I. Evaluation de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH [•] de la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères	136

II. Evaluation de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical ABTS de la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères	137
III. Etude du pouvoir piègeur du radical hydroxyle et du pouvoir chélateur du fer par la rutine, l'esculine et de leurs fractions d'oligomères.....	139
III.1. Etude du pouvoir piègeur directe du radical hydroxyle	139
III.2. Etude du pouvoir chélateur de fer par la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères.....	141
IV. Etude du pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase, de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères.....	142
V. Test de la capacité antioxydante évaluée à l'aide du test de réduction du cuivre : test (CUPRAC)	144
Partie V. Activité immunomodulatrice	147
I. Etude de l'effet de la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères sur la prolifération des splénocytes.....	147
I.1. Etude de l'effet de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur la prolifération des splénocytes en absence de mitogènes	147
I.2. Etude de la prolifération des splénocytes en présence du mitogène lipopolysaccharidique (LPS)	149
I.3. Etude de la prolifération des splénocytes en présence la lectine	150
II. Etude de l'effet de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomère sur l'induction des macrophages	153
II.1. Effet sur la production de monoxyde d'azote (NO)	153
II.2. Effet de la rutine de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur l'activité lysosomale.....	156
Conclusion.....	167
References bibliographique.....	174
Annexes	196

INTRODUCTION

Introduction

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les composés phénoliques notamment les flavonoïdes et les coumarines. Ces derniers ont été particulièrement étudié en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

Les flavonoïdes et les coumarines sont des métabolites secondaires des plantes où ils interviennent comme filtre UV et comme agent de protection contre des organismes pathogènes. Ils sont apportés au niveau de l'organisme grâce à la consommation des fruits, des légumes, des céréales et de boissons.

Les composés phénoliques interviennent dans le mécanisme d'oxydo-réduction. L'oxydo-réduction est le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome vers un autre. Un tel processus est nécessaire pour notre organisme, puisque l'oxygène est l'accepteur ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP.

Cependant, dans le cas où il y a transfert d'un nombre d'électrons impair, nous assistons à la formation d'espèces toxiques appelées radicaux libres. Parmi ceux-ci, peuvent être cités les radicaux peroxydes (ROO^\bullet), alcoxydes (RO^\bullet), superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et hydroxydes (HO^\bullet). Ces radicaux libres centrés sur l'oxygène sont reconnus par leur grande réactivité et font partie des espèces oxygénées réactives (ROS). Il a été démontré que les ROS oxydent les lipides, les protéines, les enzymes et l'ADN. Ces dommages oxydatifs sont considérés comme la cause principale de nombreuses maladies dégénératives telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer.

Pour lutter contre les radicaux libres nocifs, notre organisme possède des systèmes de défense antioxydants. Certains sont endogènes, alors que d'autres sont obtenus à partir de molécules apportées par l'alimentation (exogènes). Le système endogène est formé par des enzymes tels que la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD).

A cause des agents externes comme les polluants de l'air, les radiations UV et l'alcool, les radicaux libres peuvent être produits en excès. De ce fait, notre système endogène de défense se trouve incapable de réduire toutes ces espèces réactives. Pour diminuer ces dommages oxydatifs, notre organisme a alors besoin d'une alimentation riche en antioxydants exogènes. Parmi ces antioxydants, on trouve les vitamines C, E et A, ainsi que les composés phénoliques.

Les flavonoïdes et les coumarines ont fait l'objet de plusieurs travaux, qui ont mis en évidence leurs effets bénéfiques sur la santé tels que leurs rôles protecteurs contre les inflammations, les allergies, les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les infections bactériennes et virales, ainsi que la stimulation du système immunitaire. Ces effets sont reliés à leur pouvoir antioxydant et inhibiteur d'enzymes intervenant dans le système oxydatif.

Cependant, l'utilisation de ces molécules dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire se heurte à leur faible solubilité dans la plupart des solvants. Plusieurs réactions ont été décrites dans la littérature pour améliorer leur utilisation. Ces techniques reposent essentiellement sur la fonctionnalisation des flavonoïdes. Ainsi, la polymérisation des flavonoïdes est une des voies intéressantes et prometteuses pour remédier à leurs inconvénients. D'autres réactions comme l'acylation, la glycosylation, ou l'hydroxylation ont été également citées. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la polymérisation enzymatique des flavonoïdes. Cette technique consiste en l'initiation d'une chaîne radicalaire qui en se propageant va permettre la polymérisation d'unités monomériques. Cette voie de fonctionnalisation peut être réalisée par voie chimique ou enzymatique. La voie enzymatique

présente les avantages, d'apporter une certaine régio-sélectivité et d'être effectuée en conditions douces de pH et de température.

La littérature montre que la polymérisation des composés phénoliques affecte leurs propriétés biologiques et structurales (Anthoni et al., 2010 ; Anthoni et al., 2008 ; Desentis-Mendoza et al., 2006; Kurisawa et al., 2003a,b). Les études réalisées jusqu'à présent, indiquent que l'effet de la polymérisation sur les propriétés des composés phénoliques, notamment les propriétés antioxydantes, la solubilité et la stabilité thermique, est très variable. Selon le substrat, le type d'enzyme, le mode de synthèse et les conditions réactionnelles, les propriétés des polymères seront accrues, identiques ou diminuées par rapport aux propriétés du monomère.

Dans l'objectif de comprendre l'effet de l'oligomérisation de rutine et d'esculine sur leurs activités biologiques, notre travail a été orienté selon les axes suivants :

Dans un premier temps, l'oligomérisation de la rutine et de l'esculine a été réalisée dans un mélange d'eau/méthanol (70 :30 v/v) à 20°C par la laccase de *Trametes versicolor*.

Dans un second temps, nous avons essayé d'identifier la structure des oligomères obtenus. Le nombre, le type et la localisation du pontage reliant les unités monomériques ont été analysés par spectrophotométries dans l'ultraviolet et dans l'infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et par résonance magnétique nucléaire (RMN)..

Nous avons également étudié la solubilité des oligomères obtenus dans la mesure où il est important d'évaluer l'effet de l'oligomérisation sur ce paramètre.

Nous avons ensuite évalué l'effet des oligomères obtenus sur la croissance d'une lignée de cellule leucémiques humaine K562, ainsi que leurs effets sur la formation de radicaux *in vitro* , en absence de système cellulaire :

- ✓ vis-à-vis du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•])
- ✓ vis-à-vis du radical 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS[•])
- ✓ vis-à-vis du radical hydroxyle à l'aide de test au déoxyribose

- ✓ leur pouvoir chélateur de fer à l'aide de test au déoxyribose

- ✓ leur capacité de moduler le système redox, en évaluant la réduction du cuivre: test CUPRAC.

- ✓ leur capacité d'inhiber la xanthine oxydase, enzyme qui catalyse l'élimination de la xanthine toxique par la cellule sous forme d'acide urique, avec formation d'anion superoxyde.

Dans la mesure où notre travail tend à faire valoir un éventuel intérêt thérapeutique des oligomères obtenues nous avons tout d'abord évalué leurs génotoxicité avant d'entreprendre toutes autres étapes de cette étude.

Les tests de génotoxicité utilisés s'étant révélé négatifs, nous avons entrepris différentes autres expérimentations entre autres la recherche d'une éventuelle antigénotoxicité de ces molécules vis-à-vis d'un panel de substances génotoxiques voire cancérigènes, et ce à l'aide de tests procaryote; « test d'Ames » et eucaryote ; test des « comètes ».

En fin l'effet immunomodulateur des oligomères obtenus à été étudié en se focalisant sur :

- ✓ l'effet des oligomères sur la prolifération des splénocytes

- ✓ l'effet des oligomères sur les macrophages par mesure de la production du monoxyde d'azote (NO) et de l'activité lysosomale des macrophages.

CHAPITRE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre bibliographique

I. Les flavonoïdes

1. Définition et structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à la famille des polyphénols : ce sont des molécules aromatiques polysubstituées ayant un rôle de métabolites secondaires chez les plantes. La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes et à ce jour, plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (Harbone, 1993). Ces composés sont réputés pour leur caractère anti-oxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsables de maladies. Ils sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte (Raskin et al., 2002).

La structure d'un flavonoïde s'organise toujours autour d'un squelette 1,3- diphénylpropane C6-C3-C6 (Figure 1), décrit par une nomenclature spécifique. Les deux cycles benzéniques sont nommés cycle A et cycle B. Le chaînon propyle C3 peut être complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle C.

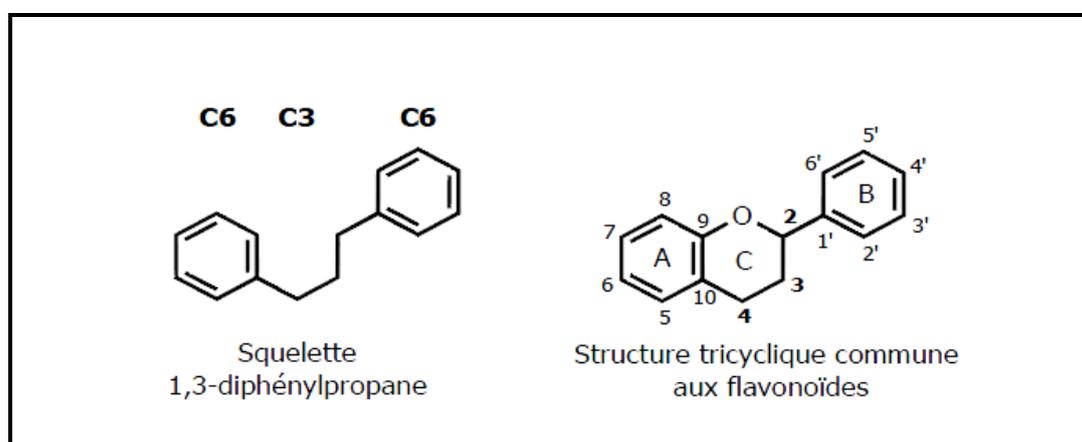


Figure 1. Structure des flavonoïdes : enchaînement C6-C3-C6

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C (Figure 1). Par ailleurs, au sein

d'une même sous-classe, les possibilités de substitution des cycles A et B sont multiples : onze carbones du squelette flavonoïde peuvent porter un substituant de type hydroxyle, méthoxyle, méthyle, isoprényle ou benzyle. Chaque groupement hydroxyle, ainsi que certains carbones, peuvent être conjugués avec un sucre et le glycoside correspondant peut être acylé à partir d'un acide phénolique ou aliphatique (Figure 2) (Harbone et Williams, 2001; Williams et al., 2004).

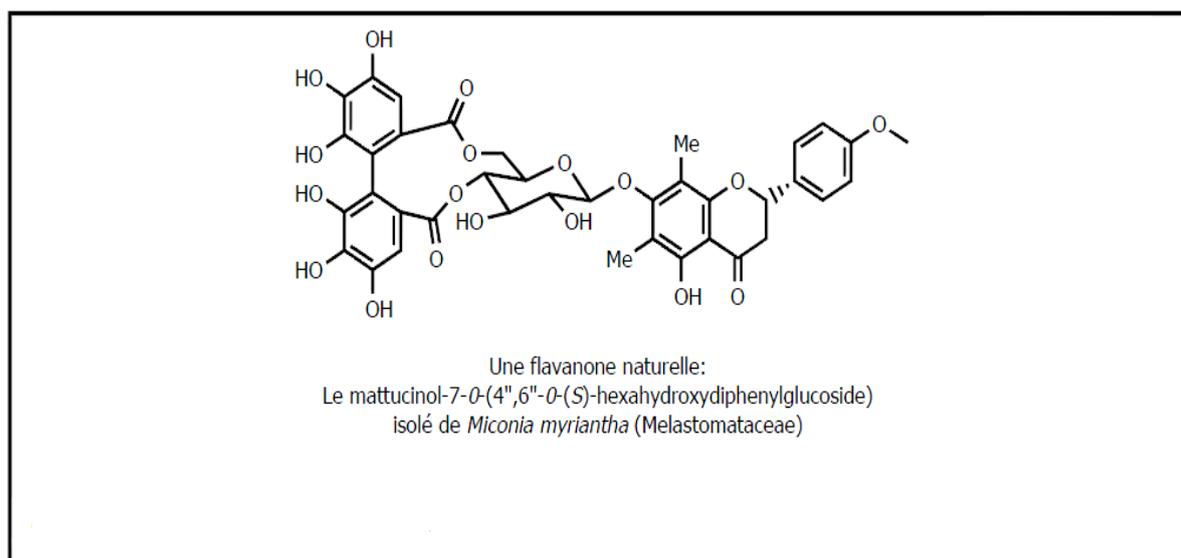


Figure 2. Exemple de la complexité d'un flavonoïde naturel

2. Classification des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du noyau pyrane central (cycle C) (Martens et al., 2006), dont les plus importants sont :

- Phényl-2-chromones : flavones, flavonols et flavanones.
- Phényl-2-chromanes (flavanes) : flavan-3-ols et flavan-3,4-diols.
- Flavyliums : anthocyanes.
- Chalcones : formes isomères ouvertes des flavanones.
- Aurones : homologues des flavones à hétérocycles pentagonales.
- Phényl-3 chromone : isoflavone.

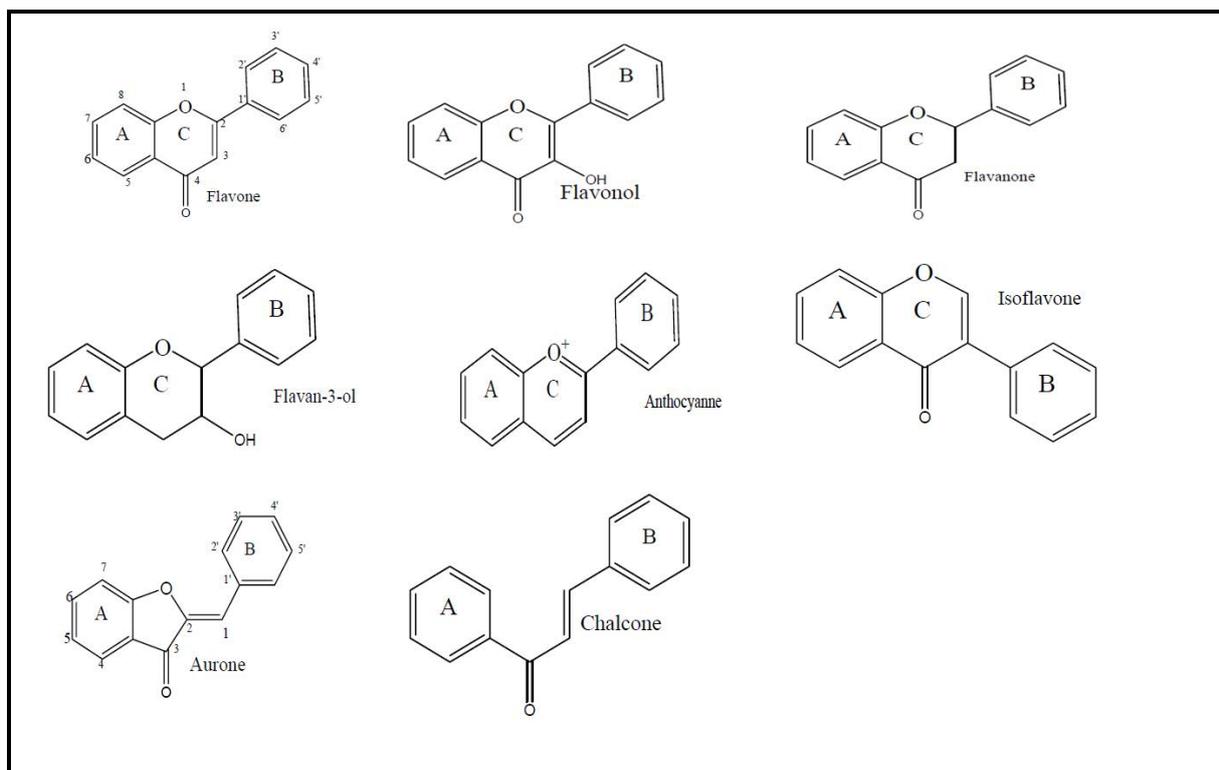


Figure 3. Structures des squelettes de base des flavonoïdes

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupement hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C-3 intermédiaire.

Les flavones et les flavonols représentent à eux seuls plus de 80% des flavonoïdes connus d'où la place de choix qu'ils occupent au sein de cette classe de produits du métabolisme secondaire.

Concernant toujours les flavones et les flavonols (côté structure), dans 90% des cas, le cycle A est substitué par des hydroxyles libres en position 5 et 7 (hydroxyles originels).

Quelques fois, les carbones C-5 et C-7 peuvent porter des substitutions de types O-Alkyl.

D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3',4',5'-trisubstitué.

Ces substituants du cycle B peuvent être des hydroxyles libres (flavonoïdes polyhydroxylés) ou des méthoxyles (flavonoïdes polyméthoxylés).

Les positions C-2' et C-6' ne sont qu'exceptionnellement substituées (Brueton, 1999).

La figure 4 représente quelques structures de flavonoïdes.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la rutine (Figure 4). Il s'agit d'un disaccharide naturel de la quercétine.

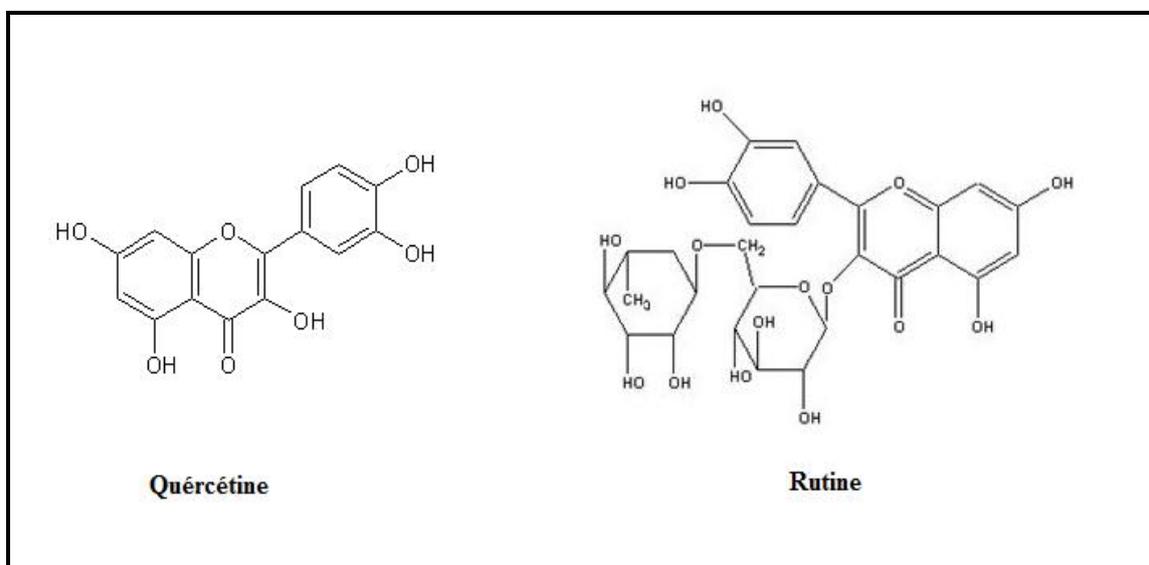


Figure 4. Structures de la quercetine et la rutine

3. Biosynthèse des flavonoïdes

Depuis plusieurs décennies, l'analyse et la compréhension du métabolisme phénolique, plus particulièrement celui des flavonoïdes, constitue un réel défi pour un grand nombre d'équipes scientifiques. Toutes les étapes de la biosynthèse des flavonoïdes ne sont pas encore clairement élucidées, mais elles constituent l'une des plus élaborées en rapport avec les métabolites secondaires (Figure 5) (Harbone et williams 2001 ; Machiex, 2005). Grâce à des réactions enzymatiques, un grand nombre de sous-classes de flavonoïdes deviennent des intermédiaires, dont nous proposons de décrire quelques étapes clefs (Tableau 1).

Tableau 1. Molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes

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

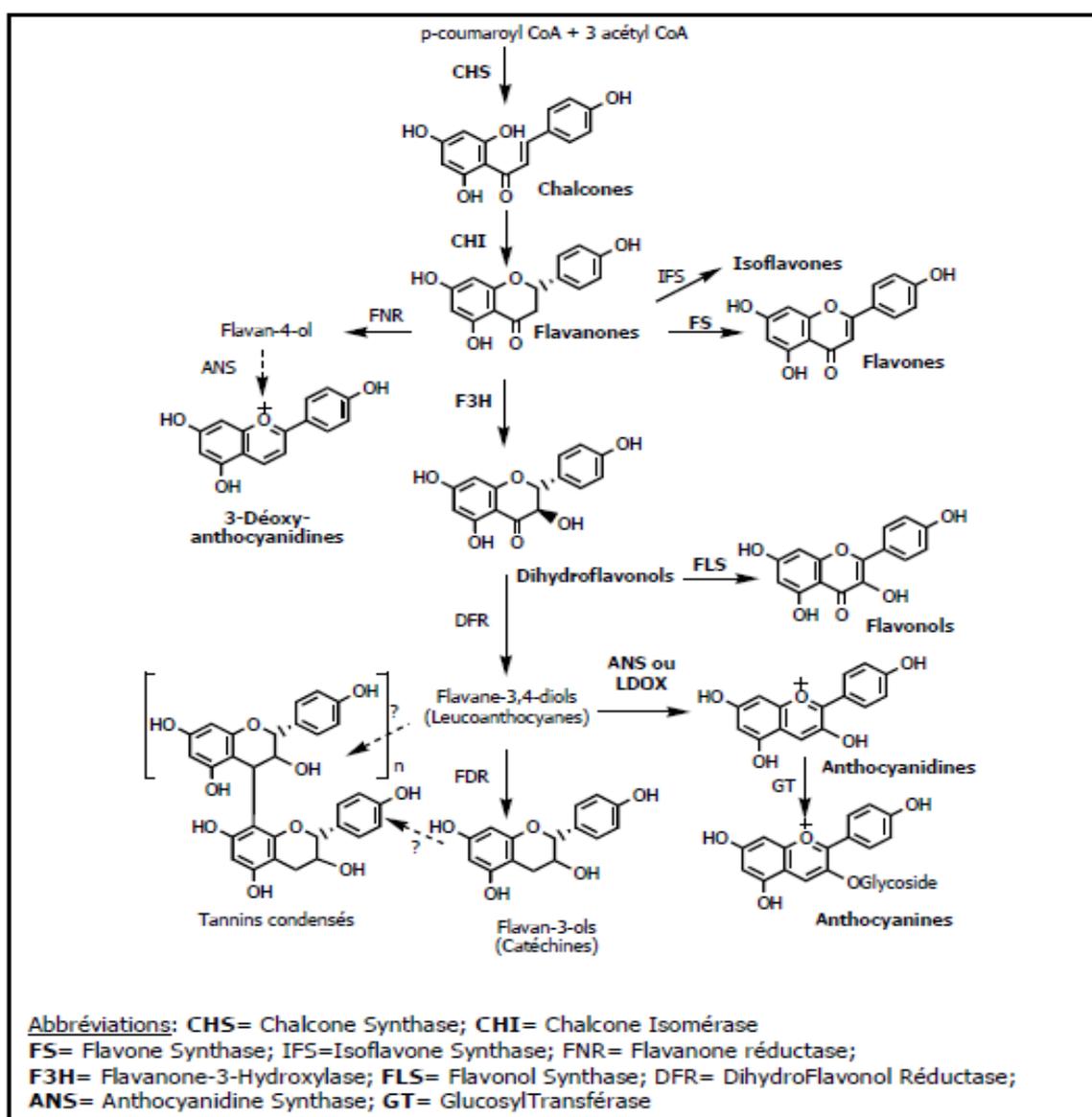


Figure 5. Schéma simplifié de la biosynthèse des flavonoïdes

4. Substitutions de squelette flavonique

Les substitutions du squelette flavonique sont très diversifiées, on y trouve notamment des hydroxylations, des méthylation et des glycosylations.

4.1. L'hydroxylation

Dans toutes les classes de flavonoïde, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques : en position C-5, C-7 et C-4'. Ces hydroxyles sont dits des hydroxyles originels (OH-7 et OH-5), ils sont introduits avant la formation du noyau chalcone (Havsteen, 2002).

L'hydroxylation du noyau B à la position 3' se fait après la fermeture de l'hétérocycle C c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3',4',5') se fait par le biais des enzymes (hydroxylases) (Harborne, 1993 ; Havsteen, 2002).

Enfin, les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylées (Iinuma et al., 1989).

4.2. La méthylation

La méthylation des groupes hydroxyles portés par le squelette flavonique se fait sous l'action de l'enzyme O-méthyl transférase en présence de S-Adenosyl-méthionine (SAM) comme donneur du groupement méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone (figure 6) (Hahlbrock et al., 1982 ; Harbone, 1993).

Dans le cas de flavones et flavonols, cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7,8), noyau B (carbones 2',3',4',5') et l'hétérocycle C (carbone3) après la formation du noyau chalcone (Harbone, 1993).

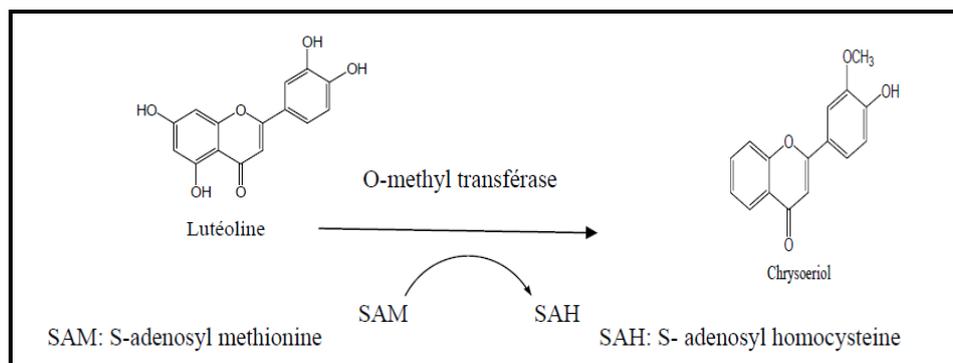


Figure 6. La méthylation de la lutéoline par l'O-méthyle transférase en présence de S- adénosyle-méthionine

4.3. La glycosylation

a. La O-glycosylation

La liaison aglycone-sucre s'effectue par le biais d'un hydroxyle phénolique et l'hydroxyle du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose) après perte d'une molécule d'eau créant ainsi un pont oxygéné entre les deux parties.

La O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme O-glycosyl transférase et un donneur de sucre comme UDP-GLU (Uridine diphosphate glucose) (Saleh et al., 1979 ; Hahlbrock et al., 1982). La partie osidique peut être mono, di ou tri-saccharidique.

La liaison entre la génine et l'ose peut se faire avec n'importe quel hydroxyle phénolique de la génine, mais en règle générale, ce sont surtout l'hydroxyle 7 des flavones et l'hydroxyle 3 des flavonols qui ont une plus grande labilité (Buerton, 1999) (Figure 7).

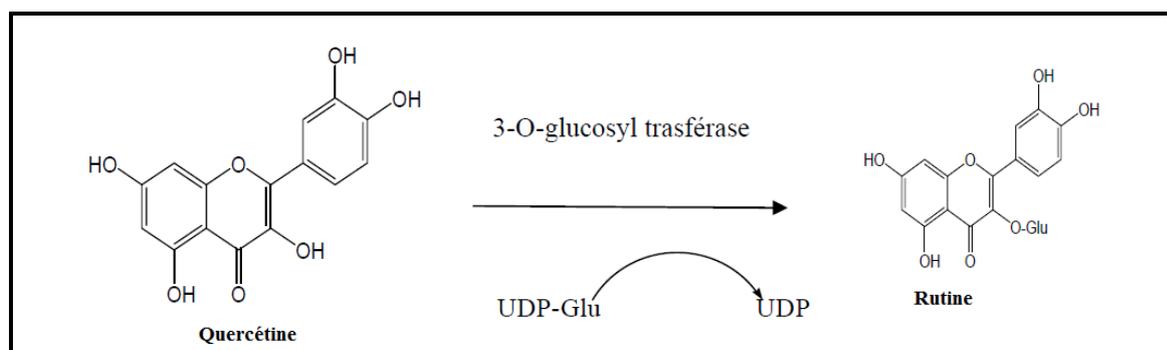


Figure 7. La O-glycosylation de la quercétine par la 3-O-glucosyl transférase en présence de l'uridine diphosphate glucose

Dans le cas des composés polyglycosylés d'autres ponts oxygénés peuvent se faire soit par le biais d'autres OH phénoliques soit par le biais d'hydroxyles osidiques, comme dans le cas du 3-O-glu, 7-O-rham Kaempférol (Saleh et al., 1979) et du 3-O-rutinosyl Kaempférol (figure 8) (Budzianowski, 1990).

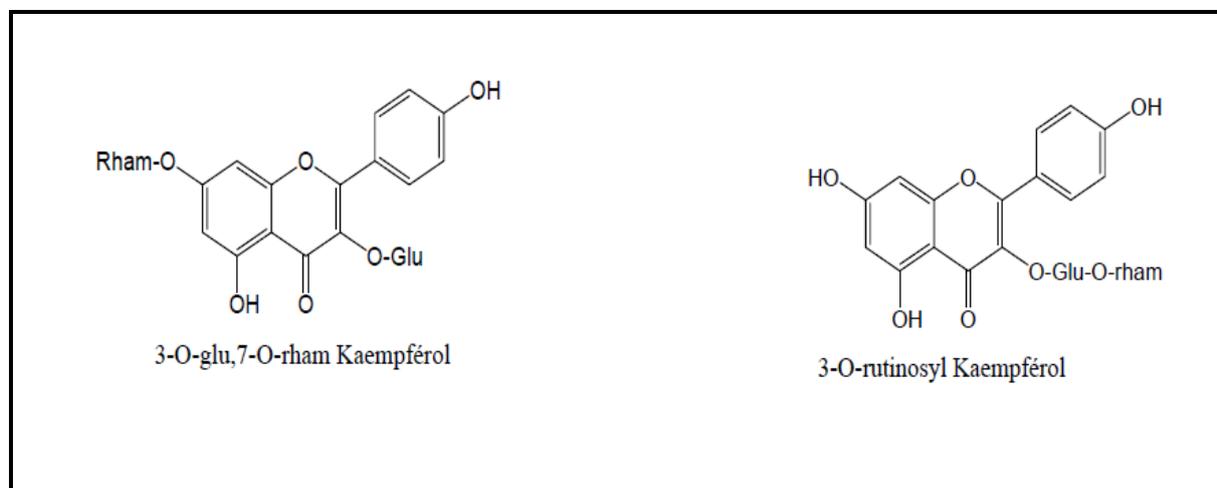


Figure 8. Structure de la 3-O-glu, 7-O-rham Kaempférol et la 3-O-rutinosyl Kaempférol

b. La C-glycosylation

Le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide (Winkel-Shirley et al., 2002).

D'une manière générale, la liaison carbone-carbone est rencontrée souvent en position C-6 et / ou en C-8 (Havsteen 2002). Il existe aussi des C-glycosyles flavonoïdes en position 7 ou en 4' (Harvsteen, 2002).

Dans certains composés tel que la 7-O-glucoside de vicénine -2, la O-glycosylation et la C-glycosylation peuvent coexister (Figure 9) (Valozo et al., 2009).

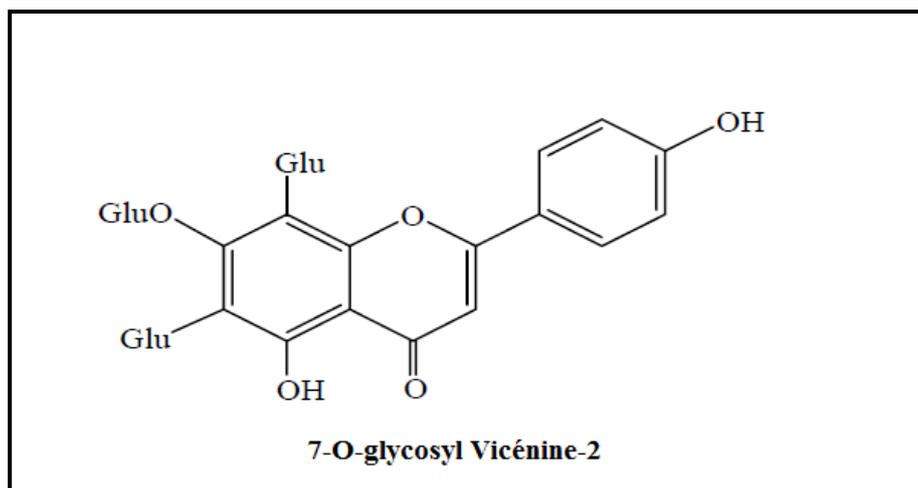


Figure 9. Structure du 7-O-glycosyl vicénine-2

4.4. La C-méthylation

La présence d'un groupement méthyle sur le squelette flavonique se fait par l'établissement d'une liaison carbone-carbone. Cette liaison est rencontrée en position C-6 et /ou C-8 (tel est le cas de l'eucalyptine (Figure 10), parfois en d'autres positions C-3 et C-7, (Bruneton, 1964).

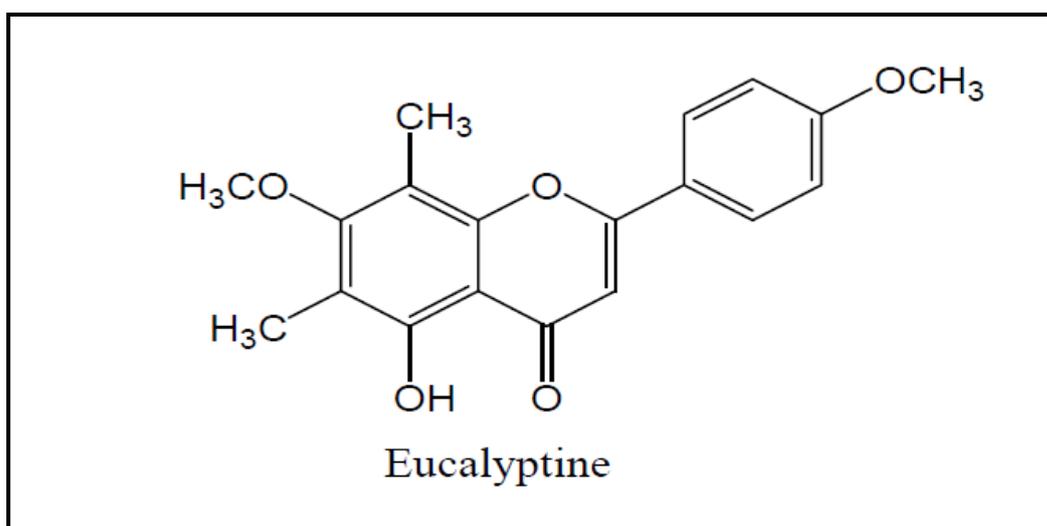


Figure 10. Structure de l'eucalyptine obtenue par méthylation

5. Distribution et localisation des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires de plantes. Ces molécules ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce (Lee et al., 1994). Les flavonoïdes sont trouvés dans les fruits, les légumes,

les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé et le vin rouge. Ils sont consommés régulièrement avec l'alimentation humaine qui nous apporte environ 75 mg de flavonoïdes par jour. En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes, les flavanols et les flavonols y seraient les plus abondants (Bruneton, 1964).

La majorité des flavonoïdes apportés par l'alimentation sont sous forme glycosylée; ils peuvent occasionnellement y être présents sous forme aglycone (Ishii et al., 2003).

La plupart des flavonoïdes aglycones sont hydrophobes et peuvent donc traverser passivement les membranes biologiques. Alors que la liaison d'un groupement glucidique à un composé phénolique diminue son hydrophobicité et limite sévèrement sa diffusion passive (Williamson et al., 2000). Il semblait alors que l'absorption des flavonoïdes glycosylés ne pouvait pas avoir lieu au niveau de l'intestin grêle. Cependant, Hallman et al. (Hollman et al., 1995 ; Hollman et al., 1997) ont montré chez l'homme que l'absorption des formes glycosylées de la quercétine administrées oralement était plus importante (52%) que celle de la quercétine aglycone (24%). Ces auteurs ont alors suggéré que la partie glucidique associée aux flavonoïdes facilite leur passage dans les entrérocytes *via* le système de transport des glucides (Hollman et al., 1997).

6. Propriété physico-chimiques des flavonoïdes

6.1. La solubilité des flavonoïdes

En présence d'un solvant, la structure du flavonoïde pourrait être différente suite aux interactions suivantes (Mompon, 1996) :

- des interactions de type hydrophobe avec les solvants apolaires concernant les cycles aromatiques (A et B) et les substituants carbonés aliphatiques ;
- des interactions dipolaires entre les solvants polaires et les groupes fonctionnels des flavonoïdes (carbonyle, éther, ester, hydroxyle) ;

- des liaisons hydrogènes entre le solvant (eau, alcool, amine) et les divers groupes donneurs ou accepteurs de ce type de liaison présent sur le flavonoïde ;
- des interactions de type électrostatique entre les groupes hydroxyles et carboxyliques ou pour les anthocyanes à certain pH.

Selon Saidman et al. (Saidman et al., 2002), le facteur principal influençant la solubilité de la flavone est sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le solvant.

La solubilité des flavonoïdes dépend, en grande partie, de la nature et le nombre de substituants : plus le nombre de groupement hydroxyle libre est élevé, plus ils sont solubles dans les solvants polaires et vis-versa (Harbone et al., 1975). Si en règle générale, les hétérosides sont solubles dans les alcools, un certain nombre entre eux ont une solubilité peu marquée (rutine et hespéridine). Les génines (ou aglycones) sont solubles dans les solutions aqueuses d'hydroxyde alcalins (Bruneton, 1987).

La solubilité des flavonols aglycones dans l'eau est en général très faible (Saito, 1999).

Quelques auteurs indiquent que la solubilité des flavonoïdes dans l'eau et dans des solvants très apolaires dépendante du pH (Abou El Hassen et al., 2000). En effet, à un pH 1.5, les solubilités de l'hesperitine et de la naringénine sont respectivement de 6 et de 25 mg/L, alors qu'à un pH 8 la solubilité est quatre fois plus élevée. D'autre part, les solubilités de la naringine et de la quercétine dans l'eau à 20°C sont respectivement de l'ordre de 125 mg/L, 0,5 g/L et < 10 mg/L (Calias et al., 1996).

La solubilité des flavonoïdes dépend également de leurs conformations spatiales; en effet Chebil et al. (Chebil et al., 2007) déclarent que les flavonoïdes ayant un angle de torsion OC2C1'C6' de 40° sont caractérisées par une importante solubilité. Cette faible solubilité en milieux biologiques (phases aqueuses) diminue leur incorporation dans les formulations alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques et pose ainsi un problème de biodisponibilité.

Afin de pallier au problème de la faible solubilité des flavonoïdes, différents techniques ont été utilisées tels que l'acylation (Chebil et al., 2006 ; Viskupiccova 2009), la polymérisation (Kurisawa et al., 2003a,b,c ; Anthoni et al., 2008), la glycosylation (Falcimaigne, 2004) ou l'ajout d'agents stabilisant comme les cyclodextrines (Schwingel et al., 2008):

- La solubilité de la naringénine dans l'eau a été augmentée 250 fois, suite à sa glycosylation par du maltotriose, en présence de l'amylase maltogénique de *Bacillus stearothermophilus* (Lee et al., 1999).

- l'acylation par des acides gras ou aliphatiques substitués avec un groupement polaire (sucre, phosphate, carboxylate) a permis d'améliorer la solubilité respectivement dans des phases lipophiles ou en milieu aqueux. Le succinate de quercétine (2- phosphonmyo- inositol) (Calias, Galanopoulos et al. 1996), l'acétate de quercétine et le propionate de quercétine (Saija et al., 2003) ont une solubilité dans l'eau respectivement 15000 fois, 500 fois et 12 fois plus importante que la quercétine. Cependant, Perrier *et al.* (Perrier et al., 1998) et Sakai *et al.* (Sakai et al., 1994) ont observé respectivement, une augmentation de la solubilité de l'hespéretine et de la catéchine après leurs acylation par des acides gras.

- la polymérisation de la rutine et de la quercétine a permis d'augmenter leurs solubilité dans l'eau (Kurisawa et al., 2003a ; Nagarajan et al., 2005; Anthoni et al., 2008).

6.2. La stabilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés réactifs. En effet, ils sont impliqués dans différents types de réactions telles que les réactions d'oxydoréduction, les réactions acido-basiques, les réactions avec les radicaux libres, etc...(Saito, 1999).

L'importante réactivité des flavonoïdes les rend instables dans plusieurs conditions environnantes. Cependant, leur dégradation est favorisée dans les milieux alcalins, par les hautes températures, les oxydants et la lumière (Martinens 2003; Bernhardt 2006; Pavlin et al., 2007).

La stabilité des flavonoïdes est affectée aussi par la nature du flavonoïde et la présence du substituant (glycosylation, acylation, polymérisation, Hydroxylation...). En effet, il a été reporté que la stabilité des flavones à la lumière est plus importante que celle des flavonols (Watts, et al., 2004).

Selon certains auteurs, l'absence d'un groupement hydroxyle en position 3 sur les flavones augmente la stabilité de ces derniers en particulier à la lumière (Nakajima et al., 1999 ; Ishihara et al., 2003). De même la présence d'un groupement glycosylé en position 3 sur les flavones et les flavonols les rend moins réactifs (Nakajima et al., 1999).

6.3. Absorption des rayons UV par les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été identifiés comme responsables de l'effet filtre au niveau des plantes (Harbone et Williams, 2002 ; Kong et al 2003). Les spectres UV des flavonoïdes présentent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm (figure 11). La première bande est située entre 300 et 395 nm et a été associée à l'absorbance de la partie cinnamoyle (cycle B) des flavonoïdes. La deuxième bande (entre 240 et 280 nm) correspond à l'absorbance de la partie benzoyle des flavonoïdes.

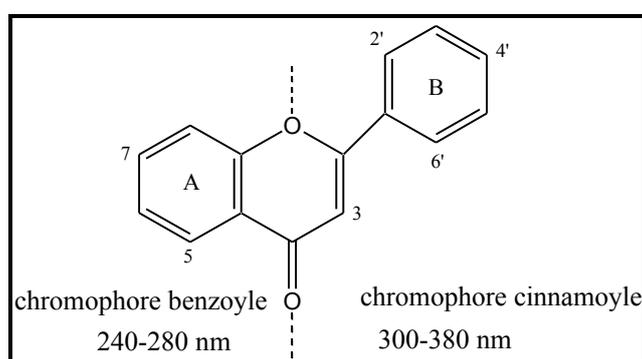


Figure 11. Domaine d'absorption UV des flavonoïdes

Plusieurs facteurs peuvent affecter le spectre d'absorption et le coefficient d'extinction des flavonoïdes. L'augmentation du nombre d'hydroxyles sur la partie aglycone provoque un déplacement bathochrome des bandes d'absorption vers de plus grandes valeurs (Tableau 2).

Tableau 2. Absorption UV des flavonoïdes dans le méthanol (Markham, 1982 ; De Rijike et al., 2006).

Classe des flavonoïdes	absorption UV-visible λ max	
	1 ^{ère} Bande (nm)	2 ^{ème} Bande (nm)
Flavone		
5-hydroxyflavone	337	272
Apiénine	337	268
Chrysin	313	247
Lutéoline	347	253
3-Méthylquercétine	355	255
Flavonol		
Fisétine	370	253
Quercétine	370	250
Isoquercétine	360	258
quercétine 3-O-glucoside	299	257
Morine	380	263
Myricétin	378	255
Flavanone		
Naringine	330	284
Naringénine	325	288
Hespéretine	330	289
Flavanonols		
Taxifoline	327	290
Toxifoline pentoside	342	293
Toxifoline déoxyhexose	340	295
Chalcone		
4'-hydroxychalcone	328	-
2', 4, 4'-trihydroxychalcone	367	-
Aurone		
4-hydroxyaurone	389	-
6, 3', 4'-trihydroxyaurone-6-glucoside	405	-
Anthocyane		
cyanidin-3-glucoside	523	274
pelargonidine 3,7-diglucoside	498	279
Isoflavone		
Daidzéine	326	261
Génistéine	302	250
Biochanin A	326	261
Flavanol		
	-	270-280
Flavan-3-ols		
3'-Hydroxy-5,7,4'-triméthoxy-flavan-3-ol	290	225
Flavan-3-ol	-	279
Epicatéchine Catéchine	-	280

Selon Markham (Markham 1982), l'absence du groupement hydroxyle en position 3 (tel est le cas des flavones), diminue la longueur d'onde de la première bande de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les hydroxyles en position 3, 5, 7, 4', provoquent un déplacement vers les longueurs d'ondes plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet.

D'après quelques auteurs, la polymérisation des flavonoïdes aboutit soit à des bandes d'absorbance plus large, comparées à ceux des monomères (Kurisawa et al., 2003a ; Anthoni et al., 2008), soit à un hypsochrome au niveau de la première bande (Markham 1982; Anthoni, Humeau et al. 2010).

7. Pharmacologie des flavonoïdes

7.1. La biodisponibilité

Les études réalisées par Crespy et al. (Crespy et al., 2003) montrent que cette biodisponibilité dépend de trois facteurs essentiels : La capacité de transport à travers la bordure en brosse des cellules d'entérocytes, l'intensité de la sécrétion intestinale des flavonoïdes conjugués vers la lumière intestinale et vers le sang et enfin la capacité de la sécrétion biliaire. Les flavonoïdes présentent une faible biodisponibilité avec une élimination lente qui diffère d'un flavonoïde à l'autre. La quercétine par exemple présente un temps de demi-vie d'absorption de 52 min, de distribution de 228 min et d'élimination de 1008 min (Middleton et al., 2000).

7.2. Pharmacocinétique

Les flavonoïdes sont présents dans notre alimentation sous plusieurs formes. Cette particularité va leur conférer des métabolismes différents. Les formes libres (aglycones) peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle (Hollman et al., 1997 ; Hollman et al., 1998), tandis que les formes glycosylées doivent être hydrolysées, sous l'influence des glycosidases, par la flore intestinale au niveau du côlon avant d'être absorbées (Walle, 2004 ; Zuo et al., 2006). Cependant les formes libres issues de cette hydrolyse peuvent également être dégradées par la microflore en acides phénols, eux mêmes absorbés ou éliminés via les fèces (Williams et al., 2004).

Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie (Haslam, 1998). Les métabolites, glucuro- et sulfoconjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale (Haslam, 1998). En

effet, les flavonoïdes sont transformés, dans l'entérocyte, en flavonoïdes conjugués par méthylation, sulfatation, glucuronidation (Crespy et al., 2001). Une partie de ces flavonoïdes est déversée dans le sang tandis qu'une autre est destinée vers la lumière intestinale ce qui constitue l'un des mécanismes de contrôle de l'absorption intestinale de ces substances phénoliques (Gee et al., 2000 ; Crespy et al., 2001).

Dans le sang, les flavonoïdes ne sont pas présents sous leur forme native, à cause de leur transformation au niveau du foie et de la cellule intestinale. La fraction des flavonoïdes conjugués destinée finalement vers les tissus pourrait avoir un effet biologique potentiel ou serait éliminée dans les urines. Cependant, d'autres flavonoïdes conjugués pourraient être déversés dans l'intestin via la bile et y être hydrolysés par les enzymes de la flore intestinale, libérant ainsi de nouveaux aglycones en constituant probablement un recyclage entérohépatique des flavonoïdes qui permet ainsi le maintien d'une concentration non négligeable dans le sang (Manach et al., 1995 ; Rechner et al., 2001).

8. Absorption et métabolisme de la rutine

Seule une petite fraction (17 %) du rutoside est absorbée dans l'intestin grêle, le reste (83 %) passe dans le côlon où il est métabolisé (La Casa, 2000). Le rutoside y est d'abord déglycolisé en quercétol (La Casa, 2000). Les bactéries de la microflore du côlon clivent aussi le rutoside et le quercétol en acides phénylacétiques (acide 3,4-dihydroxyphénylacétique 3,4DHPAA, acide 3-hydroxyphénylacétique 3HPAA), ainsi qu'en formate, acétate, butyrate, etc. et divers produits intermédiaires tel le phloroglucinol (Araújo, 2013). La bactérie fécale responsable du clivage du rutoside a été identifiée comme étant *Eubacterium ramulus* (Araújo, 2013).

Une fois absorbés, ces métabolites sont conduits par le sang dans le foie et les reins où ils subissent une méthylation et une glucuronisation (La Casa, 2000).

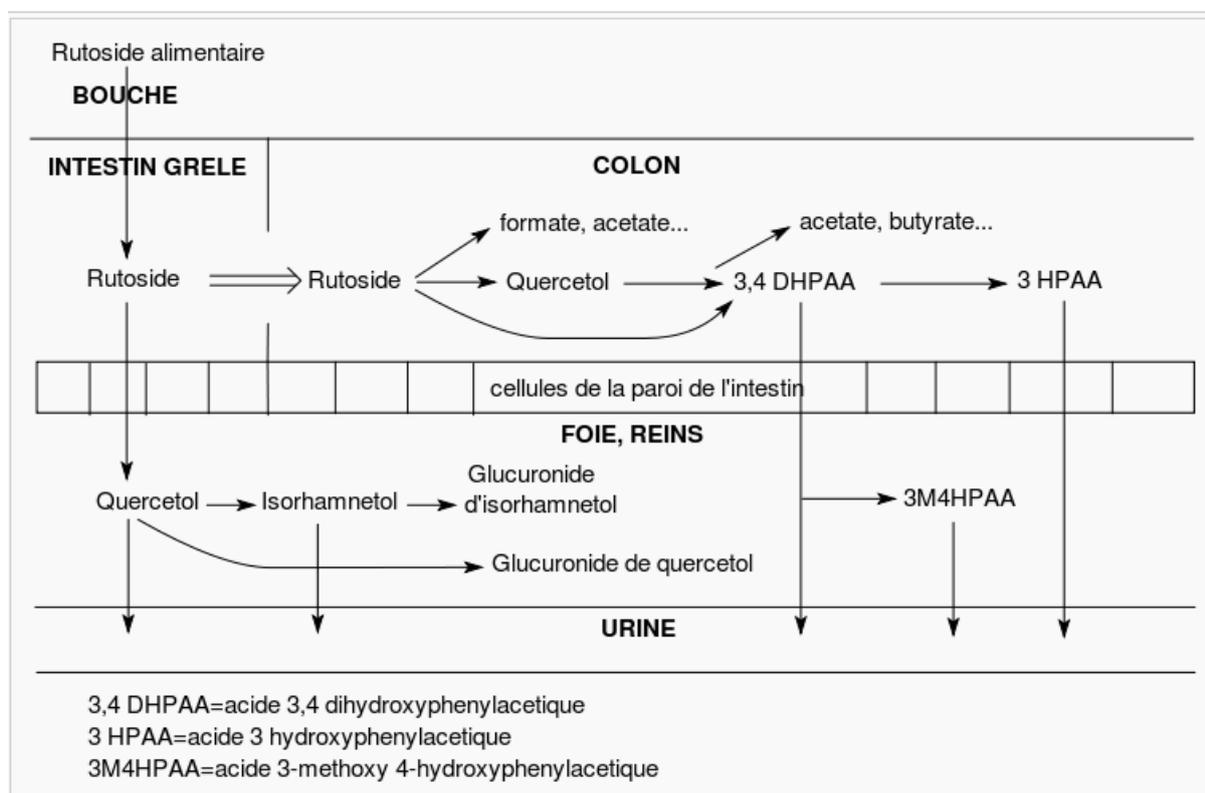


Figure 12. Les voies principales du métabolisme de la rutine (Olthof et al, 2003).

9. Propriétés pharmacologique des flavonoïdes

9.1. Effets protecteurs vasculaires (propriétés vitaminiques « P »)

Les flavonoïdes agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique « P » (Ghedira, 2005; Beretz, 1991). Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale (Shih, 2004; Youdim, 2002). Ils sont, de ce fait, utilisés dans certains états pathologiques caractérisés par un défaut affectant la perméabilité vasculaire (Folts, 2002; Villar, 1987). Les effets de l'O-β-hydroxyéthyl rutoside (HR) ont été étudiés chez des patients présentant une insuffisance veineuse chronique : un traitement à base de HR a permis de restaurer les paramètres hémorhéologiques altérés. D'autres flavonoïdes sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires. Cette activité serait en rapport avec les effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguine (Stoclet, 2004; Ursini, 1999).

9.2. Propriétés anti-inflammatoires et immunologiques

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Da Silva et al., 1994 ; Galati et al., 1994 ; De Medina et al., 2009). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Mookerjee et al., 1986 ; Nauck, 1998). Leur effet sur les lymphocytes B ou T peut être variable; en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que la myricétine est active sur les lymphocytes B (Mookerjee et al., 1986). L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourrait s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) (Mookerjee et al., 1986). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (Middleton et Drzewiecki, 1984). La quercétine a un effet anti inflammatoire en inhibant quelques enzymes de synthèse tel que la cyclooxygénase (Middleton et Drzewiecki, 1984 ; Gonzalez et al., 2007).

9.3. Propriétés antivirales et antibiotiques

La stratégie de recherche d'un composé antiviral consiste à mesurer la réduction de l'infection virale de cellules en culture. Une substance peut agir à différents niveaux du cycle viral (Milane, 2004):

- au niveau de la pénétration du virus dans la cellule hôte.
- au niveau de la réplication du virus et la synthèse des protéines virales.
- au niveau de l'assemblage et de la sortie du virus hors de la cellule hôte.

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales permettant ainsi une bonne protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une

administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours (Vrijsen et al., 1987). D'autres chercheurs (Mucsi et Pragai, 1985) ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des cellules infectées.

Les travaux de Spedding et al. (Spedding et al., 1989) ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Ils ont démontré que les flavonoïdes sont de bons inhibiteurs de la reverse transcriptase. Cependant, leur impact semble plus fort sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte que sur la reverse transcriptase virale (Ono et Nakane 1990). Certains travaux de recherche (Mahmood et al., 1993) ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV (la gp120), en empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte. Enfin, les flavonoïdes seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1 qui assure l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte (Mahmood et al., 1993).

Des études (Ohemeng et al., 1993 ; Sato et al., 1995) ont apporté l'évidence de l'effet bactéricide de différentes flavanones sur l'ADN gyrase d'une bactérie *Staphylococcus aureus*. Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer: L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer et l'inhibition du métabolisme microbien (Mila et et Scalbert, 1994).

9.4. Propriétés antinéoplasiques

Des études réalisées chez la souris ont mis en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs de tumeurs (Kato et al., 1983). La quercétine, par exemple, est l'un de ces composés phénoliques capables de diminuer, chez le rat l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenz(a)anthracène) ou la NMU (Nnitrosométhylurée) (Verma et al., 1988).

Les flavonoïdes peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques notamment en stimulant les systèmes de détoxification (Bu-Abbas et al., 1995 ; Moon et al., 2006). En donnant à des rats ou à des souris une alimentation contenant de la flavone ou de la quercétine, des chercheurs (Nijhoff et al., 1995) ont observé des effets chimiopréventifs à divers niveaux en particulier au niveau du foie par une stimulation de la glutathion-S-transférase. Enfin, les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des procarcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes (Lasker et al., 1984 ; Obermier et al., 1995).

9.5. Activité antioxydante des flavonoïdes

Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes, qui seraient attribuées à (Wang et al., 2010 ; Liyana-Pathirana et al., 2006) :

- leur capacité à piéger directement les radicaux libres.
- leur pouvoir de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives (EOR) *via* les réactions de Fenton et Haber-Weiss.
- Leur capacité d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases et d'inhiber les enzymes antioxydantes.

9.5.1. Piégeage direct de radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. À cause de leur faible potentiel redox (Nijveldt et al., 2001), les flavonoïdes (flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^{\bullet}) comme le superoxyde, le radical peroxyde, le radical alkoxyde et le OH^{\bullet} par transfert d'hydrogène (figure 12).

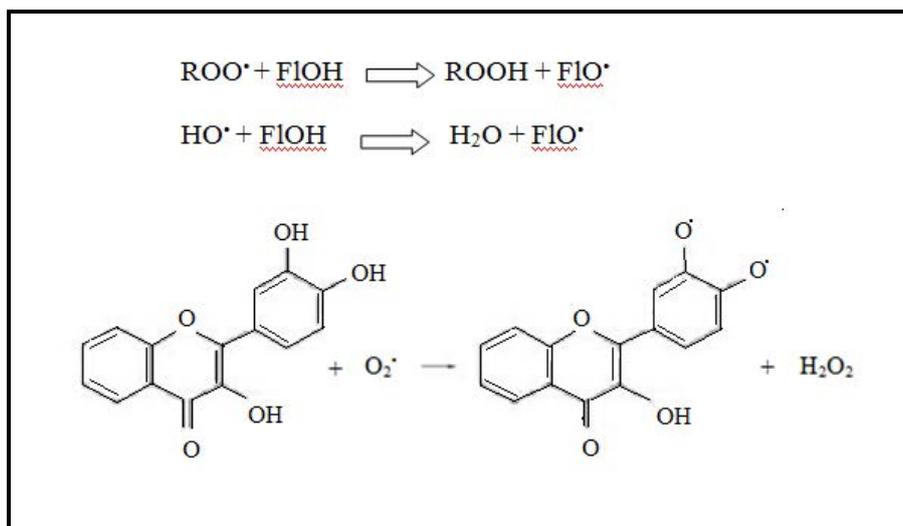
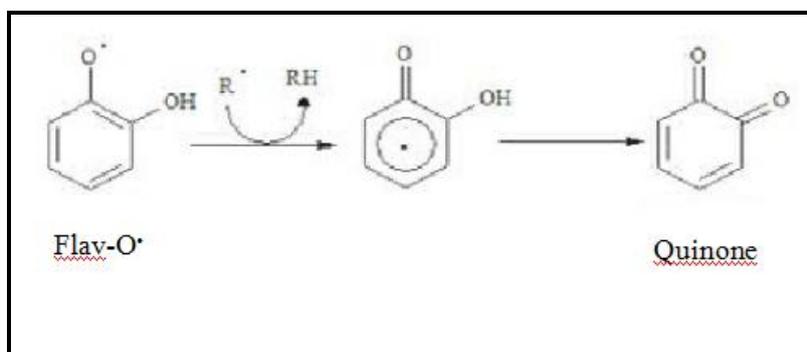


Figure 12. Réaction des flavonoïdes avec les espèces oxygénées réactives (Densiov and Afanas'ev 2005). Avec FIOH : flavonoïde, FIO• : flavonoïde sous forme radicalaire.

Le radical aroxyde résultant (Fl-O•) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable comme le montre la figure ci-dessous :



En outre, le radical aroxyde peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction qui peut prendre place en présence de taux élevés de métaux de transition, est responsable de l'effet prooxydant indésirable des flavonoïdes (McCord, 1995). La capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend donc, non seulement du potentiel redox du couple Flav- O•/Flav-OH, mais aussi de la réactivité du radical aroxyde (Rice-Evans, 2001).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur pouvoir piègeur des radicaux libres (Jovanovic et al., 1994 ; Van Acker et al., 1996 ;

Cos et al., 1998 ; Pietta, 2000 ; Cotelle, 2001 ; Rice-Evans, 2001 ; Seyoum et al., 2006). Ces travaux ont pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons (la substitution de ces groupements hydroxyles sur le cycle B par des groupements méthoxyles altère le potentiel redox et donc le pouvoir antiradicalaire des flavonoïdes) (Chen et al., 2012).
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité antiradicalaire des flavonoïdes (Heim et al., 2002 ; Balasundram et al., 2006 ; Seyoum et al., 2006).
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 augmente également la capacité à piéger les radicaux des flavonoïdes (la substitution du groupement 3-OH conduit à l'augmentation de l'angle de torsion et une perte de la coplanarité conduisant ainsi à la réduction de l'activité antioxydante) (Heim et al., 2002 ; Balasundram et al., 2006 ; Seyoum et al., 2006).

9.5.2. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, Cu pour la ceruloplasmine, Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon les réactions de Fenton et Haber Weiss (Cotelle, 2001). Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Morris et al., 1995 ; Brown et al., 1998). Les études menées par plusieurs auteurs (Van Acker et al., 1996 ; Fernandez, 2002 ; Heim et al., 2002 ; Guo, 2007) sur la chélation du fer par certains

flavonoïdes, ont permis de déterminer les sites potentiels responsables de la chélation des ions métalliques (figure 13) qui sont :

- un noyau catéchol sur le cycle B.
- les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C.
- les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C

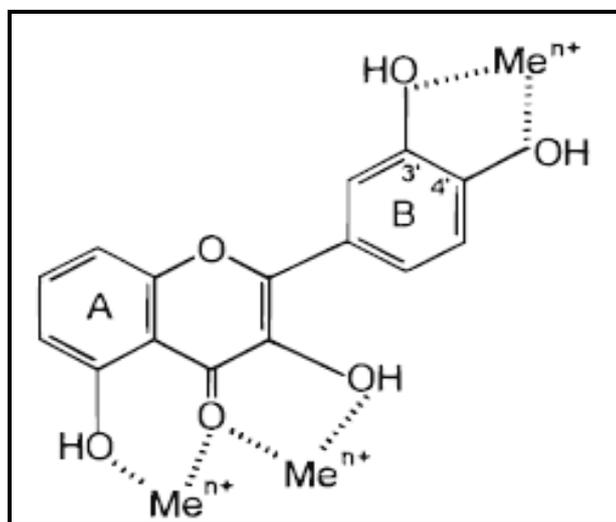


Figure 13. Sites proposés pour la chélation des ions métalliques sur la structure d'un flavonoïde (Pietta, 2002).

9.5.3. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du $O_2^{\bullet-}$ et d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, la lipooxygénase, la monooxygénase microsomale, et la glutathion-S-transférase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxydase mitochondriale et la NADH oxydase (Pietta, 2000 ; Densiov et Afanasev, 2005).

a. Inhibition de la xanthine oxydase

Depuis que McCord et Fridovich ont démontré la participation de la xanthine oxydase (XO) dans la génération des radicaux libres, l'intérêt porté aux propriétés de cette enzyme s'est considérablement accru (Klinenberg et al., 1965 ; Rundles, 1966). Son rôle dans la génération

des ROS dans plusieurs pathologies a été largement étudié. L'allopurinol est le seul inhibiteur de la XO utilisé en clinique pour contrôler la production de l'acide urique dans la maladie de la goutte et l'hyperuricémie (Klinenberg et al., 1965 ; Rundles, 1966). Cependant, la toxicité sévère de l'allopurinol a été rapportée par certains auteurs (Young et al., 1974). Pour cela, la recherche de nouveaux inhibiteurs dépourvus d'effets indésirables est toujours d'actualité. Les composés phénoliques d'origine naturelle, comme les flavonoïdes, semblent être des inhibiteurs prometteurs de la xanthine oxydase. Plusieurs études sur des polyphénols naturels (surtout les flavonoïdes), sous forme de plantes entières ou extraits purifiés, ont montré qu'ils peuvent être une source importante d'inhibiteurs de la XO (Masuoka et al., 2012 ; Anthoni et al., 2008). Cos et al. (Cos et al., 1998) ont mesuré l'activité d'une trentaine de flavonoïdes sur la production de l'acide urique par la XO. Ils ont ainsi déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la XO. Ces chercheurs ont montré que seuls les flavonols et les flavones ont la capacité d'inactiver l'enzyme, ceci montre l'importance de la double liaison C2-C3 dans l'inhibition de la XO. Cette double liaison et la conjugaison qu'elle induit, entraîne la coplanarité du cycle B avec les cycles A et C. Des études ultérieures menées par Van Hoorn et al. (Van Hoorn et al., 2002) montrent clairement l'importance de cette structure plane dans l'inhibition de la xanthine oxydase. En comparant les activités des flavones et de leurs analogues flavonols, cos et al. (Cos et al., 1998) ont constaté que l'absence du groupe hydroxyle en C-3 augmente légèrement l'activité. Ils ont montré également que le cycle B n'a que peu d'influence sur cette inhibition et que les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés.

b. Inhibition des lipooxygénases et des cyclooxygénases : activité anti-inflammatoire

Afin de déterminer le mécanisme d'inhibition des lipooxygénases par les flavonoïdes, Sadik et al. (Sadik et al., 2003) ont étudié l'oxydation de l'acide linoléique par une lipooxygénase en présence de quercétine. Cette étude suggère que le mécanisme d'inhibition des lipooxygénases par la quercétine ne serait pas dû à une complexation ou à une oxydation du Fe^{2+} , mais plutôt à une inhibition irréversible de l'enzyme résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de la quercétine (quinone ou radical phénoxy). Certains auteurs ont pu définir les groupements importants dans l'inhibition de la lipooxygénase, à savoir : la présence d'un groupement hydroxyle en C3, d'une fonction catéchol sur le cycle A ou B et de la double liaison C2-C3 (Chi et al., 2001 ; Arockia Babu et al., 2002 ; Sadik et al., 2003).

9.6. Propriété pro-oxydante des flavonoïdes

Nous avons décrit précédemment les propriétés antioxydantes des flavonoïdes mais il ne faut pas négliger leurs propriétés pro-oxydantes.

Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène (Sergediene et al., 1999 ; Heim et al., 2002). Ainsi, ils seraient capables de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) aboutissant à la formation de radicaux hydroxyles par réaction entre Fe^{2+} et du H_2O_2 .

Dans une étude menée par Hanasaki et al. (Hanasaki et al. 1994), une série de mono et dihydroxyflavonoïdes s'est avérée non prooxydante, alors que les flavonoïdes ayant plusieurs groupements hydroxyle, surtout au niveau du cycle B, montrent une activité prooxydante significative. Ces auteurs ont pu ainsi déduire que l'activité prooxydante des flavonoïdes est directement proportionnelle au nombre de groupements hydroxyles. D'autres auteurs ont confirmé la théorie avancée par Hanasaki et al. (Hanasaki et al. 1994). Outre le nombre de groupement hydroxyle au niveau des flavonoïdes, la position de ces groupements semble être

déterminante pour l'activité prooxidante. En effet, la présence de groupement hydroxyle en position 3', 4' et 3 diminue l'activité prooxidante (Bors et al., 1995). Il a été aussi démontré que pour les flavones, la présence d'une liaison C2-C3 insaturé et un groupement 4-oxo peut promouvoir la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Cao et al., 1997).

9.7. Propriétés antihépatotoxiques

Des flavonoïdes issus de *Silybum marianum* (chardon marie) ont été utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle dans le traitement des affections hépatiques. Les principes actifs de l'extrait sont constitués d'un mélange complexe (constitué de composés de type flavolignane et flavanone) appelé silymarine. Testée sur un modèle expérimental animal, la silymarine a montré qu'elle exerce un effet positif sur les hépatocytes intacts et sur les cellules hépatiques endommagées irréversiblement, agissant sur la membrane cellulaire, prévenant l'entrée des substances toxiques, et qu'elle stimule la capacité régénérative des cellules hépatiques après hépatectomie partielle. L'activité hépatoprotectrice de la silybine, principale flavolignane rencontrée dans la silymarine, a été évaluée chez des souris intoxiquées par des doses non thérapeutiques d'acétaminophène. Ce flavonoïde s'est révélé hépatoprotecteur, mais le mécanisme d'action de cette protection n'est pas encore bien élucidé (Magliulo, 1973). La quercétine, issue de *Artemisia scoparia*, a été décrite comme possédant une activité protectrice vis-à-vis de l'hépatotoxicité du paracétamol chez le rat et la souris (Gilani, 1993).

9.8. Activité anti-ulcérogène

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. L'hypolaetine-8-glucose, flavonoïde présent dans diverses espèces du genre *Sideritis*, présente une activité anti-ulcérogène significative (Villar, 1987).

La naringine et la quercétine exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol. Il a été suggéré que la quercétine exerce ses effets cytoprotecteurs grâce à un complexe impliquant la stimulation de

la prostaglandine et l'inhibition de la production de leucotriènes *via* la production de mucus et ses propriétés antioxydantes (Martin, 1994). Par ailleurs, il a été établi que la quercétine inhibe la croissance d'*Helicobacter pylori* ainsi que la formation d'acide par les cellules pariétales en réponse à une stimulation par l'histamine et l'AMPc dibutyrique (Beil, 1995; Shin, 2005).

9.9. Activité antibactérienne et antivirale

Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence (Jassim, 2003; Jiang, 2003; Sokmen, 2005; Taguri, 1965; Takahashi, 2004). Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus (Gonçalves, 2001; Serkedjieva, 1998).

Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la réplication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus (Gonçalves, 2001).

II- Les coumarines

1. Définition des coumarines

Les coumarines sont des substances présentes naturellement dans les plantes et les microorganismes. Environ 1620 dérivés de la coumarine ont été isolés à partir de plusieurs espèces de plantes et de microorganismes (Sproll, 2008). La coumarine en elle-même était d'abord isolée de la fève de tonka (*Coumarou*) par Vogel en 1820 (Vogel, 1820).

2. Distribution et localisation des coumarines

Les coumarines sont présentes dans divers végétaux (Lake, 1999 ; Bruneton 2009). La fève tonka, fruit du gaïac de Cayenne (*Dipteryx odorata*), est très riche en coumarine (de 1 à 3,5 %). À maturité, la fève libère des arômes de vanille, de foin et d'amande. Elle est en

vogue auprès de quelques grands chefs qui l'utilisent pour parfumer les crèmes et les gâteaux (Macheix et al., 2006). Les coumarines extraites de cette plante utilisée en parfumerie ou pour aromatiser les aliments ou les boissons (Macheix et al., 2006). Une autre plante, l'aspérule odorante, (*Galium odoratum*), qui, à maturité, a une agréable senteur due au développement de la coumarine, renferme 1,0 à 1,3 % de ce métabolite. La racine de la flouve odorante (*Anthoxanthum odoratum*), les feuilles de maïs, la lavande vraie (*Lavandula angustifolia*), le celeri et la canelle présentent également des quantités intéressantes de coumarine une fois séchés (Macheix et al., 2006).

Les coumarines sont rencontrées principalement au sein de quatre familles botaniques suivantes : Fabaceae (tels que les Légumineuses), Asteraceae (tels que les Composées), Apiaceae (ex Umbellifères) et Rutaceae (tels que les agrumes).

3. Structure et classification

Les coumarines sont caractérisées par une structure qui comporte le noyau benzo- α pyrone (coumarine), résultant de la lactonisation de l'acide ortho-hydroxy- cis cinnamique (Lake, 1999). Toutefois leurs structures restent très diverses et peuvent être classés en deux grands groupes (Smyth et al., 2009) (Floc'h et al., 2002):

- Coumarines simples
- Coumarines complexes où un noyau furanne ou pyranne est associé au noyau benzo α pyrone.

3.1. Les coumarines simples

Ce sont celles qui ont des substituants dans le cycle benzénique. Elles peuvent être des dérivés hydroxylés, méthoxylés, alkylés, alcoxylés et glycosylés de la molécule mère (Figure 14) (Cohen, 1979 ; Lake, 1999)

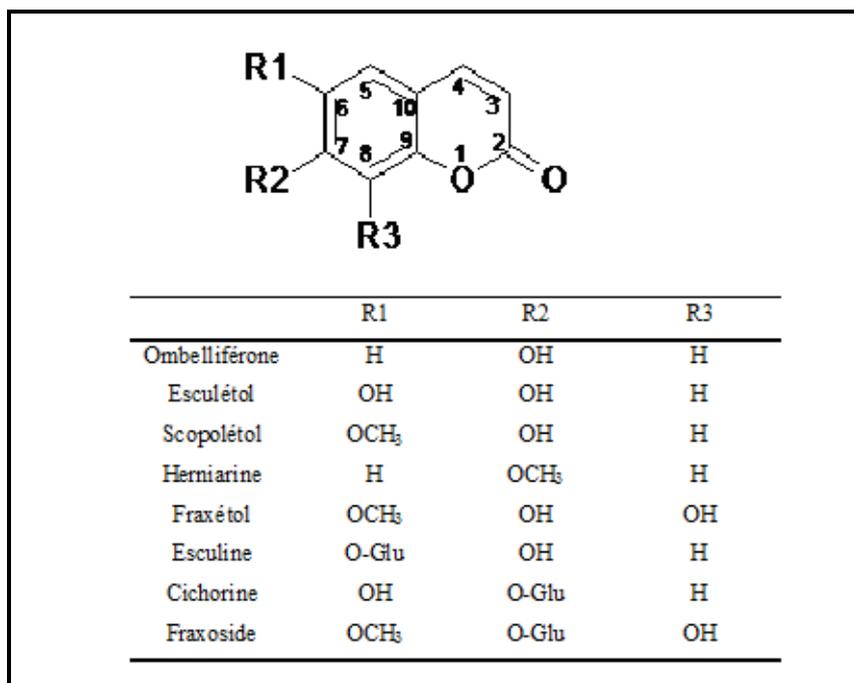


Figure 14. Structures de quelques coumarines simples.

3.2. Coumarines complexes

On distingue :

- les furocoumarines (ou furanocoumarines) qui constituent une classe de molécules diversifiée chimiquement, où chaque classe se distingue par la présence de divers groupements (hydroxy, alkoxy...) sur les carbones 2, (Maternu et al., 1988). On distingue deux types de furocoumarines en fonction de la position de noyau furane sur l'hétérocycle coumarine. Le premier groupe est celui des furocoumarines linéaires (Figure 15 A) qui comprend le psoralène et ses dérivés. Le second, celui des furocoumarines angulaires (Figure 15 B, est quant à lui représenté par l'angélicine et ses dérivés.
- Les pyranocoumarines (Figure 16).

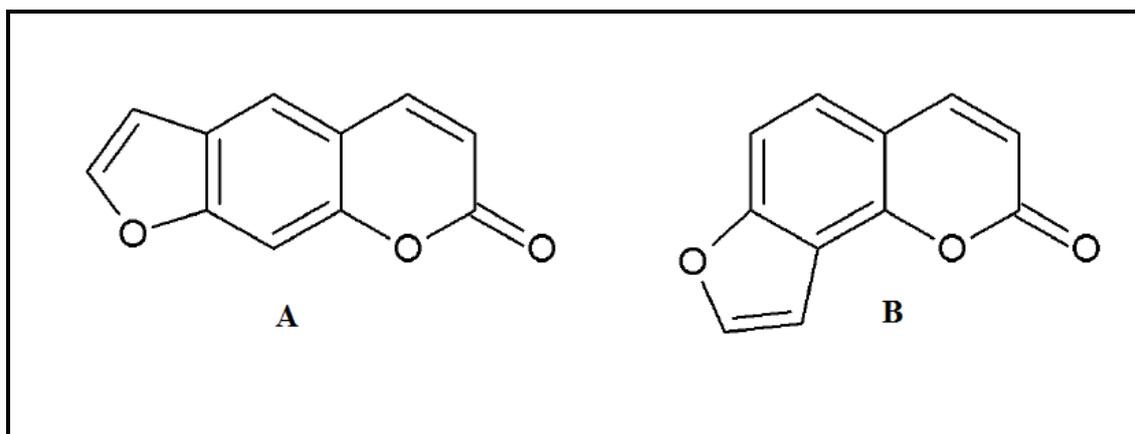


Figure 15. (A) Structure chimique d'une furocoumarine linéaire (psoralène). (B) structure chimique d'une furocoumarine angulaire (angélicine) (Smyth et al., 2009).

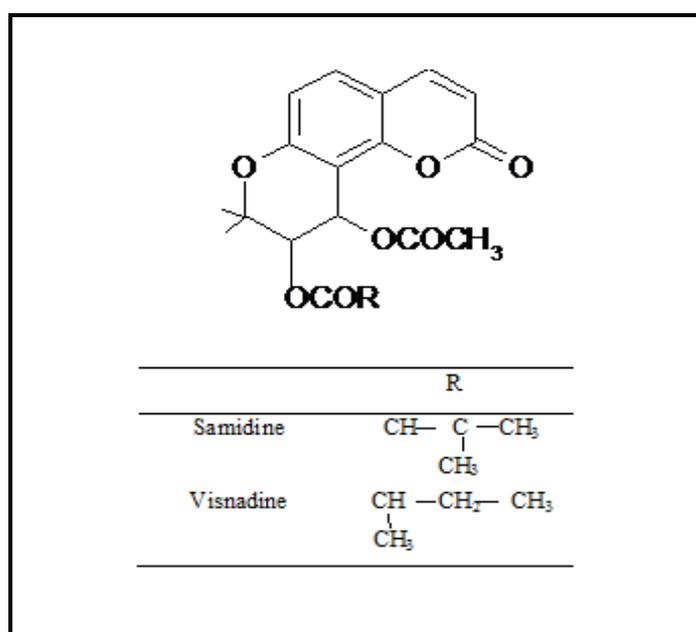


Figure 16. Structure de quelques pyranocoumarines (Smyth et al., 2009).

4. Propriétés physico-chimiques

Les coumarines présentent une couleur bleu-vert dans le spectre visible. Peu de publications font état des absorbances UV des coumarines (Tableau 3).

La solubilité des coumarines est peu étudiée. En effet l'étude de la solubilité de l'esculine a été réalisée par Anthoni et al. (Anthoni et al., 2010). Cette coumarine montre une solubilité de 3,7 g/l dans l'eau et 5,96 g/l dans un mélange eau/méthanol (70 :30 v/

Tableau 3. Absorption UV des coumarines dans l'éthanol (Preat et al., 2005).

Substitution	λ max
5-Me	309
6-Cl	309
7,8-diOH	339
6,7-DiOH	341
6-NH ₂	412

5. Absorption et métabolisme chez l'homme

D'après Lake et al. (Lake, 1999) la source principale de coumarine dans l'alimentation viendrait de la cannelle, souvent présente sous forme d'arôme alimentaire. Il estime l'apport journalier par l'alimentation à 0,02 mg/kg/j.

Après ingestion, la coumarine est rapidement et complètement absorbée dans le tube digestif puis massivement métabolisée dans le foie. Elle y subit principalement une hydroxylation en 7-hydroxycoumarine (7-HC) (pour 84 %) et une ouverture du cycle de la lactone, avant d'être en grande partie excrétée dans les 24 heures, par voie rénale (figure 17) (Gibbs et al., 1979; Lake, 1999). Son temps de demi-vie dans l'organisme humain est d'une heure (Gibbs et al., 1979).

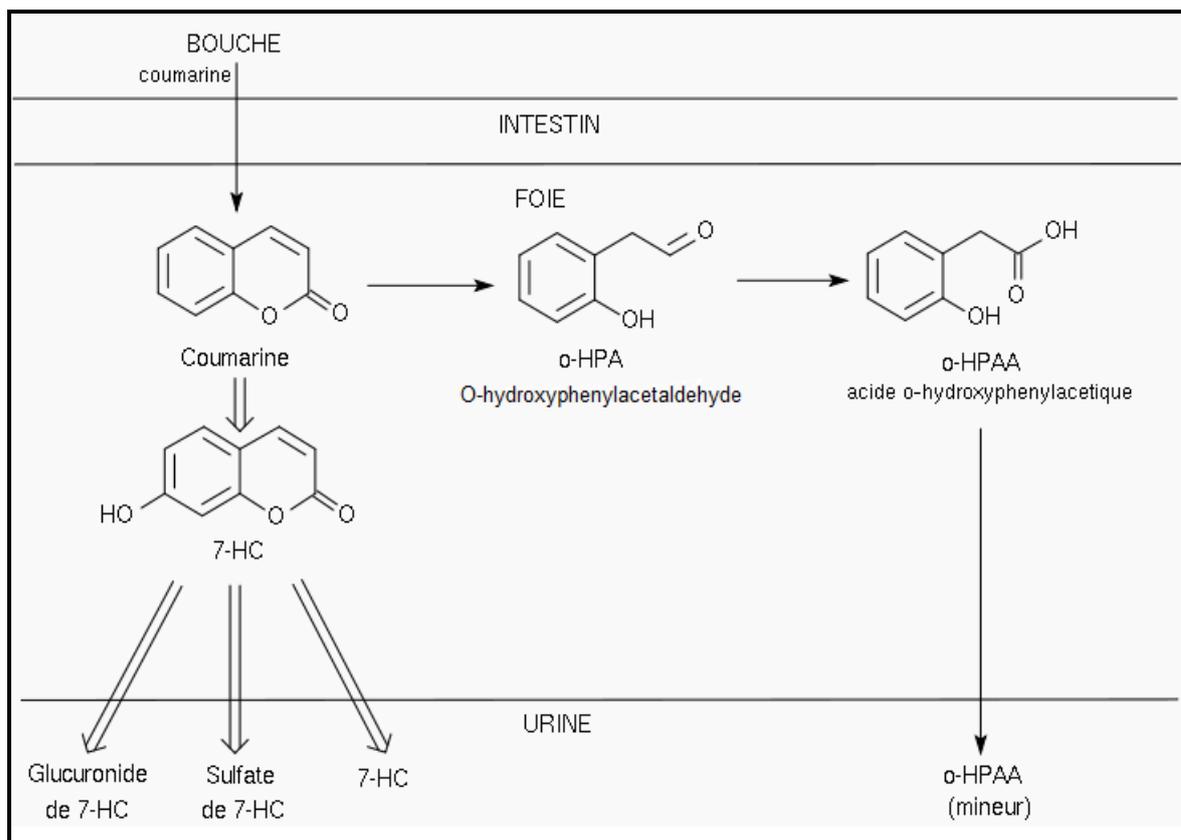


Figure 17. Les 2 voies principales du métabolisme de la coumarine (Gibbs, Janakidevi et al. 1971). Avec :7-HC est la 7-hydroxycoumarine

Chez l'homme, la voie par la 7-hydroxylation est très largement majoritaire et donne des métabolites qui peuvent s'avérer dans certains cas toxiques, notamment la 7-hydroxycoumarine qui peut induire une hépatonécrose sévère. Par contre, chez le rat, aucune 7-hydroxylation n'est détectée dans ses urines après une ingestion de coumarine et l'autre voie produit des composés très toxiques (Gibbs et al., 1979, Lake, 1999).

6. Utilisations et activités biologiques

Les coumarines sont utilisées comme fixateur et agent améliorateur dans les parfums (Opdyke, 1974 ; Cohen, 1979). Elles sont également ajoutées dans les savons, les détergents, les dentifrices et quelques boissons alcoolisées (Opdyke, 1974 ; Cohen, 1979). Des grandes quantités de coumarines sont utilisées également dans la fabrication de caoutchouc, les

matériaux en plastique et dans les peintures afin de neutraliser les odeurs désagréables (Fentem et Fry, 1993).

En raison de certains de leurs activités biologiques, certains de ces coumarines ont été proposés dans la médecine clinique. Par exemple la capacité de la coumarine (2H-1-benzopyrane-2-one) à activer les macrophages, explique son utilisation pour le traitement des oedèmes (Egan et al., 1990). La coumarine a été aussi décrite pour le traitement de la brucellose, à cause de ses propriétés immunomodulatrices (Egan et al., 1990). La coumarine est également en cours d'essais expérimentaux chez des animaux pour le traitement de cancers du sein, du poumon et des reins; elle a été utilisée toute seule (Thormes et al., 1989) et en combinaison avec la cimétidine comme traitement antinéoplasique (Marshall et al., 1987 ; Cox et al., 1989 ; Marshall et al., 1989 ; Dexeus et al., 1990).

Le pouvoir piègeur des coumarines vis-à-vis de plusieurs radicaux, ainsi que leurs capacités d'inhibition de la xanthine oxidase ont été mis en évidence par plusieurs auteurs (Kaneko et al., 2003 ; Zhang et Wang, 2004 ; Lin et al., 2008). Certaines structures ont été identifiées comme étant très importantes pour l'expression du pouvoir antiradicalaire des coumarines à savoir; la présence de groupements OH et la présence d'une partie catéchol (Zhang et Wang, 2004 ; Lin et al., 2008). La présence de la partie catéchol a également été décrite comme étant essentielle pour l'inhibition de la xanthine oxidase (Chang et Chiang, 1995 ; Lin et al., 2008).

La génotoxicité des coumarines a été étudiée à l'aide de plusieurs méthodes (sur les drosophiles « *Drosophila melanogaster* », test des micronoyaux, test d'Ames) (Florin et al., 1980 ; Haworth et al., 1983). Toutes ces études ont montré l'absence de génotoxicité des coumarines.

Les coumarines ont un potentiel cytotoxique pouvant s'avérer intéressant dans le cas de traitements anticancéreux (Lake, 1999). En effet, il est apparu que la cytotoxicité des coumarines est dépendante de la cellule ciblée. De part leurs propriétés chélatante,

antioxydante et anticoagulante (due au dicoumarol), les coumarines apparaissent comme des molécules potentiellement cytotoxiques à intérêts thérapeutiques (Lake, 1999).

Les coumarines tel que les furanocoumarines, surtout linéaires, ont des propriétés photosensibilisantes. Ces propriétés sont liées à des processus photochimiques induits par les coumarines en présence d'oxygène, sous l'influence du rayonnement UV solaire.

III- Polymérisation enzymatique des flavonoïdes et des coumarines

Durant les dernières décennies, la synthèse enzymatique de polymères phénoliques a été étudiée de façon approfondie (Kurisawa et al., 2003 a,b,c ; Angerer et al., 2005 ; Bruno et al., 2005 ; Anthoni et al., 2008 ; Anthoni et al., 2010). Cette voie présente les avantages d'apporter une certaine régio-sélectivité et d'être effectuée en conditions douces de pH et de température tout en conservant le label de « chimie verte » (Kurisawa et al., 2003a). Jusqu'à présent, plusieurs oxydoréductases (peroxydases, laccase, bilirubine oxydase etc...) ont été utilisées au cours des réactions de polymérisation oxydative de divers composés phénoliques (y compris des flavonoïdes et des coumarines) (Uyama et al., 2006).

III.1. Mécanisme de la polymérisation enzymatique par des oxydoréductases

Les oxydoréductases sont des enzymes capables de transformer les composés phénoliques à travers des réactions de couplages oxydatifs. Les deux principaux groupes utilisés au cours de la polymérisation enzymatique des composés phénoliques sont les peroxydases et les laccases (Tseitlin et al., 2006). La principale différence entre ces deux groupes est la nature de co-substrat utilisé (Canfora et al., 2008).

III.1.1. Les laccases

Les laccases ont été découvertes pour la première fois par Yoshida dans la sève de *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883) et depuis leurs propriétés biochimiques, leurs structures et leurs mécanismes d'action ont été étudiés (Omura, 1961 ; Holwerda et Gray, 1975 ; Morpurgo et al., 1980). Jusqu'à présent, plus que 100 laccases ont été purifiées à partir de champignons

(Witayakranet Ragauskas, 2009). Certains auteurs, ont rapporté la présence de laccase chez certaines bactéries (Claus, 2004 ; Sharma et al., 2007).

Le site actif de la laccase est constitué de 4 atomes de cuivre dont un de type 1 (T1), un de type 2 (T2) et deux de type 3 (T3) (figure 18) (Enguita et al., 2003 ; Garavaglia et al., 2004).

Les laccases exercent leur pouvoir catalytique selon les 3 étapes suivantes (Solomon et al., 1996 ; Solomon et al., 2001 ; Bento et al., 2005):

- L'atome de cuivre de type 1 (T1) est réduit en acceptant des électrons de substrat réducteurs.
- Les électrons sont transférés au niveau des atomes de cuivres de type 2 et 3 (T2/T3).
- L'oxygène moléculaire est ensuite activé et réduit en eau au niveau des atomes de cuivres de type 2 et 3. La figure 19 montre le mécanisme de catalyse des laccases permettant la réduction de l'oxygène moléculaire en eau (Shleev et al., 2005 ; Solomon et al., 2008).

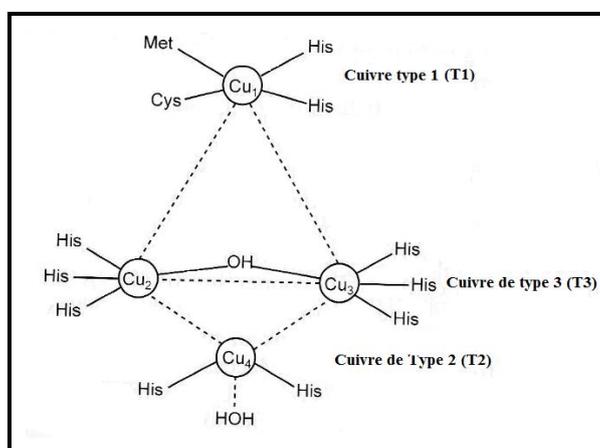


Figure 18. Le site actif de la laccase (CotA) de *Bacillus subtilis* (Enguita et al., 2003).

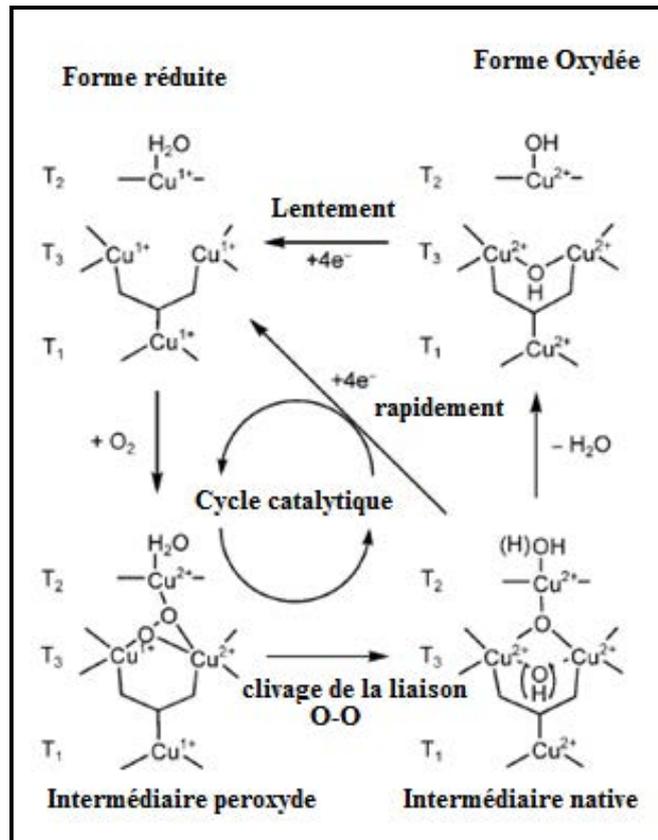


Figure 19. Le cycle catalytique de la laccase permettant la réduction de l' O_2 en eau (Solomon et al., 2008).

Les laccases sont capables d'oxyder divers composés tels que les polyphénols, les aminophénols, les polyamines, les lignines, l'aryldiamines, les ortho- et para-benzenedioles et quelques ions inorganiques (Bruno et al., 1995 ; Claus, 2004 ; Riva, 2006). Afin d'assurer cette oxydation, les laccases arrachent un électron à ces composés et les transforment ainsi en radicaux libres et par la même occasion réduisent l'oxygène en eau (Witayakran et Ragauskas, 2009). Le schéma simplifié de l'oxydation de l'hydroquinone par une laccase est illustré par la figure 20 (Witayakran et Ragauskas, 2009).

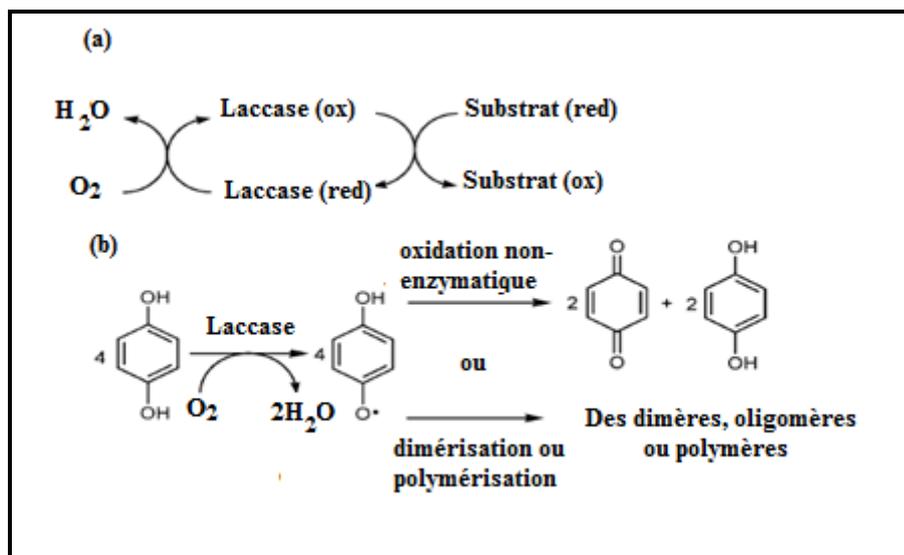


Figure 20. (a) Oxydation d'un substrat par une laccase. (b) Exemple de l'oxydation d'hydroquinone par une laccase (Witayakran et Ragauskas, 2009).

III.1.2. Les peroxydases

Les peroxydases ont été extraites à partir de plantes, de microorganismes et de quelques organismes supérieurs (Kobayashi et al., 1995). Les peroxydases des plantes, appelées aussi peroxydases de classe III, catalysent l'oxydation de plusieurs substrats dont les phénols en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce sont des glycoprotéines contenant de la ferriprotoporphyrine IX comme site actif (figure 21) (Hamid et al., 2009).

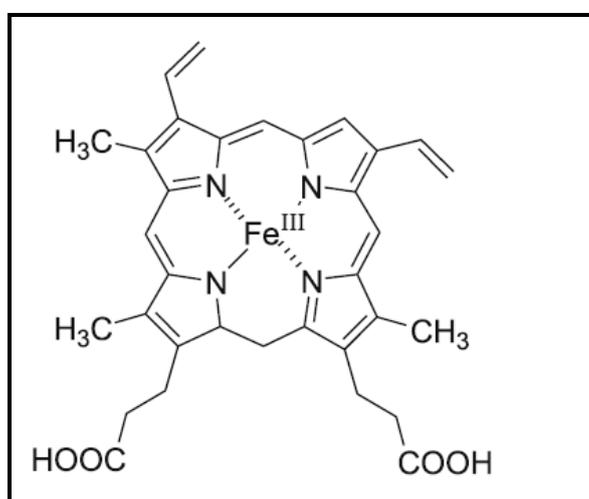


Figure 21. Site actif de la peroxydase de raifort (HRP) (Hamid et al., 2009).

Au cours de la réaction d'oxydation des phénols, le rôle de l'enzyme est de produire des radicaux phénoxy. Les radicaux phénoxy qui en résultent sont en mesure de former des polymères par processus de recombinaison. La polymérisation oxydante des phénols est essentiellement une réaction de polycondensation. Un modèle pour la polymérisation a été développé, qui divise la polymérisation en quatre étapes (figure 22) (Job et Dunford, 1976 ; Nayak, 1998). La première étape est la formation de radicaux phénoxy, suite à l'oxydation des composés phénoliques par la peroxydase de raifort (HRP). C'est la seule étape contrôlée par la cinétique de l'enzyme (figure 22a). Les radicaux phénoxy forment des dimères par recombinaison (figure 22b). Au début de la réaction, pratiquement tous les phénols sont convertis en dimères (Reihmann et Nayak, 2001 ; Sahoo et al., 2002). Lorsque la concentration des radicaux libres phénoxy diminue, une réaction de transfert d'électrons est plus probable qu'une réaction de recombinaison (Reihmann et Nayak, 2001), ce qui mène à la formation de radicaux d'oligomères (figure 22c). Ces radicaux d'oligomères vont contribuer à la formation d'oligomères de masse moléculaire encore plus élevée, par recombinaison (figure 22d) (Mejias et al., 2002 ; Sahoo et al., 2002).

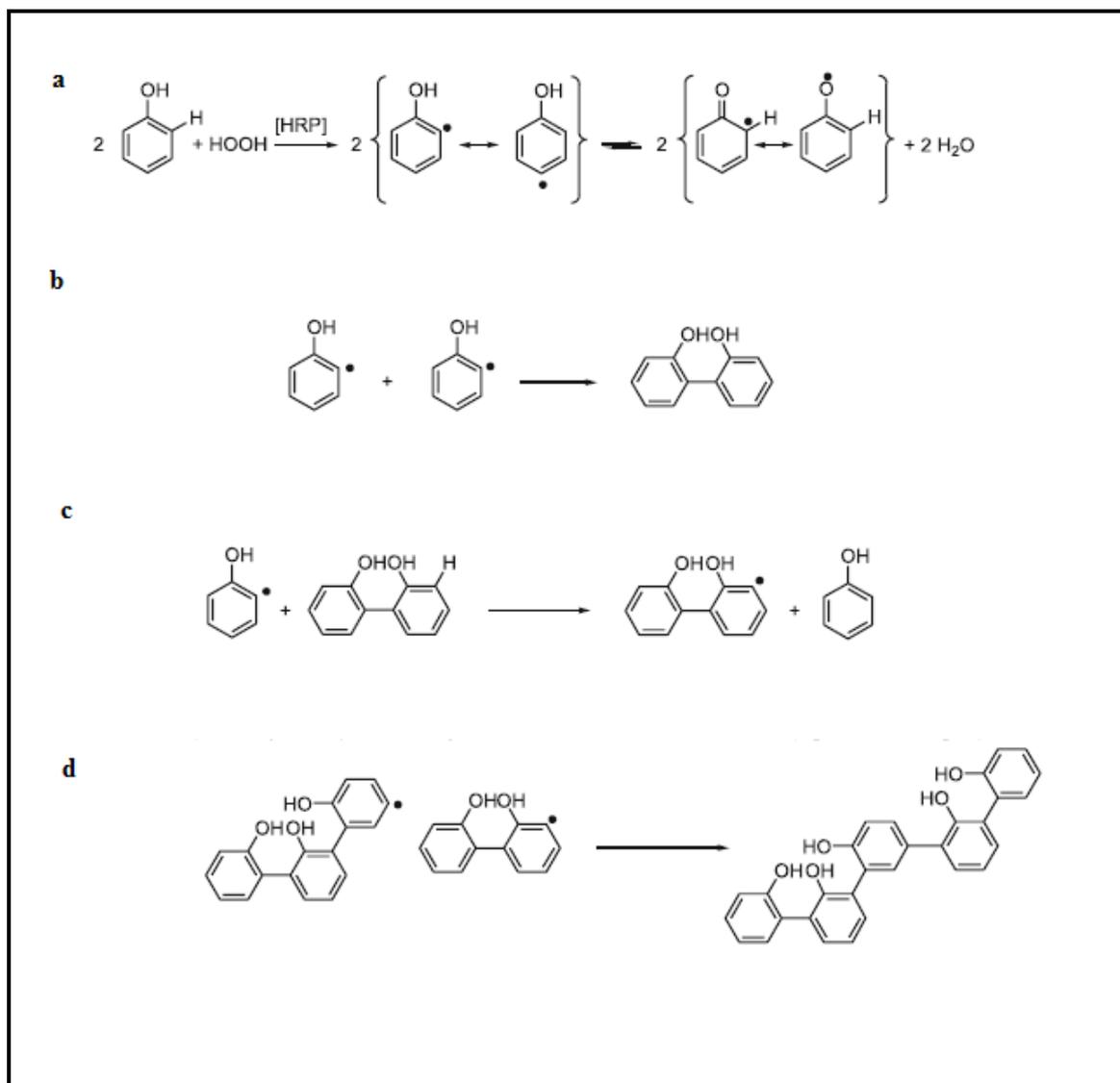


Figure 22. a: Formation des radicaux libres phénoxy, b: Recombinaison des radicaux phénoxy, c: Le transfert radicalaire, d: Formation d'oligomères en alternant le transfert radicalaire et la recombinaison.

III.2. L'effet des conditions opératoires sur la polymérisation

La masse moléculaire des oligomères obtenus dépend principalement des conditions de la réaction de polymérisation, le type de substrat, le type et l'origine de l'enzyme utilisée. Par conséquent, le choix des conditions opératoires doit être fait minutieusement afin de maintenir une activité enzymatique, tout en permettant la solubilisation du substrat. D'autre part l'enzyme nécessite un milieu aqueux pour exprimer son activité alors que les composés

phénoliques sont principalement solubles dans les solvants organiques peu polaires pour la forme génine et polaires pour les hétérosides. Ainsi il est essentiel de trouver un compromis qui permettra de satisfaire ces deux conditions.

III.2.1. Effet du type, de l'origine et de la concentration de l'enzyme sur la polymérisation

Le type (Laccase, peroxydase, tyrosinase...), l'origine (*Trametes versicolors*, *Trametes pubescens*, *Coprinus cenerius*, *Myceliphthora*...) ainsi que la concentration d'enzyme utilisée peuvent avoir un effet très important sur la performance de la réaction ainsi que sur les propriétés et la structure des polymères obtenus (Tableau 4). En effet, le rendement et la masse moléculaire moyenne en poids ($\overline{M_w}$), obtenus au cours de la polymérisation du 2-6 diméthylphénol ou de l'acide 4-hydroxybenzoïque, ont été variables selon le type de catalyseur utilisé (laccase ou peroxydase) (Ikeda et al., 1996 ; Ikeda et al., 1998). Ces observations ont été confirmées par Desentis-Mendoza et al. (Desentis-Mendoza et al., 2006) au cours de la polymérisation de la quercétine et du Kaempférol par la laccase ou la tyrosinase de *Ustilago maydis* (tableau 5) (Desentis-Mendoza et al., 2006). L'origine de l'enzyme affecte aussi la conductivité des polymères synthétisés. Ainsi, la conductivité des poly(catéchol) obtenus par catalyse en présence de HRP est de 5.10^{-9} s.cm⁻¹, contre 0.25×10^{-9} s.cm⁻¹ pour ceux obtenus en présence de la peroxydase de soja (soybean peroxidase (SBP)) (Dubey et al., 1998).

Tableau 4. Différents systèmes de polymérisation de composés phénoliques

Enzyme	Substrat	Différents paramètres de polymérisation				Observations	Références	
		Milieu réactionnel (Solvant+ tampon)		Cofacteur	Température (°C)			durée
		Solvants (%)	Tampon (pH)					
Laccase (TP) (3 U/ml)	Totarol (0.5 g/l)	-Méthanol (50) -Acétonitrile (50) -Acétone (50) -Acétate d'éthyle(50) -Chloroforme (50) -Méthyle <i>t</i> -butyl -Ether (50) -Toluène (50)	Acétate de sodium (4-7)	Oxygène	20, 30, 40 et 50	24 h	<u>Conditions optimales:</u> - T 30°C - solvant : acétone -pH 4.5- 5 <u>Résultats:</u> -Meilleur taux de conversion de 96,3%	(Ncanana et al., 2007)
Laccase (TP) (0.6 U/ml)	8-hydroxyquinoline (8,06 g/l)	-Acétone (8)	Acétate de sodium (5)	Oxygène	20-30-40-50 et 65	72 h	<u>Conditions optimales:</u> -T : 30 °C <u>Résultats:</u> -Meilleur taux de conversion de 76%	(Ncanana et al., 2007)
Laccase (TV) (0-5 U/ml)	Catéchol (25-10000 mg/l)	-Acétone (0, 10, 30, 50, 70)	Acétate (3-8)	Oxygène (8-22 mg/l)	25, 30, 35,40, 45, 50, 60	1h	<u>Conditions optimales:</u> -T: 25°C - Solvant: 10% acétone - pH: 5, -Enzyme : 0.02 U/ml - catéchol : 250 mg/ml -Oxygène : 10 mg/l	(Aktas et Tanyolas, 2003)
Laccase (TVi) et (THI) (30µU/ml)	Lignosulfonate de calcium (20 g/l)	- Eau bidistillée		Oxygène	30	17 h	<u>Résultats:</u> -La Mw augmente de 107% en présence de laccase de TVi et de 572% en présence de laccase de THI	(Nugroho et al., 2010)
Laccase (MYL) (1,45.10 ⁻⁶ , 5,5.10 ⁻⁶ , 14,5.10 ⁻⁶ U/ml)	Rutine (10 g/l)	-Méthanol (0, 30, 50, 70, 100)	Phosphate (7) Acétate (5)	Oxygène	Température ambiante	24 h	<u>Conditions optimales:</u> -Solvant: 30% methanol -Tampon: acétate Enzyme: 5,5.10 ⁻⁶ U/ml	(Kurisawa et al., 2003a)

							<p><u>Résultats:</u> - Un meilleur taux de conversion de 81 % -Un meilleur Mn de 9300 g/mol.</p>	
Laccase (MYL) (1.2, 2.0, 2.8, 3.6 U/ml)	Catéchine (5 g/l)	-Acétone (3-20) -Éthanol (5) -Méthanol (3- 20) -Isopropanole (5)	Acétate (5)	Oxygène	Température ambiante	24 h	<p><u>Conditions optimales:</u> -Solvant: 20% acétone et pH:5 (pour avoir le Meilleur taux de conversion) - Solvant: 7% acétone et pH:5 (pour avoir la Mn la plus important)</p>	(Kurisawa et al., 2003b)
							<p><u>Résultats:</u> - Un meilleur taux conversion de 95% - un meilleur Mn de7000 à 8000 g/mol.</p>	
laccase d'Urushi (10 U/ml)	Lignosulfonate (5 g/l)	Éthanol (70)	Phosphate buffer (7)	Oxygène	30	48h	- Taux de conversion: 86%	(Yoshida et al., 2009)
Laccase (PCL) (2.95 U/ml)	Acide Syringique (20 g/l)	-Acétone (40-50) -Acétonitrile (50) -1, 4- dioxane (50) -Éthanol (50) -Méthanol (50) -Méthyl ethyl ketone (50) -Acétone /chloroforme /tampon (33/17/50) -Acetone/ chloroforme/buffer (25/37.5/37.5)	Acétate (5)	Oxygène	Température ambiante	24 h	<p><u>Conditions optimales:</u> -Solvant: 50% 1, 4-dioxane.</p> <p><u>Résultats:</u> -Un meilleur taux de conversion de 86%.</p>	(Angerer et al., 2005)
Laccase (PCL) 50 U/ml)	Phénol, <i>m</i> -crésol, bispénol A, (30 g/l)	-Méthanol (50) -2-propanole (50) -1-propanole (50) -1,4-Dioxane (50)	Acétate (5)	Oxygène	Température ambiante	24 h	<p><u>Conditions optimales:</u> -Solvant: 50% acétone et le <i>m</i>-crésol comme substrat (pour voir le meilleur taux</p>	(Dai et Klibanov, 1999)

		-Acétone (50)						de conversion) -Solvant 50% 2-propanole et le bisphénol A comme substrat (pour avoir la Mn la plus importante)
Laccase (PCL) (2.95 U/ml)	2,6-diméthylphénol (12.4 g/l)	-Acétone (20- 90) -1, 4-dioxane (60) -Éthanol (60) -Méthanol (60)	Acétate (3-12)	- Laccase: Oxygène	Température ambiante	24 h	Laccase: <u>Conditions optimales:</u> -Solvant: 40% de 1,2 dioxane (pour avoir le meilleur rendement) -Solvant : 40% acétonitrile (pour avoir la plus importante M _w).	(Yu et Klibanov, 1999)
Péroxydase (HRP) (10 U/ml)				-Péroxydase: H ₂ O ₂			<u>Résultats:</u> -Meilleur rendement de 61%. -Une meilleure M _w de 8140 g/mol. HRP: <u>Conditions optimales:</u> - Solvant: 60% acétone (pour avoir le meilleur rendement). -Solvant : 40% éthanol (pour avoir la meilleure M _w) <u>Résultats:</u> -Meilleur rendement de 33%. -Meilleure M _w de 6290 g/mol	
Laccase (RV) (12.5 U/ml)	(+) Catéchine (3 g/l)	Isooctane (95) Héxane (95) Toluène (95) Dichlorométhane (95)	Eau	Oxygène	25	1 h	<u>Résultats:</u> Meilleur taux de polymérisation en présence de l'héxane	(Ma et al., 2009)
	(-) Epicatéchine						<u>Résultats:</u>	

	(3 g/l)						Meilleur taux de polymérisation en présence de l'héxane	
	Catéchole (3 g/l)						<u>Résultats:</u> Meilleur taux de polymérisation en présence de dichlorométhane	
HRP (18U/ml)	Phénol (18.8 g/l)	1,4-dioxane (60;80)	- Acétate (5) - Succinate (5.5) - Phosphate (7)	H ₂ O ₂	Température ambiante	48 h	<u>Conditions optimales:</u> - Solvant : Dioxane (60%) (pour avoir le meilleur taux de conversion) et (80%) (pour avoir la meilleure Mn)	(Uyama et al., 1997)
		-Acétonitrile (15/10) -Acétone (15/10) -1,4-dioxane (15/10) -Éthanol (15/10) -Acétate d'éthyl (15/10) -Méthanol (15/10) -Iso-propanole (15/10) -1,4 dioxane/ethyl acetate (10/10; 20/40/ ; 40/50)	Succinate (5,5)				<u>Résultats:</u> - Meilleur taux de conversion de 78%. -Meilleure Mn de 14700 g/mol	
							<u>Conditions optimales:</u> -Solvant: Méthonaol (60%) (pour avoir le meilleur taux de conversion), 1,4 dioxane/ acétate d'éthyle (20/40) (pour avoir la meilleure Mn.	
							<u>Résultats:</u> - Meilleur taux de conversion de 78%. - Meilleure Mn de 7500.	
HRP (95 U/ml)	-Phénols (5-20 g/l) -p-méthoxyphénol (5-20 g/l) -p-crésol (5-20 g/l) -p-chlorophénol (5-20 g/l)	Dioxane (0-100)	Acétate (5)	H ₂ O ₂	Température ambiante		<u>Conditions optimales:</u> - Solvant: dioxane (85%) - Substrat: p-phénylphénol	(Dordick et al., 1987)
							<u>Résultats:</u>	

	-2,6-diméthylphénol (5-20 g/l) - 4,4'-biphénol aniline (5-20 g/l) -1-naphtol (5-20 g/l) -2-naphtol (5-20 g/l) -p-tert-butylphénol (5-20 g/l) -p-phénylphénol (5-20 g/l)						- Meilleure masse moléculaire de 26000 g/mol
HRP (15 U/ml)	4,4'-biphenyldiol (10 g/l)	-Acétonitrile (80) -Acétone (80) -1,4-dioxane (80) -Acétate d'éthyle (80) - Alcool isopropylique (80) - Tétrahydrofurane (80)	Phosphate (7)	H ₂ O ₂	Température ambiante	24 h	<u>Conditions optimales:</u> (Bindhu et Abraham, 2003) - Solvant : Tétrahydrofurane (pour avoir le meilleur taux de conversion) - Solvant : alcool isopropylique (pour avoir la meilleure Mn) <u>Résultats:</u> - Meilleur taux de conversion de 97%. - Meilleure Mn de 21000 g/mol.
HRP (12,6 U/ml)	m-crésol (8,16 g/l)	Éthanol (0-100)	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES)	H ₂ O ₂ (en excès)	Température ambiante	24 h	<u>Conditions optimales:</u> (Krajewska, 2004) - Solvant : éthanol (20%) <u>Résultats:</u> - Un taux de conversion supérieur à 90% et une M _w de 7000 g/mol.
HRP (1 mg)	Catéchol (5 g/ml)	-	phosphate de potassium (4.3)	H ₂ O ₂	Température ambiante	-	<u>Résultats:</u> (Nabid et al., 2010) - Un taux de conversion de 90%.
HRP	m-éthynylphénol (24 g/l)	Méthanol (50)	Phosphate buffer (7)	H ₂ O ₂	Température ambiante	3h	<u>Résultats:</u> (Tonami, et al., 2000) - Une M _w de 1700 g/mol.

Chapitre Bibliographique

HRP (8.8 U/ml)	-Bisphénol dihydroxydiphényl méthane (2 g/ml)	Acétone (50) 2-propanol (50) Méthanol (50) Acétone (50)	Phosphate (7)	H ₂ O ₂	Température ambiante	3h	<p>HRP: <u>Conditions optimales:</u> - Solvant: 2-propanol (pour avoir le meilleur taux de conversion et la meilleure M_w).</p> <p><u>Résultats:</u> - Un meilleur taux de conversion de 100%. - Une meilleure M_w de 5400 g/mol.</p> <p>SBP: <u>Conditions optimales:</u> - Solvant: 2-propanol (pour avoir le meilleur taux de conversion et la meilleure M_w).</p> <p><u>Résultats:</u> - Un meilleur taux de conversion de 99%. - Une meilleure M_w de 3040.</p>	(Rogalski et al., 1995)
HRP (2 U/ml)	Phénol (4,7 g/l)	-	Phosphate (7)	H ₂ O ₂	Température ambiante	1 h	<p><u>Résultats:</u> - Un meilleur taux de conversion de 96%. - Une meilleure Mn de 58200 g/mol.</p>	(Kim et al., 2008)
HRP (5 U/ml)	Catechin (1,45 g/ml)	Méthanol (30)	Phosphate (7)	H ₂ O ₂	Température ambiante	24 h	<p><u>Résultats:</u> - Un taux de conversion de 93%. - Une Mn de 14000 g/mol.</p>	(Kurisawa et al., 2003c)

SBP (0.1mg/ml)	<i>p</i> - cresol (2,5 g/ml)	-1-butyl-3- methylimidazolium tetrafluoroborate (BMIM(BF ₄)) (50)	Phosphate (7)	H ₂ O ₂	Température ambiante	22.5 h	<u>Résultats:</u> -Meilleur taux de conversion de 80% en présence des deux liquides ioniques. -Meilleure Mn de 1530 g/mol en présence de (BMPy(BF ₄))	(Eker et al., 2009)
	<i>p</i> -Phénylphénol (12g/ml)	-1-butyl-3- methylpyridinium tetrafluoroborate (BMPy(BF ₄)) (50)					<u>Résultats:</u> -Meilleur taux de conversion de 99.7% en présence de (BMPy (BF ₄)) (10%). - Meilleure de Mn de 1860 g/mol en présence de (BMPy (BF ₄)) à 70%.	
	-Phénol (5g/l) -1-Naphthol (5g/l) -2-Naphthol (5g/l)	(BMPy (BF ₄)) (70)					<u>Résultats:</u> -Meilleur taux de conversion de 83% en présence de 1-Naphthol. -Meilleur M _w de 2900 g/mol en présence du phénol.	

Avec : HRP: peroxydase de raifort, SBP: peroxydase de soja, Tv: laccase de *Trametes versicolor*, PCL: laccase de *Picnoporus coccineus*, CCP: laccase de *Coprinus cineris*, TP: laccase de *Trametes pubesens*, MYL: laccase de *Myceliophthora*, RV: laccase de *Rhus vernicifera*, TVi: laccase de *Trametes villosa*, THI: Laccase de *Myceliophthora thermophyla*, : M_w: la masse moléculaire moyenne en poids, M_n: la masse moléculaire moyenne en nombre.

Tableau 5. Effet du type de catalyseur sur les performances de la polymérisation

Monomère	Catalyseur	Origine	taux de transformation (%)	Mw	PD	Références
2-6 diméthylphénol	Peroxidase	HRP	33	57600	1.8	(Ikeda et al., 1996)
		SBP	38	81000	1.8	
	Laccase	CCP	57	5400	2	
Acide 4-hydroxybenzoïque	Peroxidase	HRP	79	13200	-	(Ikeda et al., 1998)
		SBP	72	14700	-	
	Laccase	CCP	62	11500	-	
		PCL	80	7700	-	
		MYL	83	9600	-	
		POL	0	-	-	
Kaempférol	Tyrosinase	UMT	-	6500	-	(Desentis-Mendoza, et al., 2006)
	laccase	UMT	-	9000	-	
Quercétine	Tyrosinase	UMT	-	236	-	
	laccase	UML	-	1785	-	

Avec: M_w : la masse moléculaire moyenne en poids; PD: polydispersité ; CCP: laccase de *Coprinus cenerius*; PCL: laccase de *Pycnoporus coccineus*, MYL: laccase de *Myceliophthora*, POL: Laccase de *Pyricularia oryzae*, UMT: Tyrosinase de *Ustilago maydis*, UML : Laccase de *Ustilago maydis*, HRP: peroxydase de raifort, SBP: peroxydase de soja

Les enzymes utilisées au cours de la réaction de polymérisation, sont soit sous forme libre, immobilisée, ou associée à des surfactants.

III.2.1.1. Enzymes sous forme libre

Afin de pouvoir utiliser les enzymes sous leur forme libre et éviter leur dénaturation par les solvants organiques, l'enzyme doit être copolymérisée avec des molécules hydrophobes ou il faut ajouter un surfactant. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté que l'activité des oxydoréductases est maintenue, même dans des milieux totalement organiques, grâce à l'association de molécules surfactants aux enzymes (Paradkar et Dordick, 1994 ; Kamiya et al., 2000).

L'activité des oxydoréductases varie également selon qu'elles sont pré-solubilisées dans une solution aqueuse ou dispersées sous forme solide directement dans le milieu réactionnel (Kazandjian et Klibanov, 1985 ; Dai et Klibanov, 1999). La lyophilisation de l'enzyme en présence du substrat, ou d'un composé hydrophobe, ou encore en présence d'un lyoprotectant

hydrophile augmente son activité par rapport à son utilisation sous forme dispersée (Kazandjian et Klibanov, 1985). Outre l'activité des enzymes, leur régiosélectivité a été augmentée par co-lyophilisation. En effet Yu et Klibanov (Yu et Klibanov, 2006) ont montré une plus grande régiosélectivité de la peroxydase de raifort (HRP) lyophilisée en présence de D-proline par rapport à la même enzyme non co-lyophilisée.

III.2.1.2. Enzyme sous forme immobilisée

Les enzymes étant solubles dans l'eau et très fragiles, leur purification après usage ne peut généralement être envisagée favorablement, surtout à l'échelle industrielle. Pour différentes raisons y compris la valeur commerciale élevée des enzymes, on s'est forcé de mettre au point des méthodes permettant leur réutilisation, une fois la réaction enzymatique achevée (Tischer, 1999).

L'une de ces méthodes est l'ultrafiltration, mais il semble que celle qui a donné naissance aux plus grands développements consiste à rendre l'enzyme insoluble par un traitement physique ou chimique convenable, suffisamment doux et sélectif pour éviter une perte trop importante d'activité biologique (Dickinson et Fletchert, 1989). L'enzyme ainsi insoluble (ou immobilisé) peut catalyser, en milieu hétérogène cette fois, les réactions susceptibles de l'être en phase homogène par l'enzyme soluble initial. Le dérivé insoluble est ensuite récupéré par filtration, sédimentation ou centrifugation et peut servir à nouveau (Qiu et al., 2009).

Il existe cinq méthodes générales d'immobilisation des enzymes à savoir l'adsorption, la microencapsulation, l'inclusion, la réticulation, et la fixation chimique sur un support insoluble.

III.2.2. Effet du pH

Certains auteurs ont indiqué qu'un pH élevé provoque la baisse du potentiel rédox du substrat, induisant ainsi une importante différence entre le potentiel rédox du substrat et celui du site actif de la laccase (Xu, 1997 ; Shimoda et Smela, 1998 ; Papinutti et al., 2008). D'autre part,

les enzymes catalytiques fonctionnent dans une gamme de pH optimum bien déterminés. Par exemple le pH optimum pour les laccases fongiques est situé entre 3,5 et 7 alors qu'il est à 9 pour les laccases d'origine végétale (Witayakran et Ragauskas, 2009). Ce pH ne correspond pas toujours au pH optimum pour le déroulement de la réaction de polymérisation. En effet, le meilleur taux de conversion du bisphénol, en présence de la laccase de *Trametes versicolor* est obtenu à un pH 5, alors que le pH idéal pour cette enzyme est de l'ordre de 6 à 8. De plus, le pH peut influencer le taux de conversion et la masse moléculaire des oligomères (Dubey et al., 1998 ; Anthoni et al., 2008).

Il a été également démontré que le pH peut affecter le type de pontage entre unités monomériques. Un pH acide favorise les pontages C-C alors que les pontages C-O sont majoritaires à pH basiques (Roubaty et al., 1978).

III.2.3. Effet de la température

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de la température sur la polymérisation et ont montré que ce facteur peut affecter l'activité de la laccase, ainsi que le taux de conversion, la solubilité et la stabilité du substrat (Aktaş et al., 2000 ; Masuda et al., 2001 ; Aktas, 2005 ; Guresir et al., 2005 ; Anthoni et al., 2010).

La température optimale pour les laccases fongiques est située en général entre 50 et 70°C (Baldrian, 2006). Cependant, certaines laccases fongiques atteignent leurs activités maximales à des températures inférieures à 50°C, tel est le cas de la laccase de *Ganoderma lucidum* et de *Trametes versicolor*, dont la température optimale est de 25°C.

La température optimale pour le déroulement de la polymérisation ne correspond pas toujours à celle de l'enzyme; citons par exemple le cas de la polymérisation du bisphénol A par la laccase de *Trametes versicolor*, dont le meilleur taux de conversion a été noté à 45°C, tandis que la température optimale de l'enzyme est de 25°C (Kim et Nicell, 2006).

III.2.4. Effet du substrat sur la polymérisation

Pour une même enzyme, le type de substrat peut affecter le rendement de conversion et la taille des polymères (tableau 6). Certains auteurs attribuent cette différence de rendement à la différence de solubilité des divers substrats (Mita et al., 2003). D'autres auteurs ont lié la faible ou l'absence de réactivité d'un substrat à leurs potentiels rédox (tableau 7) (Canforma et al., 2008). En effet, ces auteurs indiquent que les substrats ayant des groupements donneurs d'électrons (tels que CH₃, CH₂-CH₃) sont susceptibles d'augmenter le taux d'oxydation, contrairement aux substrats ayant des groupements accepteurs d'électrons. Par conséquent, il sera plus difficile d'arracher un électron au substrat afin de l'oxyder, ainsi le taux de réduction diminue (Canforma et al., 2008).

Tableau 6. Effet du substrat sur la polymérisation en présence de la peroxydase de raifort (HRP)

Molécule	M _w	Rendement (%)	Référence
Phénols	1400	-	(Dordick et al., 1987)
p-méthoxyphénol	2000	-	
p-cresol	1900	-	
p-chlorophénol	600	-	
2,6-diméthylphénol	500	-	
4,4'-biphénol	400	-	
Aniline	1700	-	
1-naphtol	très important	-	
2-naphtol	2000	-	
p-tert-butylphénol	1900	-	
p-phenylphénol	26000	-	
4-cyclohexylphénol	1200	86	(Osiadacz et al., 1999)
4- <i>t</i> -butylphénol	1674	98	
4-isopropylphénol	2380	99	
4-méthoxyphénol	1159	100	

Avec : M_w : la masse moléculaire moyenne en poids.

Tableau 7. Effet de la nature et du potentiel rédox du substrat sur la polymérisation en présence de la laccase de *Trametes versicolor* (Da Silva et al., 1994).

Substrat	Substituant	Rendement (%)	Potentiel redox (V)
Acide caféique	-CH-CH-COOH	99	+ 0.53
Cathéchol	OH	100	+0.53
Acide 2,6-hydroxybenzoic	-COOH	0	+1.0
Acide 3-hydroxybenzoic	-COOH	50	+1.02
Acide 3-hydroxyphenylacetic	-CH ₂ -COOH	3	+1.06
4-hydroxybenzaldehyde	-COH	0	-
Hydroxytyrosol	-CH ₂ -CH ₂ OH	88-100	-
Méthylcathéchol	-CH ₃	98	+0.77
Acide protocatechuic	-COOH	46	+0.79
Acide Synergique	-OCH ₃	87	+0.68
m-Tyrosol	-COOH		
	-CH ₂ CH ₂ OH	39	-

III.2.5. Effet du solvant sur la polymérisation

En milieu aqueux, les réactions de polymérisation des composés phénoliques sont souvent limitées par la faible solubilité du substrat. En revanche, en milieu organique, la réactivité est plutôt freinée suite à la dénaturation des enzymes dans cet environnement.

La nature du solvant organique, ainsi que le rapport en volume de solvant organique/ volume de tampon influence le rendement, la solubilité, la structure et la masse moléculaire moyenne des polymères (Ikeda et al., 1996 ; Ikeda et al., 1998 ; Kurisawa et al 2003a ; Mita et al., 2003). En effet, Anthoni et al. (Anthoni et al., 2008) ont utilisé différents mélanges eau/ solvant organique (30 :70 v/v) au cours de la polymérisation de la rutine par la laccase de *Trametes versicolor*. Six solvants ont été utilisés à savoir : l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide (DMF), de l'acétonitrile et le tétrahydrofurane. Ces auteurs indiquent que

le meilleur indice de la masse moléculaire moyenne en poids (M_w) a été obtenu en présence du méthanol, alors que le rendement en polymère est meilleur en présence de l'éthanol (Anthoni et al., 2008). Aussi, une simple variation du pourcentage de dioxane de 10 à 85 % dans de l'eau mène à des variations de masse moléculaire de 500 à 26000 Da (Dordick et al., 1987). En parallèle, l'activité enzymatique décroît quand le pourcentage de dioxane augmente mais les polymères restent en suspension ce qui permet l'allongement de la chaîne polymérique. De même, la variation du pourcentage de méthanol de 30 à 50% dans l'eau conduit à une diminution de l'indice de la masse moléculaire moyenne en poids ($\overline{M_w}$) et la quantité de polymère (Anthoni et al., 2008).

En outre, les solvants ont des effets sur la structure des polymères et la sélectivité de la réaction et ceci aussi bien avec la peroxydase de raifort (HRP) qu'avec la laccase. Ainsi, lorsque la coefficient de partage ($\log P$) du solvant augmente, la proportion d'unité phénylène diminue (Oguchi et al., 2000 ; Mita et al., 2003). Intra et al. (Intra et al., 2005) ont montré qu'au cours de l'oligomérisation du totarol par la laccase de *Trametes pubescence*, le pontage C-O est favorisé par la diminution de l'hydrophobicité du co-solvant. Cette sélectivité pourrait être attribuée à un effet intrinsèque du solvant sur la formation de pontage ou à un effet du solvant sur l'enzyme.

III.3. Type de pontage mis en évidence au cours de la polymérisation enzymatique

Différents types de pontage ont été décrits dans la littérature, dans le cadre de polymérisation enzymatique d'espèces phénoliques, de type C-O, C-C mais aussi C-N (Pilz et al., 2003 ; Anthoni et al., 2008 ; Anthoni et al., 2010).

Ainsi, Uzan et al. (Uzan et al., 2011) ont pu émettre l'hypothèse que des pontages C8-C8 et C6-O4 peuvent avoir lieu lors de la polymérisation de la rutine, par la laccase de *Pycnoporus coccineus* et de *Pycnoporus sanguineus* (figure 23).

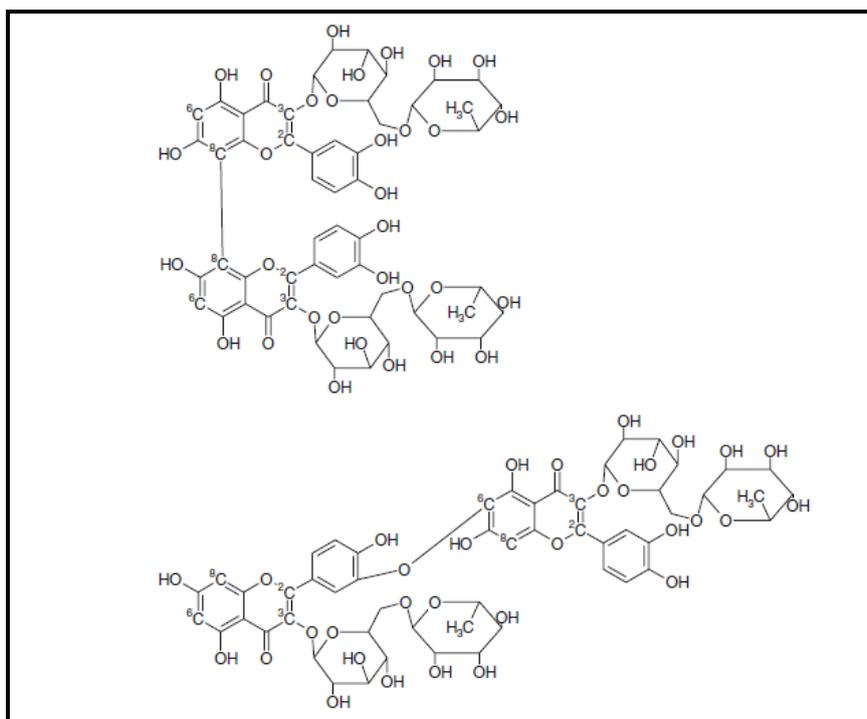


Figure 23. Pontages proposés lors de la polymérisation de la rutine par la *Pycnoporus coccineus* et *Pycnoporus sanguineus* (Uzan et al., 2011).

Par ailleurs, l'oligomérisation de la catéchine par la peroxydase de raifort (HRP) aboutit à un dimère formé par des pontages de type C5'-C8 ou C2-C8 (Hosny et al., 2002).

Seuls quelques auteurs démontrent la structure des oligomères formés par catalyse enzymatique, mais la majorité d'entre eux émettent des hypothèses. En effet, Pinelo et al. (Pinelo et al., 2004), indiquent que la polymérisation de la quercétine en présence de la peroxydase de raifort (HRP) se fait à travers des pontages de type C5'-C8. Mejias et al. (Mejias et al., 2002) observent une bande infrarouge vers 1158 cm^{-1} correspondant à un pontage éther, puis s'appuient sur les délocalisations électroniques pour supposer un pontage de type C-O au niveau du cycle B lors de l'oligomérisation de la rutine par la peroxydase de raifort (HRP) et SBP.

Tableau 8. Types de montage mis en évidence au cours de différentes réactions de polymérisation.

Enzyme	Substrat	Pontage (technique analytique)	Référence
Laccase de <i>Trametes versicolor</i>	Rutine	C-C (IR) C2'-O4', C2'-C2' (RMN)	(Anthoni et al., 2008)
	Esculine	C-C, C-O (IR) C8-C8 (modélisation moléculaire)	(Anthoni et al., 2010)
Laccase de <i>Pycnoporus coccineus</i> et de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	Rutine	C8-C8, C6-O4	(Uzan et al., 2011)
Laccase de <i>Rhus vernificera</i>	Hydroquinone	C-C (RMN)	(Hosny et al., 2002)
	(-) épicatechine	C-C (IR)	(Ma et al., 2009)
Laccase de <i>Picnoporus coccineus</i>	2,6-diméthylphénols	C-O (IR)	(Ikeda et al., 1996)
HRP, SBP HRP	Quercétine	C-O (FTIR)	(Mejias et al., 2002)
	4-[4-phenylazo-phenylimino)-methyl]phenol	C-O (IR)	
Laccase <i>Myceliophthora</i>	Catéchine	C-C (FTIR)	(Kurisawa et al., 2003b)
Laccase <i>Trametes villosa</i>	Bisphenol A	C-C (RMN)	(Uchida et al., 2001)
Laccase <i>T. versicolor</i>	α -naphthol	C-O (FTIR)	(Aktas et al., 2000)
Laccase <i>picnoporus coccineus</i>	Acide syringique	C-O (RMN)	(Ikeda et al., 1996)
Laccase <i>picnoporus coccineus</i>	Phénols	C-O suggéré (FTIR)	(Mita et al., 2003)
Laccase <i>Trametes pubescens</i>	Totarol	C-O et C-C (RMN)	(Ncanana et al., 2007)
Laccase <i>Pycnoporus coccineus</i>	Phénols	C-O et C-C (FTIR, méthode de titrage des liaisons éther)	(Mita et al., 2003)

Bien que la polymérisation des flavonoïdes et des coumarines ait été avancé par plusieurs auteurs, la détermination de type de pontage est le plus souvent donnée sous forme d'hypothèses. Nous allons dans ce travail fractionner les oligomères obtenus afin d'avoir plus de chances de pouvoir déterminer avec précision les diverses liaisons susceptibles d'avoir lieu au cours de la polymérisation de la rutine et de l'esculine. Nous nous sommes également

focalisés au cours de ce travail, contrairement aux autres auteurs, sur l'effet de la masse moléculaire moyenne des oligomères obtenus sur les activités antiradicalaires et antioxydantes ; en plus d'étudier des activités pour la première fois, pour les fractions d'oligorutines et oligoesculines telles que les activités génotoxique/mutagène, antigénotoxique/antimutagène vis-à-vis d'un système procaryote et eucaryotes, en plus de l'activité immunomodulatrice.

MATÉRIELS ET METHODES

Matériels et Méthodes

A. Matériels :

La rutine, l'esculine et la laccase de *Trametes versicolor* (21,4 U/mg) proviennent de Sigma Aldrich

I. Matériels biologiques

I.1. Bactéries utilisées

I.1.1. Souches utilisées pour l'étude des activités mutagènes et antimutagènes à l'aide du test d'Ames :

Deux souches bactériennes *Salmonella typhimurium* TA102 et TA104 qui dérivent d'une souche originelle *Salmonella typhimurium* LT2 ont été utilisées pour réaliser le test d'Ames. Elles ont été offertes par le Pr. J. Felzenswalb, (Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brésil) et ont été conservées selon la méthode décrite par (Maron et Ames, 1983).

Ces souches sont porteuses d'une mutation au niveau de l'opéron histidine qui les rend auxotrophes vis-à-vis de cet acide aminé, et par conséquent elles sont incapables de pousser sur un milieu minimum dépourvu d'histidine.

Cette mutation, de type non sens *hisG428*, est une mutation par substitution A-T chromosomique chez la souche *S. typhimurium* TA104 et plasmidique (plasmide pAQ1 en copie multiples) chez la souche *S. typhimurium* TA102, avec délétion du gène normale au niveau du chromosome. Le plasmide pAQ1 porte également le gène de résistance à la tétracycline.

S. typhimurium TA102 diffère aussi de *S. typhimurium* TA104, et des autres souches d'Ames, par l'intégralité du gène *-uvrB*. En effet, la mutation *-uvrB* portée dans ce cas uniquement par *S. typhimurium* TA104 bloque le processus de réparation des lésions par excision-resynthèse et augmente la réparation fautive SOS. Cette délétion affecte également les gènes de la nitroréductase (*chl*) et de la biotine (*bio*) (Tableau 1). Outre la mutation *his-*, ces souches

sont porteuses d'un certain nombre de mutations communes (Ames et al., 1975 ; Maron et Ames, 1983) notamment :

- La mutation *rfa* qui affecte la structure de la membrane externe et augmente la perméabilité des souches aux molécules de masse moléculaire élevées.
- Le facteur de résistance R à l'Ampicilline qui est un plasmide pKM 101 et qui porte les gènes *mucA* et *mucB* amplifiant ainsi le processus de réparation fautive SOS responsable de la mutagenèse induite.

Les souches *Salmonella typhimurium* TA102 et TA104, comparées aux autres souches d'Ames présentent la particularité de détecter les agents mutagènes qui ont un effet prooxydant, autrement dit ceux qui génèrent des radicaux notamment les espèces réactives oxygénées (Ames et al., 1975 ; Maron et Ames, 1983).

Tableau 1. Génotype des souches *Salmonella typhimurium* TA102 et TA104.

Souches	Mutation histidine	Perméabilité de la membrane	Réparation	Facteur R (PKM101)	Matériel génétique porteur de la mutation His-
<i>S. typhimurium</i> TA102	His G428	<i>rfa</i>	+ <i>uvrB</i>	+ R	Plasmide pAQ1 (30 copies)
<i>S. typhimurium</i> TA104	His G428	<i>rfa</i>	- <i>uvrB</i>	+ R	Chromosome

His : mutation histidine.

Rfa : C'est une mutation qui élimine la chaîne latérale polysaccharidique du lipopolysaccharide qui couvre la surface bactérienne, rendant celle-ci plus perméable et complètement apathogène.

uvrB : C'est une délétion qui élimine le système de réparation par excision de l'ADN.

R : C'est un facteur de résistance plasmidique pKM101 permettant d'obtenir des souches résistantes à l'ampicilline.

I.2. Lignées cellulaires utilisées

La lignée cellulaire utilisée est la lignée cancéreuse humaine K562 ; ce sont des cellules humaines érythrolymphoblastiques HLA négatives provenant d'un sujet atteint de CML (Chronic Myelogenous Leukemia) en crise blastique (Akiyama et al., 2002). Cette population cellulaire est très indifférenciée, nonadhérentes et arrondies, elle constitue un bon matériel pour la réalisation des essais *in vitro*.

III. Composition des milieux de culture et des tampons:

- Oxoïde N°2

Ce milieu est formé par 4,3 g/l de peptone de viande, 4,3 g/l de peptone de levure, 6,4 g/l de chlorure de sodium. Le pH est ajusté à 7,5. Ce milieu est ensuite stérilisé par autoclavage pendant 15 min à 120°C.

Ces milieux sont ensuite stérilisés par autoclavage pendant 15 minutes à 120°C.

- Milieu minimum M63 utilisé pour le test d'Ames

Le milieu M63 est constitué d'un mélange contenant de l'agar (1,5 %), du $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 M), du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15,14 mM), du $(\text{Fe SO}_4)_7 \text{H}_2\text{O}$ ($0,7 \cdot 10^{-3}$ mM) et du glucose (0,2 %). Avant d'ajuster le volume à 1 litre, le pH doit être ajusté à 7, par du KOH (10 M), la solution est ensuite stérilisée par autoclavage pendant 15 mn à 120° C.

- Milieu STA

Pour préparer 1 l du milieu STA on doit utiliser 15 g d'agar, 40 ml de milieu M63, 2 ml de lactose (20%), 0,5 ml de Glucose (20%), 2 ml de tryptophane (1%), 2 ml d'histidine (1%), 2 ml de thréonine (1%), 2 ml d'uracile (1%), 2 ml de thiamine (1%), 2 ml d'ampicilline (10 mg/ml), 2 ml d'X-gal (20 mg/ml) et de l'eau distillée qsp 1 l. On porte à ébullition pendant 10 min.

- Gélose nutritive « Top agar »

C'est un milieu à 0,6% d'agar-agar. Il est supplémenté de NaCl (85,55 mM) et une solution d'histidine-biotine 0,5 mM. Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 15 mn à 120°C.

- Milieu de croissance cellulaire :

Le milieu utilisé pour réaliser la culture cellulaire des cellules K562 est le milieu synthétique RPMI 1640, supplémenté par la L-glutamine (4 %), source d'énergie indispensable et facteur limitant du cycle de Krebs, et de 10% de sérum de veau foetal (SVF) qui fournit les facteurs de croissance indispensables. Le milieu est additionné de 1% d'antibiotiques (gentamycine (100 µg/ml)) en vue de diminuer le risque de contamination bactérienne.

- Préparation d'homogénat de foie de souris "S9" (extrait enzymatique de métabolisation)

L'extrait S9 contient les enzymes nécessaires à la métabolisation des molécules testées pour leur effet génotoxique et antigénotoxique indirects. La préparation de S9 commence par le traitement des souris (BalbC) pesant approximativement 30 g par l'Aroclor (500 mg/kg de poids corporele) celui ci est un activateur enzymatique hépatique, que l'on dilue dans l'huile d'olive à une concentration de 200 mg/ml. Les souris reçoivent une seule injection intra-péritonéale, cinq jours avant leur sacrifice pour activer le système enzymatique hépatique. Pendant cette période, les souris reçoivent la nourriture et l'eau jusqu'à 12 h avant le sacrifice. A la fin du cinquième jour, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale, et leurs foies prélevés stérilement et séchés sur la gaze stérile, puis pesés dans un bécher et lavés plusieurs fois par une solution de KCl (0,15 M) fraîche. Ces lavages sont nécessaires pour nettoyer les foies et éliminer l'hémoglobine qui peut inhiber l'activité des enzymes à cytochrome P450. En étape finale, les foies sont coupés en petits morceaux et broyés dans 3 volumes d'une solution contenant du Na_2HPO_4 (50 mM), du KCl (0,15 M), de l'EDTA (2,5 mM), du sorbitol (400 mM) et du PMSF (0,2 mM), à raison de 3 ml de ce mélange/g de foie. L'homogénat est centrifugé pendant 10 min à 9000 g et à 4°C. Le surnageant est récupéré et réparti dans des tubes qui seront conservés à -80°C (Garnier et al., 1972; Maron et Ames, 1983).

- Préparation du S9 mix

Le S9 mix est formé par 2 ml d'homogénat de foie S9, 1 ml de MgCl_2 - KCl 0,4 M, 0,25 ml de glucose-6-phosphate 1 M, 2 ml de NADP 0,1 M, 25 ml de tampon phosphate buffer 0,2 M à pH=7,4 et 19,75 ml d'eau distillée. Toutes les solutions sont préparées stérilement.

- Tampon de lyse des cellules eucaryotes (test des comètes)

Les cellules sont traitées par un mélange de 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris et 1 % sacarosinate de Na (pH = 10). Avant son utilisation on ajoute à la solution de lyse, 1 % de Triton X100 et 10 % de DMSO.

- Tampon d'électrophorèse utilisé pour le test des comètes

Le tampon d'électrophorèse est formé d'un mélange de 75 ml de NaOH 10 N et 12,5 ml EDTA 200 mM dans un volume final de 2,5 l de H₂O.

- Solution de neutralisation utilisée pour le test des comètes

Il s'agit d'une solution Tris-base 0,4 M. Le pH est ajusté à 7,5 avec du HCl concentré.

- Tampon de lyse des érythrocytes pour le test de prolifération des splénocytes

Ce tampon est formé d'un mélange de 7,702 g de NaCl (0,144 M) et 2,059 g de Tris base (0,017 M) pour un litre de tampon. Le pH est réglé pour être entre 7,2 et 7,4.

-Tampon Griess

Ce tampon contient 1% de sulphamide, 0,1% de naphthylenediamine et 5% d'acide phosphorique.

- Tampon citrate (0,1 M)

Il contient 19,21 g d'acide citrique pour 1 litre de tampon. Le pH est ensuite ajusté à 5.

- Tampon borate (0,2 M)

Ce tampon est composé de 12,36 g d'acide borique pour 1 litre de tampon. Le pH est ajusté à 9,8.

IV- Mutagènes et génotoxiques de références utilisés

IV. 1. Le méthyle méthane sulfonate

Le méthyle méthane sulfonate (MMS) (Figure 24) est un mutagène direct sous forme liquide et incolore ; il est fortement irritant par inhalation ou ingestion. Il forme des composés fortement corrosifs en présence de l'eau. Le MMS est très toxique que ce soit pour l'homme

ou les animaux et mêmes les bactéries et il s'est avéré cancérigène, mutagène et tératogène pour les rongeurs (Bateman et al., 1996).

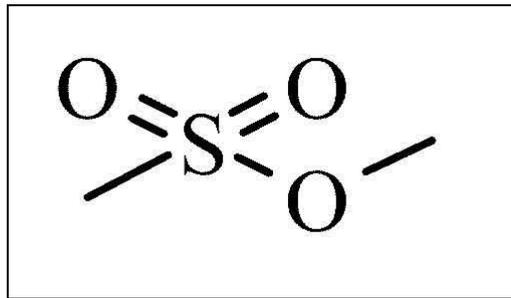


Figure 24. Structure Chimique du méthyle méthane sulfonate (MMS).

IV.2. Le 2-aminoanthracène :

Le 2-aminoanthracène est un hydrocarbure aromatique polycyclique substitué par une amine (Figure 25), qui a pour cible principalement les poumons, le foie, les reins et les intestins et à un moindre degré les graisses, les muscles et le cerveau. Il s'agit bien d'un très fort mutagène indirect (Charles et al., 1984).

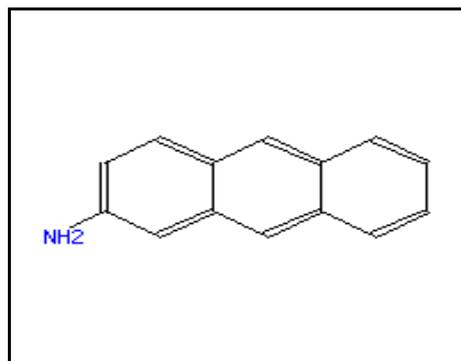


Figure 25. Structure chimique du 2-Aminoanthracène (2-AA).

IV.3. Le peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂) :

Il s'agit d'un oxydant puissant, dont le mécanisme d'action est mal connu, qui provoque des lésions de l'ADN, par les radicaux hydroxyles OH[•], de certaines bactéries et cellules de mammifères. De même, il s'est avéré qu'il possède un potentiel tératogène (anomalies de fœtus chez des rates pour des doses mortelles). Cependant, le H₂O₂ n'a aucun effet marqué de

cancérogène chez des rats et des souris auxquels il a été administré par voies orale, cutanée et sous-cutanée (Hagensee et Moses, 1989).

B- Méthode

I. Conduite de l'oligomérisation

Les réactions d'oligomérisation ont été menées dans des réacteurs agités (600 rpm/min), à double enveloppe pour une température régulée à 20°C. Cinquante grammes de rutine ou d'esculine ont été ajoutés à 1L de méthanol/eau (30 :70 v/v). Après une solubilisation à 20°C pendant 24 h, la réaction de polymérisation a été déclenchée par l'ajout d'une solution de laccase de *Trametes versicolor* (3U/ml). La durée de la réaction de polymérisation de la rutine et de l'esculine est de 24h et 72h, respectivement. Des prélèvements réguliers ont été réalisés tout au long de la réaction de polymérisation de la rutine et de l'esculine. Les prélèvements ainsi obtenus ont été analysés par SEC-UV (Chromatographie d'exclusion stérique-UV) en utilisant le diméthylformamide (DMF) avec 1% de LiBr comme éluant. Ces analyses SEC-UV ont permis de déterminer la cinétique de polymérisation de chacun des monomères étudiés.

II. Séparation des oligomères par filtration tangentielle

Les procédés de filtration associant des membranes semi-pérmeables et un flux tangentiel consistent à séparer, en fonction de leur poids moléculaire et de leur taille, des éléments dissouts ou en suspension. En créant une différence de pression entre le retentât et le perméat, la membrane fait office de filtre. Les substances plus petites que les pores de la membrane sont entraînées avec le solvant, dénommé "perméat", tandis que les molécules ou les particules plus grosses sont retenues comme "retentât". La filtration tangentielle présente l'avantage de minimiser les phénomènes de dépôt et de colmatage par rapport à d'autres types de filtration.

II.1. Protocole

1 L de milieu réactionnel a été récupéré à la fin de la réaction et a été filtré sur différentes membranes de 50, 5, 3 et 1 KDa successivement. 5 L de méthanol/eau (30 :70 v/v) ont été ajoutés au cours de chaque filtration par les différentes membranes. Les membranes utilisées sont de la marque INSIDE CeRAMTM (TAMI industries). Ces membranes sont en ZrO₂-TiO₂ de 10 mm de diamètre. Les retentats et les perméats obtenus subissent une vaporisation afin d'éliminer toute trace de solvants organiques et sont lyophilisés.

III. Méthodes analytiques

III.1. Analyse des flavonoïdes et de leurs oligomères par chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est une technique de caractérisation des polymères par séparation des macromolécules en fonction de leur taille ou, plus exactement, de leur volume hydrodynamique. Cette technique consiste en une élution des macromolécules à l'aide d'un solvant circulant à débit constant au travers d'un matériau poreux non adsorbant dont les pores ont approximativement les mêmes dimensions que celles des molécules en solution.

La détection des macromolécules à la sortie du système permet de déterminer les différentes masses molaires moyennes de l'échantillon étudié. Elle permet aussi de tracer les courbes de distribution de ces masses molaires.

III.1.1. Principe

Lorsqu'une solution comportant des macromolécules de tailles différentes est injectée en tête de colonne et entraînée par le solvant, les macromolécules de taille supérieure à une certaine dimension ne peuvent pas pénétrer dans les pores ; elles sont exclues de ces pores et s'écoulent avec le solvant. Les macromolécules de taille très petite peuvent par contre pénétrer dans ces pores et sont ralenties (elles effectuent un trajet plus long).

Dans ces conditions, et en supposant qu'il n'y a pas d'adsorption sur le support (cas idéal), le volume V_e de solvant nécessaire pour faire éluer une macromolécule de taille x est :

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

avec V_0 est le volume interstitiel, V_i est le volume interne des pores de la colonne utilisée, K_d est le coefficient de distribution volumique, c'est-à-dire la fraction de volume interne des pores accessibles à l'espèce moléculaire considérée.

Pour les grandes molécules, K_d devient nul, et $V_e = V_0$ (passage rapide dans la colonne). Pour les petites molécules, K_d tend vers 1, et $V_e = V_0 + V_i$ (passage beaucoup plus lent)

Pour déterminer ces constantes, on utilise une approche empirique ; l'étalonnage de la colonne, à partir d'une série d'échantillons de masses molaires connues (et d'indice de polymolécularité, ou polydispersité, proche de 1). Très généralement, on utilise des échantillons de polystyrène pour l'étalonnage.

III.1.2. Matériels et protocole

Les différentes analyses ont été effectuées en utilisant un système Merck (LaChrom) équipé de :

- une colonne TSKGel α -3 000 (30x7.8 mm, 7 μ m, constitué d'une résine polyvinyle, Tosoh).
- un four de colonne (L-7350, Merck)
- une pompe (L-7100, Merck)
- un détecteur à ultraviolet (Merck).
- un logiciel d'acquisition et de traitement de chromatogramme EZ-Chrom®.

Les échantillons prélevés du milieu réactionnel renferment des molécules de masse différentes qui sont séparées sur SEC. La phase mobile utilisée est le diméthylformamide (DMF) avec 1 % de bromure de lithium (LiBr) à un débit de 0,5 ml/min.

La colonne est maintenue au sein du four à 60 °C. Le prélèvement d'échantillon se fait manuellement à des intervalles réguliers.

La détection des composés phénoliques se fait par UV à 280 nm.

La masse moléculaire moyenne du mélange oligomérique a été déduite d'une gamme étalon de polystyrène (PS) et polystyrène sulfonate (PSS) (figure 26) et définie selon les formules suivantes :

$$\rightarrow \overline{M}_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} : \text{masse moléculaire moyenne en nombre}$$

$$\rightarrow \overline{M}_w = \frac{\sum_i w_i M_i}{\sum_i w_i} : \text{masse moléculaire moyenne en poids}$$

$$\rightarrow I_m = \frac{\overline{M}_w}{M_1} : \text{indice de la masse moléculaire moyenne en poids}$$

$$\rightarrow PDI = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} : \text{polydispersité } (\geq 1)$$

où n_i représente le nombre d'oligomères ayant une masse M_i au degré de polymérisation i , et w_i la fraction massique de chaîne polymérique de degré i .

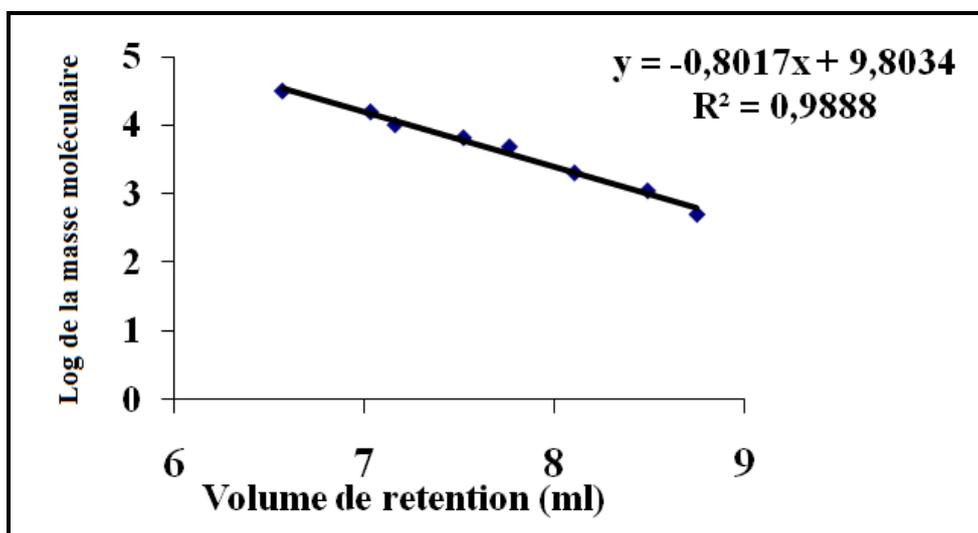


Figure 26. Courbe d'étalonnage de PS et PSS permettant la détermination de la \overline{M}_w .

IV. Analyses par spectre infrarouge des flavonoïdes et de leurs fractions d'oligomères

IV.1. Principe

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et une diminution de l'intensité réfléchi ou transmise est enregistrée. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée, les modes de vibration actifs en infrarouge peuvent être déterminés grâce à la Théorie des Groupes. La position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse. Par conséquent, à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

IV.2. Matériels et protocole

L'analyse infrarouge a été effectuée avec un cristal à réflexion totale atténuée (ATR) sur un spectromètre à transformée de Fourier (FTIR) Tensor 27 (Bruker). La poudre de flavonoïdes ou d'oligomères (1,5 mg) est mélangée avec 50 mg de KBr dans un mortier. Le mélange est broyé très finement puis pressé afin de donner lieu à des pastilles. Ces dernières sont alors analysées. Les spectres sont obtenus par l'accumulation de 1024 scans avec une résolution de 2 cm^{-1} . Le traitement des spectres a consisté en une correction des bandes $\text{H}_2\text{O}/\text{CO}_2$, un lissage de Savitzky-Golay à 9 points et une normalisation.

V. Analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) des monomères et de leurs fractions d'oligomères

V.1. Principe

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique développée par Bloch et Purcell (Prix Nobel 1952). Cette technique se différencie des spectroscopies UV-visible et infra-rouge, du fait que les niveaux d'énergie entre lesquels s'effectue la transition n'existent pas en l'absence de champ magnétique. Cette technique spectroscopique est basée sur l'excitation des molécules permettant la transition entre niveaux d'énergie de spins nucléaires dans un champ magnétique (B_0) (figure 27).

De nos jours, la RMN est couramment utilisée pour déterminer des structures, préciser l'enchaînement des différents atomes le long de la chaîne carbonée, examiner les formes tautomères et déterminer la stéréochimie. L'analyse de mélanges présente quant à elle quelques difficultés notamment dans le cas de mélanges polymériques.

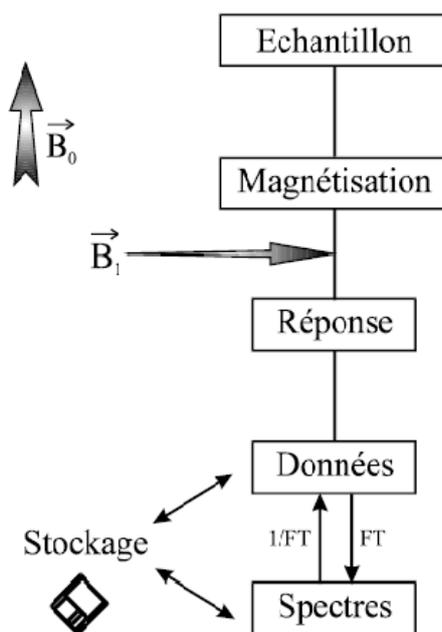


Figure 27. Représentation schématique d'une expérience RMN

V.2. RMN COSY ^1H - ^1H (Correlated spectroscopy)

C'est une corrélation homonucléaire 1H - 1H , et elle met en évidence tous les différents couplages scalaires entre les protons. Les deux dimensions représentent chacune une échelle

de déplacements chimiques du ^1H . Les échelles sont identiques et disposées sur deux cotés consécutifs d'un carré. Les déplacements chimiques de chaque ^1H apparaissent sur la diagonale du carré et les ^1H qui couplent avec le ^1H pris en considération peuvent être identifiés en traçant des lignes horizontales et verticales à partir de ce proton, pour former un carré (figure 28) (Massiot et Lavaud, 1995).

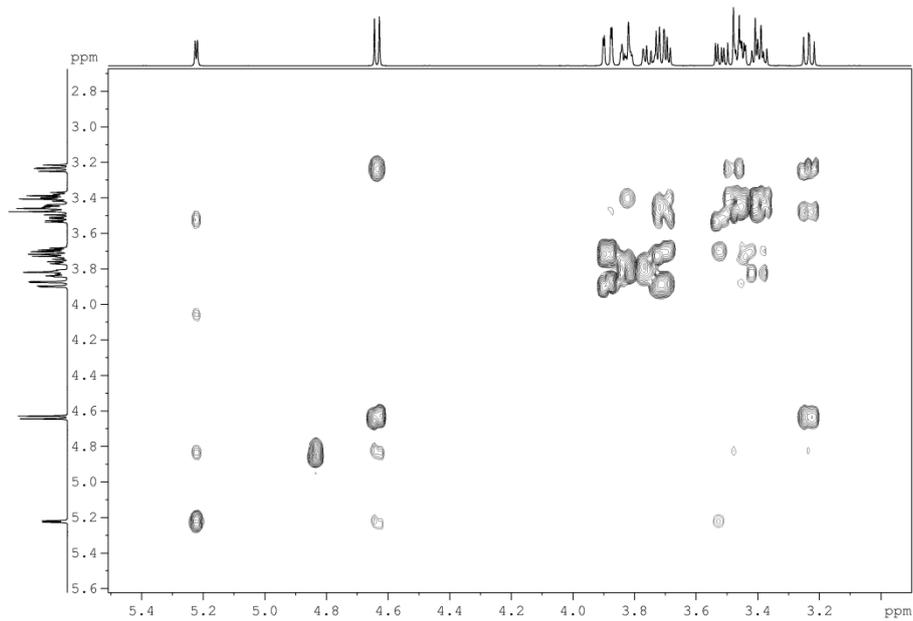


Figure 28. Spectre Cosy proton-proton du D-(+) glucose.

V.3. RMN HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

C'est une technique importante car elle permet de détecter les couplages hétéronucléaires à longue distance $2 J_{\text{C-H}}$ et $3 J_{\text{C-H}}$ à travers un hétéroatome ou un carbone quaternaire (Massiot et Lavaud).

V.4. RMN HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

Cette technique permet de mettre en évidence les couplages directs $^1J_{C-H}$ entre carbone et proton liés. Elle permet, à partir du spectre proton, d'attribuer la majorité des carbones protonés.

V.5. Protocole

Les spectres RMN 1H et RMN ^{13}C ont réalisés sur les monomères et leurs fractions d'oligomères dans du d_6 -DMSO sur un spectromètre Brücker à 600 MHz avec cryosonde.

Plusieurs techniques de RMN ont été utilisées afin de déterminer la structure de la rutine, de l'esculine et surtout de leurs fractions d'oligomères. Parmi ces techniques :

- RMN 1H et RMN ^{13}C
- RMN COSY (correlated spectroscopy) $^1H/^1H$
- RMN HMQC (Heteronuclear multiple Quantum Correlation) $^1H/^{13}C$

VI. Etude de la solubilité

L'étude de la solubilité de la rutine de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères a été réalisée dans l'eau et l'éthanol à 20°C.

La rutine, l'esculine ou leurs fractions d'oligomères en excès sont ajoutés à 50 ml de solvant (eau ou éthanol) dans un réacteur agité (600 rpm). Les échantillons prélevés régulièrement durant 3 jours ont été filtrés sur 0.2 μm (afin d'analyser la fraction soluble) et analysés par SEC-UV. Une courbe d'étalonnage pour la rutine et l'esculine et chaque fraction d'oligomères a été réalisée afin de pouvoir estimer la solubilité maximale de nos flavonoïdes et coumarines dans chaque solvant.

VII. Etude des activités biologiques à l'aide de systèmes procaryotes

VII.1. Méthode générale de culture bactérienne

VII.1.1. Culture des bactéries utilisées pour le test d'Ames

A partir d'une culture bactérienne en milieu liquide d'oxoïde, en phase exponentielle de croissance, on ensemence des boîtes de milieu minimum supplémenté d'histidine, biotine et éventuellement d'ampicilline et/ ou tétracycline selon la nature de la souche utilisée si elle renferme le facteur de résistance à la tétracycline et ou à l'ampicilline. Les cultures bactériennes sont incubées à 37°C pendant 24 h, puis elles sont conservées à +4°C pour quelques jours.

VII.1.1.1. Vérification des caractères des souches utilisées pour les tests de mutagenicité et génotoxicité

Les génotypes de chaque souche sont vérifiés après réception des cultures, lorsque la souche est décongelée ou lorsque le nombre de révertants spontanés par boîte de culture ne correspond pas au chiffre normal. Les caractéristiques vérifiées pour les souches d'Ames utilisées. (*S. typhimurium* TA102, TA104) sont :

- **Vérification du caractère deep rough (rfa)**

Ce caractère est mis en évidence par la sensibilité au cristal-violet. Sur une boîte contenant de la gélose nutritive, on coule 2 ml de Top Agar, renfermant 100 µl d'une culture bactérienne de 16 heures. On y dépose un disque de papier filtre, de 6 mm de diamètre imbibé par 10 µl de cristal-violet (1 mg/ml). Après 12 heures d'incubation à 37°C, la présence d'une zone d'inhibition autour du disque, indique la présence de la mutation rfa qui permet aux grandes molécules telle que le cristal-violet, de traverser la paroi bactérienne et d'inhiber la multiplication de celles-ci.

- **Test de mise en évidence de la mutation uvrB**

Ce test permet de confirmer la présence de la mutation *uvrA* qui bloque le processus de réparation des lésions et augmente la réparation fautive SOS. Ainsi la moitié de la surface d'une boîte de gélose nutritive contenant une strie de culture bactérienne, est irradiée pendant

6 secondes pour les souches sans facteur R et 8 secondes pour les souches avec facteur R, à l'aide d'une lampe UV germicide de 15 watts, à une distance de 33 cm de la surface de la boîte. Après incubation pendant 24 heures à 37°C, les souches possédant la délétion *uvrA*, sensibles aux rayons UV, poussent dans la partie non irradiée et ne poussent pas dans la partie irradiée de la boîte. Les souches ne possédant pas la mutation *uvrA* poussent partout (Ames et al., 1975).

• Test de mise en évidence de la résistance aux antibiotiques

Les souches de *Salmonella typhimurium*, TA102 et TA104 renferment un plasmide pkM 101 (facteur R) qui contient des gènes de résistance à l'ampicilline. Seule la souche *Salmonella typhimurium* TA102 renferme le plasmide pAQ1 qui contient un gène de résistance à la tétracycline. Une strie de 10 µl d'ampicilline à 8 mg/ml (de NaOH 0,2 N), est effectuée sur une boîte de gélose nutritive. Une strie de chaque culture de souche testée est pratiquée perpendiculairement à la strie d'ampicilline. Ce protocole est reproduit en remplaçant l'ampicilline par la tétracycline pour la souche TA102. Après 12 à 24 heures d'incubation à 37°C, les souches sans facteurs R montrent une zone d'inhibition de la croissance, tandis que celles possédant le facteur R ont une croissance uniforme.

• Besoin en histidine

Sur des boîtes de pétri contenant le milieu M63, supplémenté soit d'histidine (0,1 M) et de biotine (0,5 mM) soit uniquement de biotine (0,5 mM), 100 µl de culture bactérienne (10^8 cellules/ml) de la souche à tester sont étalés. Après 24 h d'incubation à 37°C, les boîtes renfermant l'histidine développent un tapis bactérien dense et celles dépourvues d'histidine ne développent aucune pousse (Ames et al., 1975).

• Le taux de révertants spontanés

Sur des boîtes contenant du milieu M63, on coule 2 ml de Top Agar supplémenté d'histidine-biotine (0,5 mM) et 100 µl de culture bactérienne (10^8 cellules / ml). Après 48 heures

d'incubation à 37°C, on observe des colonies qui se distinguent nettement d'une légère pousse de fond, ce sont les révertants spontanés (Ames et al., 1975).

VII.1.1.2. Conservation des souches bactériennes

a. Congélation

L'intérêt de la congélation est de pouvoir constituer un stock de cellules à l'abri de toute contamination, de modification génomique, ainsi que du vieillissement résultant de repiquages successifs. La congélation (à -80°C et dans l'azote liquide à -196°C) s'effectue sur une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. Elle doit être réalisée dans un milieu capable de protéger les cellules contre la formation de cristaux de glace intracellulaires et contre les variations de pression osmotique. Il est donc indispensable d'ajouter au milieu de congélation un agent cryoprotecteur tel que le glycérol ou le diméthylsulfoxyde (DMSO). Le bouillon de la culture dont les caractéristiques sont vérifiées (1 à 2 10⁹ cellules /ml) est conservé en présence de DMSO à 10 %. Plusieurs cryotubes de chaque souche sont préparées. Les cryotubes sont congelés 2 heures à -20°C puis une nuit à -80°C et enfin ils sont immergés dans l'azote liquide à -196°C. Pour une conservation à -20°C, le même bouillon de culture est mélangé v/v avec du glycérol stérile et aliquoté dans des cryotubes à raison de 1 ml/tube et puis conservée à -20°C.

b. Décongélation

Contrairement à la congélation, la décongélation doit être rapide pour éviter aux cellules décongelées un contact prolongé avec le DMSO fortement cytotoxique. Les cultures fraîches sont obtenues en inoculant 5 ml de bouillon de culture avec 50 µl de culture décongelée. Le tout est incubé à 37°C pendant 24 heures. La culture obtenue se conserve une à deux semaines au réfrigérateur à 4°C.

VII.1.2. Choix des concentrations des échantillons testés

Les concentrations des échantillons à tester pour le test d'Ames ne doivent pas avoir un effet bactéricide sur les bactéries utilisées car leur toxicité peut masquer une éventuelle activité génotoxique. Pour cela des disques imbibés chacun de 20 µl de chacune des concentrations de l'échantillon à étudier, sont déposés sur des boîtes de milieu M63ensemencées par l'une des souches d'Ames utilisées. Après 24 heures d'incubation à 37°C, on observe la présence ou pas d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques. Pour le test d'Ames 8 concentrations de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sont testées : 1000, 500, 250, 50, 25, 10 et 5 µg/boîte.

VII.2. Méthode d'étude de l'activité mutagène directe et indirecte à l'aide du test d'Ames

VII.2.1. Préparation de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères

La rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères sont dilués dans le DMSO (1%). Nous avons démontré l'absence d'activité cytotoxique du DMSO à la dilution utilisée, vis-à-vis des différentes souches de *Salmonella typhimurium* testées.

VII.2.2. Principe

Le test d'Ames est un test de mutagenèse proprement dit. Il consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Les souches utilisées pour ce test sont des souches porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation *His*⁻ rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutants *His*⁻ reversent spontanément vers *His*⁺ et donc les bactéries retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries *His*⁻ à des agents mutagènes. Ainsi, le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations

réverses *His+*, en comptant le nombre de révertants *His+* en présence de la substance à tester et en le comparant au nombre de revertants spontanés (Ames et al., 1975).

VII.2.3. Méthode

Des tubes à hémolyse contenant 2 ml de Top agar, comportant des traces d'histidine et de biotine, sont placés dans un bain-marie à 45°C. On ajoute dans chaque tube successivement 100 µl de bouillon de culture de 16 heures, (10^8 cellules /ml) et 100 µl de l'échantillon à tester à une concentration bien déterminée. En même temps on prépare d'autres tubes ayant la même composition mais auxquels on ajoute 500 µl de S9 mix (extrait microsomal de foie de souris) dans le but d'induire la métabolisation de l'extrait à tester. Le tout est mélangé par agitation légère du tube. Les tubes contenant du S9 mix, sont mis sous agitation pendant 30 min à 37°C. Puis on verse le contenu dans une boîte de Pétri renfermant le milieu M63 gélosé. Ces opérations: mélanger, verser, distribuer, doivent prendre moins de 20 secondes. Les boîtes sont ensuite, placées à l'étuve à 37°C et 48 heures plus tard les colonies révertantes histidine⁺ formées sont dénombrées (Figure 29) (Zani et al., 1993 ; Pabon et al., 2001 ; Scharder et al., 2001 ; Sovcikova et al., 2001).

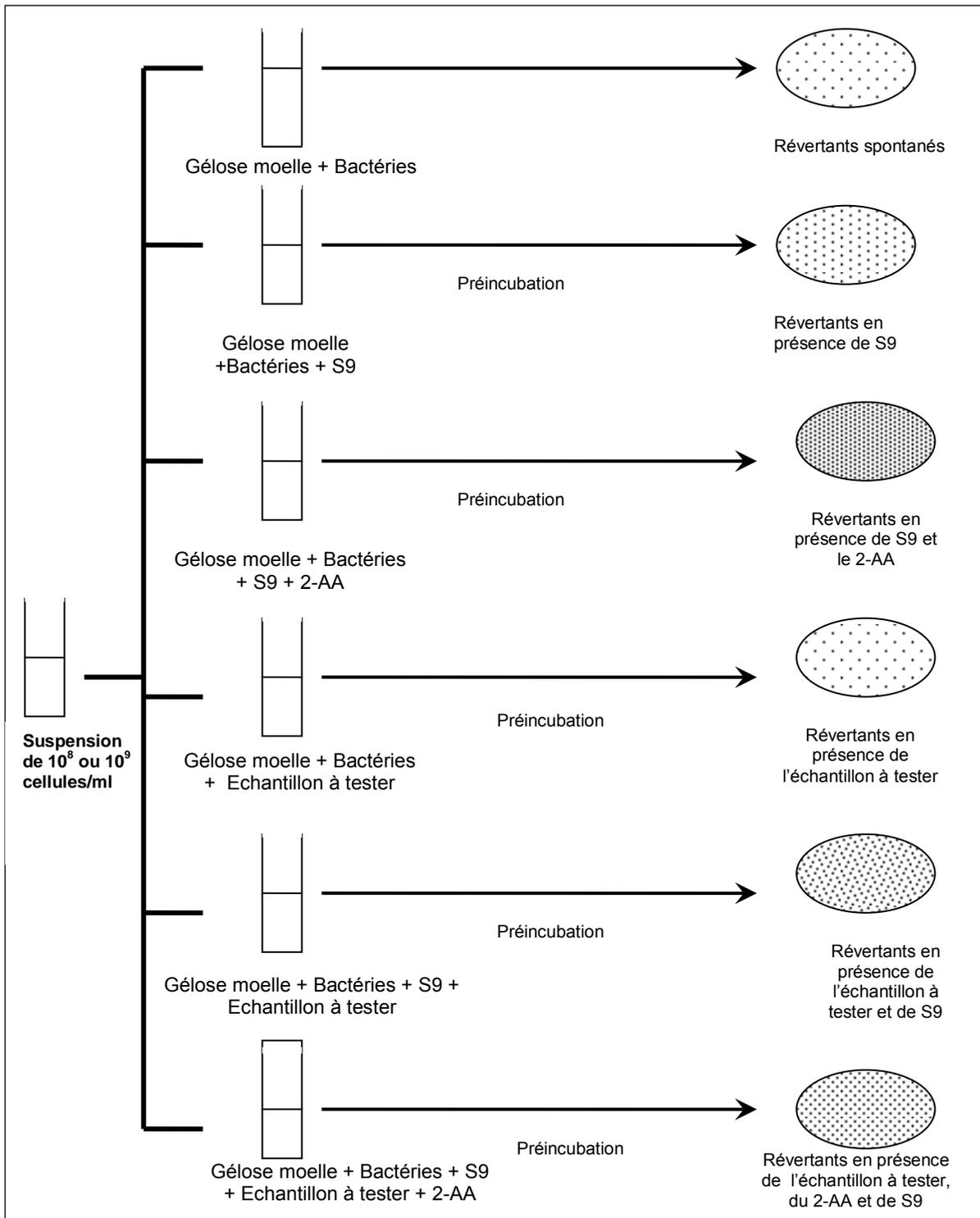


Figure 29. Principale étapes des test de mutagénicité et d'antimutagénicité selon la méthode d'Ames

VII.3. Méthode d'étude de l'activité antimutagène directe et indirecte à l'aide du test d'Ames

Matériels et Méthodes

On dispose dans des tubes à hémolyse, 100 µl de bouillon de culture bactérienne (inoculé avec 10^8 cellules / ml), 50 µl de solution de MMS à une concentration de (325 µg/essai) pour *S. typhimurium* TA104 et (130 µg/essai) pour *S. typhimurium* TA102 et 50 µl d'une concentration de l'échantillon à tester. En même temps on prépare d'autres tubes ayant la même composition mais auxquels on ajoute 500 µl de S9 mix (extrait microsomal de foie de souris) et dans lesquels on remplace les 50 µl de MMS par 50 µl de solution de 2-AA à une concentration de (5 µg/essai) pour *S. typhimurium* TA104 et (10 µg/essai) pour *S. typhimurium* TA102. Le tout est mélangé par agitation légère du tube. Les tubes contenant le S9 mix, sont mis sous agitation pendant 45 min à 37°C. Le contenu de chaque tube est mélangé avec 2 ml de Top agar, comportant des traces d'histidine et de biotine. Le tout est mélangé par agitation douce du tube et versé sur une boîte renfermant le milieu gélosé M63. Cette opération doit prendre moins de 20 secondes. Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 37°C pendant 48 heures, les révertants histidine+ formés sont dénombrés (Figure 29) (Duhan et al., 1999).

VIII. Etude des activités antioxydantes et antiradicalaires

VIII.1. Etude de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

VIII.1.1. Principe

Le diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé quelconque (Lee, Shin et al. 2003).



L'effet des antioxydants sur le piégeage du radical DPPH est dû à leur pouvoir à céder un hydrogène (Mishra et al., 2012).

L'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH.) a été évaluée à l'aide d'une méthode colorimétrique. En effet, à température ambiante et en solution, le radical DPPH• présente une coloration violette intense.

Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne par la disparition de la coloration violette (Soler-Rivas et al., 2000).

La diminution de l'intensité de la coloration est suivie par spectrophotométrie à 517 nm.

Elle rend, ainsi, compte du pouvoir piègeur des extraits et fractions testés vis-à-vis du DPPH• (Parejo et al., 2000 ; Lee et al., 2003).

VIII.1.2. Méthode d'étude

Cinq concentrations de chaque molécule ont été testées : 100, 30, 10, 3 et 1 µg/ml. Le solvant utilisé est l'éthanol absolu.

La solution d'échantillon à analyser, supplémentée de la solution éthanolique de DPPH (0.3 10⁻⁴ M) est incubée pendant 30 min à l'abri de la lumière, puis, l'absorbance du mélange est mesurée à 517 nm contre le blanc (témoin négatif en absence d'extraits) traité dans les mêmes conditions. L'activité des échantillons est évaluée par rapport à la solution 100% qui renferme l'éthanol absolu et la solution de DPPH•. Le Trolox est utilisée dans ce cas comme un témoin positif.

VIII.2. Etude de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical ABTS^{•+}

VIII.2.1. Principe

L'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical ABTS^{•+} est évaluée en utilisant la méthode du TEAC (capacité antioxydante en équivalent de Trolox), qui permet de déterminer la capacité d'une molécule à piéger le radical ABTS^{•+} exprimée par rapport à une substance de référence le Trolox. Le radical ABTS^{•+} est obtenu par réaction entre les monomères ou les fractions d'oligomères testés, la molécule d'ABTS stable (sel d'ammonium de l'acide 2,2'- azinobis-

(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) et le persulfate de potassium, ($K_2S_2O_8$) (Re et al., 1999) faisant ainsi apparaître une coloration bleue intense.

Le passage du radical $ABTS^{+\bullet}$ à la forme non radicalaire s'accompagne par la disparition de cette coloration mesurée spectrophotométriquement à une longueur d'onde $\lambda=734$ nm. Cette décoloration résulte d'une réaction entre le radical $ABTS^{+\bullet}$ et un donneur de H^{\bullet} .



VIII. 2.2. Méthode d'étude

Le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) (0,7 mg) est additionné à 3,7 mg d'ABTS, le tout est dissout dans 1ml d' H_2O . Il en résulte une coloration bleue intense.

Cette solution est laissée au repos pendant toute une nuit (Re et al., 1999).

Quatre concentrations de chaque monomère et fractions d'oligomères (20, 100, 300 et 600 μM pour la rutine et ses fractions d'oligomères et 5, 20, 100, 300 μM pour l'esculine et ses fractions d'oligomères) ont été testées. L'absorbance du mélange (5 μl du monomère ou de la fraction d'oligomère + 5 μl de la solution d'ABTS + 495 μl d'éthanol absolu) pour chaque concentration de monomère ou d'oligomères testés, est lue contre un blanc contenant uniquement 5 μl du monomère ou de l'oligomère correspondant dans 500 μl d'éthanol absolu. Notons qu'avant d'ajouter les molécules à tester à la solution, on doit s'assurer que l'absorbance est stabilisée à environ 0.7 ± 0.02 unité de DO. L'absorbance du mélange est alors suivie spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 734 nm jusqu'à la stabilisation de la densité optique. La concentration de Trolox (Figure 30) choisie comme substance de référence, pour tester l'activité antiradicalaire des monomères et des fractions d'oligomères, est de 1 μM (Re et al., 1999 ; Montoro et al., 2005 ; Lee et al., 2008).

Dans un premier temps, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition : PI} = (1 - (\text{DO monomère ou oligomère} / 0,7)) \times 100$$

Pour chaque molécule testée, nous suivons le pourcentage d'inhibition de la formation du radical ABTS⁺ en fonction du temps et de la concentration de l'échantillon testé.

Dans un deuxième temps, l'activité antiradicalaire des différents monomères et fractions d'oligomères testés, est exprimée en valeurs de TEAC. Les valeurs de TEAC expriment la concentration de Trolox qui a la même capacité antioxydante qu'une concentration de 1 μM de l'échantillon testé.

$$\text{TEAC } (\mu\text{M Trolox}) = (M_{\text{DO (mol) t}} / M_{\text{DO (Trolox) t}}) \times ([\text{Trolox}] / [\text{mol}])$$

M_{DO}: moyenne entre les trois densités optiques lues à 734nm.

mol : molécule à testée.

t : temps

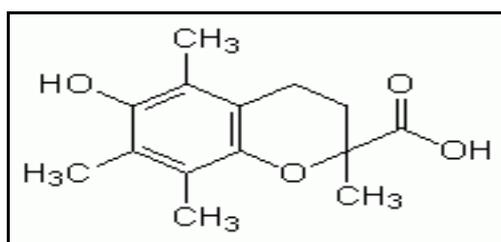


Figure 30. Structure chimique du Trolox

VIII.3. Etude de l'activité antioxydante à l'aide du test de 2-déoxyribose

VIII.3.1. Etude de l'activité antioxydante vis-à-vis du radical OH[•] à l'aide du test au 2-déoxyribose

VIII.3.1.1. Principe:

La mise en évidence du radical hydroxyle n'est pas facile, car il est très réactif et a une durée de vie très courte. Pour le mettre en évidence, des méthodes indirectes qui détectent les produits de sa réaction sont utilisées.

Le désoxyribose, par action avec le radical hydroxyle, est dégradé en malondialdéhyde (MDA) dont l'apparition est suivie par réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le produit ainsi formé est détectable par une mesure de l'absorbance à 532 nm. La capture du radical OH[•] par la substance à tester, se fait par compétition avec le désoxyribose. Ainsi une diminution de la quantité du chromogène formé est observée se traduisant par une diminution de l'absorbance (figure 31) (Paya et al., 1992).

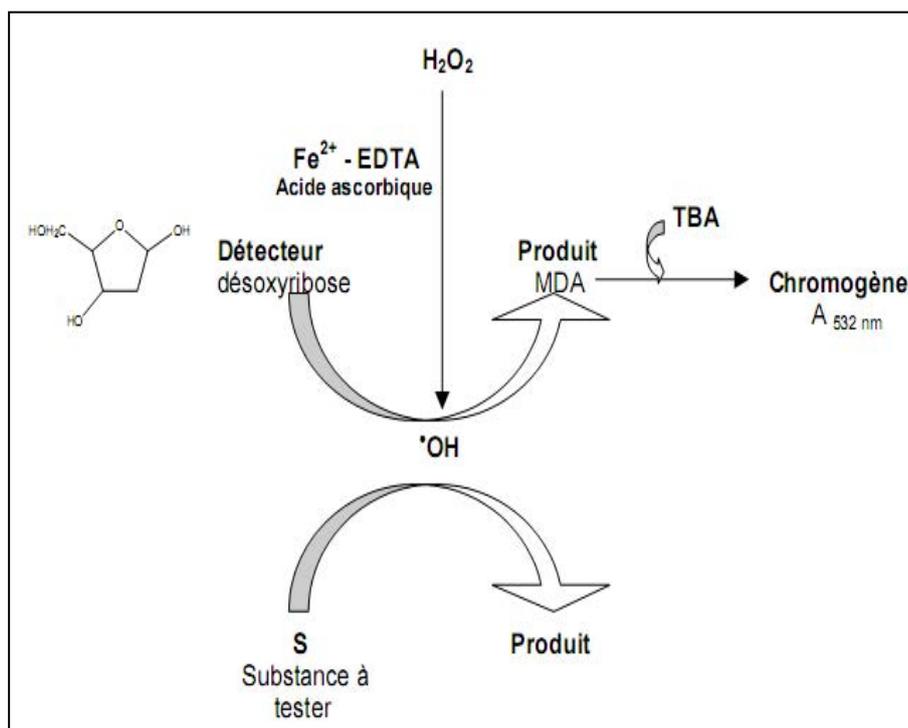


Figure 31. Principe du test au 2-désoxyribose.

VIII.3.1.2. Méthode :

L'activité antioxydante vis-à-vis du radical hydroxyle est étudiée selon le protocole suivant :
Dans un premier temps, une solution contenant 100 µl de FeCl₃ (20 µM), 100 µl d'EDTA (2 mM) et 100 µl d'acide ascorbique (50 µM) a été préparée. A ce mélange sont ajoutés 100 µl de la solution de 2-désoxyribose (2.8 mM), 100 µl de l'échantillon à tester ainsi que 500 µl de tampon phosphate KH₂PO₄ (10 mM, pH 7.4) pour atteindre un volume final de 1 ml. Cent µl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (1.42 mM) sont ensuite ajoutés au mélange et le tout est

incubé à 37°C. Après une heure d'incubation la réaction est arrêtée par 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) (28%). Dans un second temps, 1 ml de l'acide thiobarbiturique (TBA) (1%) est additionné au milieu réactionnel dans le but d'obtenir une solution colorée par interaction entre le TBA et le MDA suite à un chauffage pendant 15 min à 100°C. Après refroidissement, dans un bain de glace, les absorbances des différentes solutions sont mesurées à 532 nm contre un blanc constitué par le même milieu réactionnel exempt de l'échantillon à tester (100 µl du tampon phosphate à la place de 100 µl de l'échantillon.) (Paya et al., 1992 ; Valentéo et al., 2002).

L'effet antioxydant vis-à-vis du radical hydroxyle est exprimé en pourcentage d'inhibition à l'aide de la formule suivante:

$$PI = (1 - (DO_{mol} / DO_{100\%})) \times 100$$

DO_{100%} : DO du contrôle en absence d'échantillon.

DO_{mol} : DO mélange contenant la molécule à tester.

L'étude de l'activité antiradicalaire vis-à-vis de divers radicaux permet de confirmer la présence ou l'absence d'une telle activité d'une part ; d'autre part on a utilisé des radicaux non oxygénés (ABTS⁺, DPPH^{*}), ainsi que des radicaux oxygénés (OH^{*}) afin de s'assurer que les fractions d'oligomères testées sont capables de piéger aussi bien les radicaux non oxygénés, que les espèces oxygénées. Les radicaux oxygénés sont très impliqués dans les dommages oxydatifs qui pourrait toucher l'ADN, d'où l'intérêt de les piéger.

VIII.3.2. Etude de l'activité chélateur de fer à l'aide du test au 2-désoxyribose

VIII.3.2.1. Principe

Cette activité est évaluée l'aide de la réaction de Fenton (figure 32), permettant de détecter l'activité chélateur de fer puisque plus notre fraction à tester est capable de chélater le fer moins la transformation du H₂O₂ en OH^{*} et OH⁻ est importante et par conséquent on va

assister à une diminution de la dégradation du 2-désoxyribose en MDA mis en évidence par une diminution de l'intensité de la coloration rose, voire sa disparition (Paya et al., 1992 ; Valentéo et al., 2002).

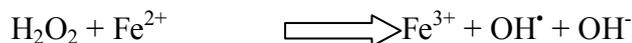


Figure 32 : réaction de Fenton

VIII.4. Etude de l'activité antioxydante par inhibition de la xanthine oxydase

VIII.4.1. Principe

Nous avons utilisé un système enzymatique pour évaluer la capacité de nos molécules à diminuer la génération des radicaux libres, c'est le système xanthine/ xanthine oxydase dans la mesure où un antioxydant peut agir soit en capturant les radicaux libres générés ou encore en inhibant les enzymes catalysant les réactions aboutissant à la formation de ces radicaux libres (Takano et al., 2005).

VIII.4.2. Fonctionnement de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une métalloflavoprotéine qui intervient dans la formation de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par réduction de l'oxygène moléculaire (Yeh et al., 2003) selon la réaction suivante :



La xanthine oxydase peut catalyser l'oxydation d'une grande gamme de substrats y compris les purines, les pyrimidines et les aldéhydes. Par ailleurs, la xanthine oxydase peut produire du superoxyde lors de la métabolisation de l'hypoxanthine en xanthine et en acide urique (Figure 33).

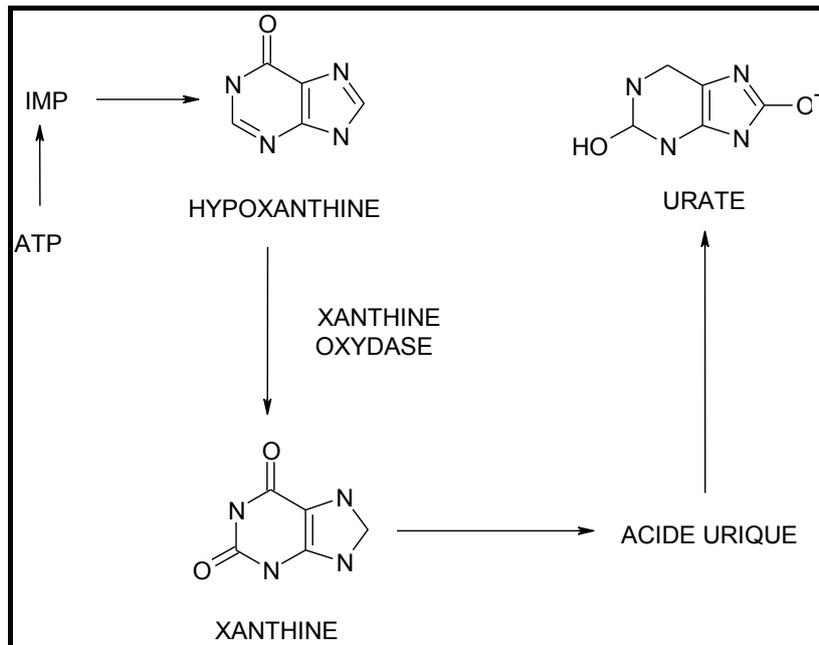


Figure 33. Cycle de production de l'acide urique par le système xanthine/xanthine oxydase

(Da Silva et al., 2004).

L'anion superoxyde est ensuite à l'origine de la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'action du superoxyde dismutase. En présence de fer, la coexistence du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène peut générer le radical hydroxyle (OH^\cdot), qui est un puissant inducteur de la peroxydation des phospholipides membranaires (Takano et al., 2005). L'accumulation de l'acide urique produit, conduit à une hyperuricémie et à la maladie de la goutte (un trouble du métabolisme des purines). Cette molécule est caractérisée par un maximum d'absorption à 290 nm (Da Silva et al., 2004 ; Takano et al., 2005). Un inhibiteur de la xanthine oxydase dans le milieu réactionnel aura pour effet de diminuer la concentration en acide urique. La capacité de l'antioxydant à inhiber la xanthine oxydase est alors évaluée en mesurant la quantité d'acide urique formée. Cette mesure est effectuée par spectrophotométrie à 295 nm (Cimanga et al., 1999 ; Nguyen et al., 2004).

VIII.4.1. Méthode

Ce test d'inhibition a été réalisé sur la xanthine oxydase provenant de lait bovin (E.C.

1.17.3.2) (Winterbourn et al., 1991).

Matériels et Méthodes

La xanthine a été préalablement dissoute dans un volume minimal de soude 2 % et rapidement diluée dans le tampon phosphate (pH 7.5 ± 0.1 , 50 mM). La rutine et l'esculine ont été préalablement dissoutes dans une petite quantité de diméthylsulfoxyde (1%) et aussitôt diluée dans du tampon phosphate pour obtenir des concentrations de 50, 100, 500 et 1000 μM pour la rutine et ses fractions d'oligomères et des concentrations de 100, 500, 1000 et 2000 μM pour l'esculine et ses fractions d'oligomères. Le milieu réactionnel constitué de 1600 μl de tampon, 300 μl de flavonoïde ou d'oligomères et de 1000 μl de xanthine. La réaction est initiée par l'ajout de 100 μl de solution de xanthine oxydase (0.2 mg/ml). La formation d'acide urique est évaluée par suivie de l'absorbance à 295 nm pendant 6 min. Deux solutions test ont été préparées, la première ne contenant pas de flavonoïdes et permettant de mesurer la formation de 100% d'acide urique totale, la seconde ne contenant pas d'enzyme et permet d'évaluer l'absorbance des flavonoïdes et de leurs oligomères à 295 nm afin de la soustraire de l'absorbance totale. L'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase est évaluée à l'aide de la concentration de l'échantillon testé entraînant une diminution de 50% de l'acide urique par rapport à la réaction en absence de l'échantillon et donnant 100% d'acide urique (figure 34).

Les expériences sont répétées trois fois

2D Graph 1

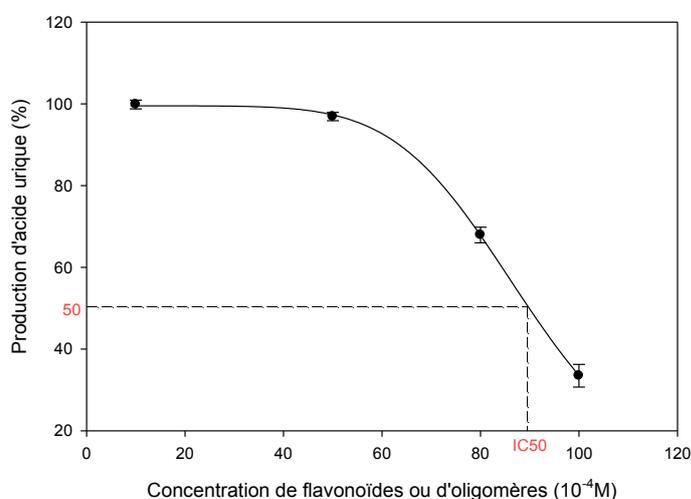


Figure 34. Détermination graphique de l'IC50 de l'inhibition de la xanthine oxydase

VIII.5. Méthode d'étude de l'activité antioxydante à travers la capacité de réduire le cuivre d'établir l'équilibre Redox, à l'aide de test CUPRAC

L'activité antioxydante est définie comme étant la capacité d'un système à piéger des radicaux libres ou à réguler le système redox, défendant ainsi l'organisme contre la dégradation oxydative. L'évaluation de la capacité réductrice de nos échantillons a été effectuée à l'aide du test CUPRAC.

VIII.5.1. Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

VIII.5.1.1. Principe

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur la suivie de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu^{2+}) [$\text{Nc}_2 - \text{Cu}^{2+}$]. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit et cette réaction est quantifié spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak et al., 2004).



VIII.5.1.2. Méthode

Dans un tube Eppendorf, 200 μl de H_2O sont mélangés avec 200 μl de tampon acétate d'ammonium (1 M, pH 7), 20 μl de l'extrait à tester, 200 μl de Néocuproïne (7,5 mM) et 200 μl de CuCl_2 (10 mM). Le mélange est incubé pendant 1 heure à 37°C. Le complexe réduit $\text{Cu}^+ - \text{Nc}$ est quantifié spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm.

L'effet antioxydant des différents composés testés a été exprimé en μM d'équivalent de Trolox par μM de molécule.

IX. Etude des activités biologiques à l'aide de systèmes eucaryotes

IX.1. Méthode générale de culture cellulaire. Culture et entretien des lignées cellulaires

IX.1.1. Culture des cellules

Les cellules K562 sont cultivées en suspension, soit dans des boites en polystyrène de 75 cm^3 , soit dans des plaques multipuits (96 puits). Pour les cellules K562, le milieu de culture employé est un milieu synthétique RPMI 1640, et supplémenté de 4% de L-glutamine ainsi

que 10 % de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur (30 min à 56°C), qui apporte des facteurs de croissance indispensables. Pour diminuer le risque de contamination bactérienne, on additionne au milieu, 1% d'antibiotiques (gentamycine (100 µg/ml)). Afin d'obtenir une bonne croissance cellulaire, il convient de respecter le rapport entre le volume du milieu et celui de la surface de la boîte de culture (10 ml de milieu pour une boîte de 25 cm², par exemple). Le milieu de culture estensemencé avec 1 à 5.10⁵ cellules/ml puis incubé à 37°C dans un incubateur, en atmosphère enrichie avec 5 % de CO₂. La croissance des cellules est suivie quotidiennement à l'aide d'un microscope en phase inversée ; en même temps, la prolifération d'éventuelles contaminations bactériennes est vérifiée. L'apport en éléments nutritifs est assuré par un changement de milieu toutes les 48 heures. Cela présente également l'avantage d'éliminer les endotoxines cellulaires susceptibles d'inhiber la croissance. Dès que les cellules sont en confluence, elles sont repiquées dans un milieu de culture frais qui les maintient en phase exponentielle de croissance et permet d'éviter l'inhibition qui survient à confluence.

IX.1.2. Repiquage des cellules

Les cellules sont centrifugées pendant 10 minutes, à 3000 rpm à température ambiante.

Une partie de la suspension cellulaire réensemencée servira dans les diverses expérimentations. L'autre partie est conservée congelée et servira pour des cultures ultérieures. Le nombre de repiquage doit être noté, dans la mesure où il influence de manière inversement proportionnelle sur le temps de multiplication des cellules et leurs capacités métaboliques. L'utilisation de cellules issues de nombreux repiquages successifs est évitée.

IX.1.3. Numération cellulaire au bleu de trypan

Après homogénéisation, un aliquot de 90 µl de suspension cellulaire est mélangé avec 10 µl de bleu trypan 0,4 %. La numération, s'effectue à l'aide d'une cellule Malassez. Une goutte de suspension cellulaire est déposée entre lame et lamelle. La numération, réalisée par

observation microscopique, permet de déterminer les dilutions à effectuer avant le réensemencement de nouvelles cultures.

IX.1.4. Conservation des cellules

IX.1.4.1. Congélation

La congélation des cellules K562, à -20°C, -80°C ou dans l'azote liquide à -196°C, s'effectue sur une population cellulaire en phase exponentielle de croissance. Elle doit être réalisée dans un milieu capable de protéger les cellules contre la formation de cristaux de glace intracellulaires et contre les variations de pression osmotique. Il est donc indispensable d'ajouter au milieu de congélation un agent cryoprotecteur tel que le glycérol, dans le cas de conservation à -20°C, ou le diméthyl-sulfoxyde (DMSO) dans le cas de la conservation à -80°C. Le processus de congélation est réalisé selon le protocole suivant:

Après centrifugation pendant 10 minutes à 3000 rpm, le culot cellulaire est disposé dans le milieu de congélation composé par du milieu RPMI 1640, du sérum de veau fœtal 20%, et du DMSO ou du glycérol à 10% final. La congélation à -80°C ou à 190°C est progressive.

IX.1.4.2. Décongélation

Contrairement à la congélation, la décongélation doit être rapide pour éviter aux cellules décongelées un contact prolongé avec le glycérol ou le DMSO fortement cytotoxiques. Les cryotubes sont alors placés dans un bain-marie à 37°C, puis les cellules sont transférées dans un milieu RPMI préchauffé à 37°C, cela assure leur décongélation totale et rapide. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant contenant l'agent protecteur est éliminé et remplacé par du milieu complet. Après homogénéisation, les cellules sont remises en culture à 37°C.

IX.2. Méthode d'étude de l'influence des monomères et leurs fractions d'oligomères testées sur la viabilité cellulaire en utilisant le test de réduction de Formazan : 3(4,5 diméthylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)

IX.2.1. Evaluation de la cytotoxicité par le test au 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)

Ce test permet de mesurer l'activité cytotoxique d'une substance. En effet, en présence d'une enzyme, la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes (Mosmann, 1983), qui a la propriété de catalyser la déshydrogénation du succinate en fumarate dans le cycle de krebs ; le sel de tétrazolium MTT de couleur jaune est alors réduit en cristaux bleus de formazan.

Cette réduction, proportionnelle au nombre de cellules viable, sera détectée spectrophotométriquement à 540 nm (figure 35).

Le nombre de cellules vivantes après traitement par la dose choisie de monomères ou de fractions d'oligomères testées, par rapport au nombre de cellules témoins non traitées, permet d'évaluer la cytotoxicité de ce produit.

$$\% \text{ de mortalité cellulaire} = (1 - (\text{DO}_{\text{essai}} / \text{DO}_{\text{témoin}})) \times 100$$

$\text{DO}_{\text{témoin}}$ = l'absorbance de l'essai témoin correspondant aux cellules non traitées par l'extrait à 540 nm.

DO_{essai} = l'absorbance de l'essai correspondant aux cellules traitées par l'extrait à 540 nm.

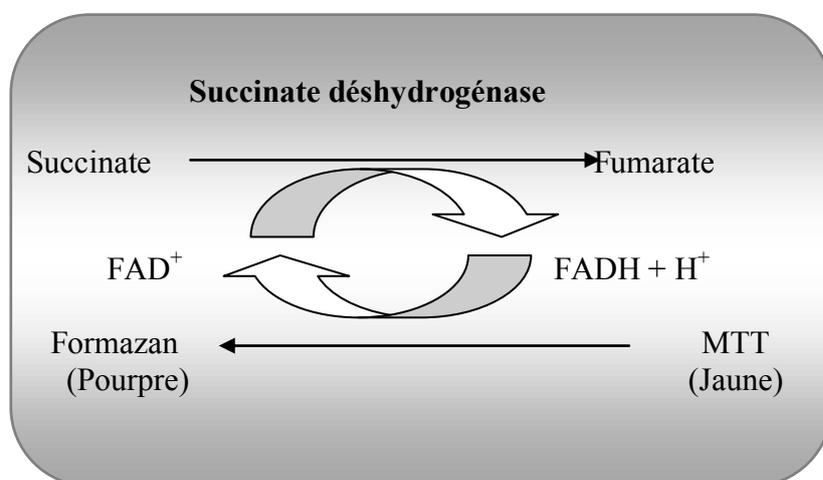


Figure 35. Déshydrogénation du succinate en fumarate

IX.2.2. Traitement des cellules

Les cellules sont réparties dans une plaque de 96 puits à fond plat à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules/100 μ l de milieu RPMI complet. La plaque est incubée à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5% de CO₂, pendant 24 h. Ensuite, ces cellules sont incubées en présence de différentes dilutions des échantillons à tester, pendant 48 h. Les dilutions sont préparées en cascade de chaque échantillon et reprises dans 5 μ l de DMSO, complétées à 1ml avec du RMPI. Un témoin négatif sans l'échantillon à tester est réalisé pour chaque essai (Stockert et al., 2012). Après 48h d'incubation, les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min puis lavées avec du milieu RPMI frais. Le culot est repris dans 50 μ l MTT (5 mg/ml), puis incubé pendant 4 h à 37°C une nouvelle centrifugation nous permet de récupérer le culot de couleur pourpre que l'on dissout dans 200 μ l de DMSO et dont on détermine l'absorbance à 540 nm par rapport aux cellules non traitées par l'échantillon. Cette absorbance correspond à la densité optique de cellules vivantes présentes dans chaque puit. La courbe de concentration de l'extrait en fonction du pourcentage de viabilité cellulaire nous permet de déterminer la concentration inhibitrice de 50% de la multiplication cellulaire en présence des molécules testées (CI₅₀).

IX.3. Méthode d'étude de l'effet des monomères et de leurs fractions d'oligomères testés sur l'ADN nucléaire des cellules K562: Test des comètes

Le test des comètes permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, ou indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages à l'ADN et enfin lors de processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose. Ce test permet d'établir la relation dose-effet. C'est un test d'électrophorèse en gel d'agarose de cellules isolées. Après électrophorèse, les noyaux dont l'ADN a subi des cassures prennent une forme de comète et les noyaux dont l'ADN n'est pas endommagé ont une forme ronde.

En utilisant la version alcaline du test, les cassures simples ou doubles brins peuvent être détectées (Singh et al., 1988). Le test des comètes a été réalisé selon la méthode décrite par Collins et al. (Collins et al., 1996) et par Bouhleb et al. (Bouhleb et al., 2008).

IX.3.1. Traitement des cellules

Afin d'étudier l'activité génotoxique, 5.10^5 cellules sont incubées en présence de 100 μ l de la concentration des molécules à tester pendant 24 heures. Pour évaluer l'activité antigénotoxique des molécules testées vis-à-vis du H_2O_2 , 100 μ l de la concentration d'échantillon à tester sont incubés pendant 24 heures avec 5.10^5 cellules traitées par l'agent stressant l' H_2O_2 (75 μ M) pendant 2 heures.

Les concentrations des molécules choisies pour ce test correspondent aux valeurs de leur CI_{50} .

IX.3.2. Inclusion des cellules dans le gel d'agarose 1%

• Préparation des lames

Afin de préparer les lames, 120 μ l d'un mélange constitué de 60 μ l de la suspension cellulaire contenant environ 2.10^4 cellules sont mélangés à 60 μ l d'agarose à bas point de fusion « Low Melting » (1,2 %), sont déposés sur une lame préalablement recouverte d'une sous-couche d'agarose 1%. Ces lames sont alors recouvertes de lamelles, puis déposées sur la glace à l'abri de la lumière pendant 10 min.

• Lyse des cellules

Après avoir retiré les lamelles délicatement, les lames sont trempées dans un tampon de lyse (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X- 100 et 10% DMSO, pH 10). L'ensemble est placé à 4°C pendant une heure.

• Électrophorèse

Les lames sont disposées dans la cuve d'électrophorèse, recouvertes de tampon (EDTA 200 mM, NaOH 10N, pH 10) et maintenues dans l'obscurité pendant 20 min, à température

ambiante (cette étape permet le déroulement de l'ADN). Les lames sont alors soumises à un champ électrique de 25 V et 300 mA pendant 15 min.

- **La neutralisation**

Après migration, les lames sont rincées avec le tampon de neutralisation froid (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) trois fois pendant 5 min, puis égouttées délicatement.

- **Révélation de l'ADN**

Une solution de BET (bromure d'éthidium) à 20 µg/ml est préparée extemporanément. 50 µl de cette solution sont déposés sur chaque lame et on la recouvre d'une lamelle. Ces lames sont alors déposées dans une boîte sur du papier humidifié avec de l'eau et placées à 4°C jusqu'à la lecture.

IX.3.3. Lecture et analyse des résultats

- **Lecture**

La lecture est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence. C'est un microscope photonique équipé de deux lampes, une lampe ordinaire pour une observation classique par transmission et une lampe à arc pour la fluorescence. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émission permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité. L'ADN de nos cellules est alors visualisé grâce au BET ($\lambda_{ex}=545\text{ nm}$ et $\lambda_{em}=605\text{ nm}$) qui le rend fluorescent.

- **Analyse des résultats**

Deux propriétés sont importantes pour évaluer la migration de l'ADN. D'une part, la capacité de l'ADN à migrer, qui est en fonction de la taille et donc du nombre de coupures de l'ADN et d'autre part, la longueur de la queue d'ADN, qui augmente avec le nombre de cassures pour atteindre ensuite un maximum dépendant en grande partie des conditions électrophorétiques. Le taux de dégradation de l'ADN peut être évalué par plusieurs paramètres :

- La longueur de la queue
- Le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète
- Le « Tail extent moment » c'est le produit de la longueur de la queue et du pourcentage d'ADN dans la queue (Figure 36)

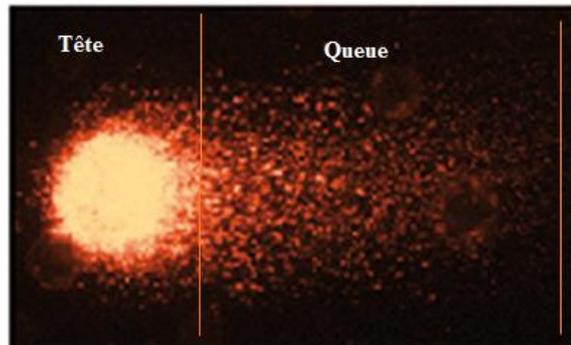


Figure 36. Image d'une comète typique, avec une tête et une queue

Le paramètre d'analyse permettant d'évaluer le taux de dégradation de l'ADN est le pourcentage du nombre de cellules appartenant à chaque classe de cellules (Figure 37), selon le degré de dommages engendrés au niveau de l'ADN. L'analyse est réalisée sur 3 lames à raison de 200 cellules/lame/dose. Ces pourcentages nous permettent d'évaluer un score total (ST) selon la formule suivante :

$$\text{Score total (ST)} = [(\% \text{ de cellules de classe } 0 \times 0) + (\% \text{ de cellules de classe } 1 \times 1) + (\% \text{ de cellules de classe } 2 \times 2) + (\% \text{ de cellules de classe } 3 \times 3) + (\% \text{ de cellules de classe } 4 \times 4)] \times 100$$

Les cellules de la classe 0 n'ont pas été stressées, le noyau est parfaitement rond. Par contre les noyaux cellulaires de la classe 1, 2, 3, et 4 présentent des formes de comètes plus ou moins importantes dues à des cassures au niveau de l'ADN.

Le pourcentage du pouvoir génotoxique (**PG**) et antigénotoxique (**PAG**) sont calculés à partir du score total selon les formules suivantes :

$$\% \text{ PG} = [(ST_{\text{Mol}} - ST_{\text{TN}}) / ST_{\text{TN}}] \times 100$$

$$\% \text{ PAG} = 1 - [(ST_{\text{Mol}} - ST_{\text{TN}}) / (ST_{\text{TP}} - ST_{\text{TN}})] \times 100$$

ST_{Mol} : Score total des molécules testées.

ST_{TN} : Score total des cellules témoins non traitées.

ST_{TP} : Score total des cellules traitées par le H₂O₂ (75 µM).

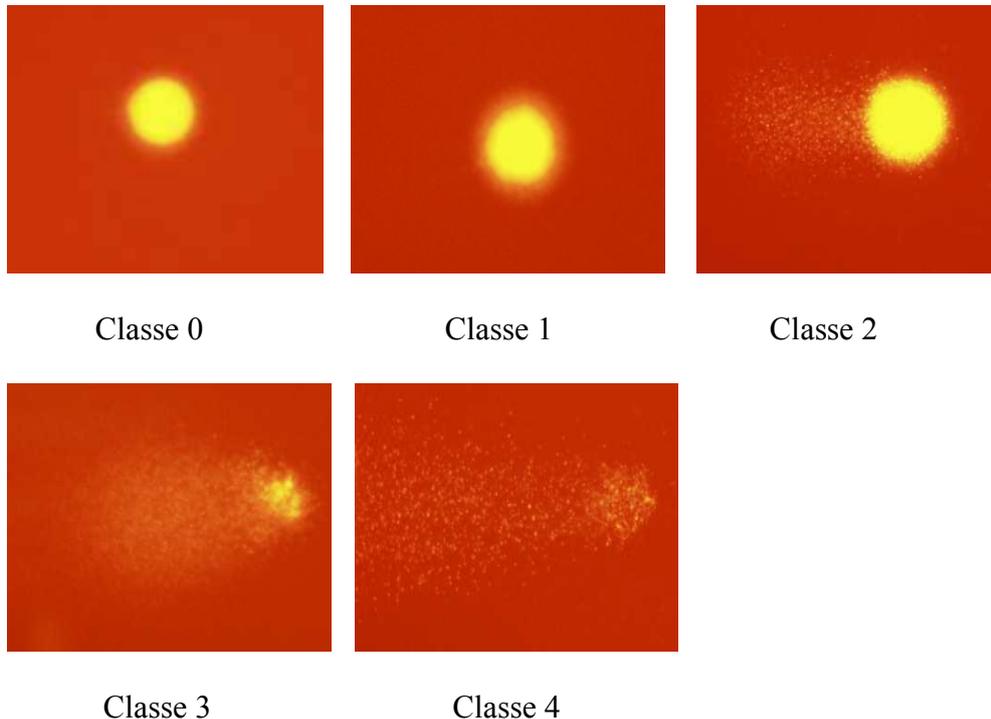


Figure 37. Profil des différents types de comètes observées au microscope, classés en fonction du taux de dégradation de l'ADN.

IX.4. Etude de l'activité immunomodulatrice des monomères et de leurs fractions d'oligomères

IX.4.1. Etude de l'effet de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur la prolifération des splénocytes

- **Principe**

Les splénocytes sont de bons indicateurs du déroulement de l'activité immunitaire. L'effet des molécules à tester sur les cultures de splénocytes a été réalisé à l'aide du MTT et ce dans un premier temps, en l'absence de mitogènes et dans un deuxième temps en présence de 2 mitogènes ; la lectine inductrice de lymphocyte T, et la lipopolysaccharide (LPS) inducteur de lymphocytes B.

- **Protocole**

- Prélèvement des splénocytes

Des souris BALB/C sont sacrifiées par dislocation cervicale. La rate est ensuite récupérée dans 4 ml de PBS froid puis émincé par des pinces stériles. Le surnageant est récupéré dans un tube de 15 ml stérile. Les tubes de 15 ml sont placés dans la glace pendant 5 minutes afin de décanter les débits membranaires. Le surnageant est récupéré dans un autre tube de 15 ml stérile puis centrifugé à 1500 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est suspendu dans 2 ml de tampon de lyse froid, puis incubé 10 minutes dans la glace. Après une deuxième centrifugation à 1500 rpm pendant 10 minutes à 4°C, le culot obtenu est lavé 2 fois par 2 ml de PBS puis suspendu dans 1 ml de RPMI complet (RPMI 1640, supplémenté par la L-glutamine (4 %), de 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 1% de gentamycine (100 µg/ml)). Après le comptage des cellules au niveau du culot à l'aide du bleu de trypan, celui-ci est dilué afin d'avoir une concentration cellulaire de $5 \cdot 10^5$ cellule/ml.

- Etude de la prolifération des splénocytes en absence de mitogènes

Cent µl de la suspension cellulaire ($5 \cdot 10^5$ cellule/ml) sont répartis dans chaque puits d'une plaque de 96.

La plaque est incubé pendant 24 h à 37°C sous atmosphère humide et à 5% de CO₂. 100 µl de la molécule à tester sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est reincubée pendant 48 h à 37°C sous atmosphère humide et à 5% de CO₂. Après centrifugation à 1500 rpm, le surnageant est jeté et 50 µl de MTT (1 mg/ml) sont ajoutés au culot. La plaque est incubée pendant 4 h à 37°C sous atmosphère humide et à 5% de CO₂. Après une étape de centrifugation à 1500 rpm, 100 µl de DMSO sont ajouté au culot. L'absorbance à 570 nm est noté pour chaque puits. Trois essais pour chaque concentration d'échantillon et un blanc sans l'échantillon sont réalisés pour chaque molécule à tester. Le blanc contient 100 µl de RPMI complet à la place de la molécule à tester.

Des témoins positifs, à savoir les cellules traitées uniquement par la lectine ou par le LPS (5 µg/ml) ont été utilisés.

Le pourcentage de prolifération est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ prolifération} = \frac{(DO \text{ essai} - DO \text{ contrôle négatif})}{DO \text{ contrôle négatif}} \times 100$$

- Etude de la prolifération des splénocytes en présence des mitogènes

La méthode est identique à celle décrite en absence de mitogène sauf que 28 µl de lectine ou de lipopolysaccharide (5 µg/ml) sont ajoutés simultanément aux 100 µl de chacune des concentrations de molécules à tester.

IX.4.2. Etude de l'effet de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur la prolifération de macrophages

• Principe

Les macrophages sont des cellules provenant de monocytes et sont primordiales pour la réaction anti-inflammatoire. L'étude de l'effet des monomères étudiés et de leurs fractions d'oligomère sur les macrophages est réalisée par évaluation de leurs effets sur l'activité lysosomale et la production du monoxyde d'azote (NO). En fait le monoxyde d'azote est produit par les macrophages lors d'une réaction inflammatoire. C'est un messager de l'action inflammatoire qui agit selon le mode de transmission paracrine, c'est-à-dire à proximité de son site de production conduisant à des réactions variées au cours de l'inflammation : c'est un puissant vasodilatateur (relaxation des cellules musculaires lisses des vaisseaux). Il diminue l'agrégation plaquettaire, régule le recrutement leucocytaire, participe à une action anti-microbienne (les radicaux libres de NO sont cytotoxiques). L'activité lysosomale quant à elle est exercée par le biais des enzymes lysosomales. Ces derniers sont déversés dans les vacuoles de phagocytose et interviennent dans la digestion des produits de phagocytose.

• Protocole

- Prélèvement de macrophages péritonéaux

Matériels et Méthodes

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, puis la face ventrale est nettoyée avec de l'alcool. Une petite incision est réalisée au niveau de la peau de la face ventrale des souris afin d'injecter 3 ml de PBS stérile dans sa cavité péritonéale. Après quelques minutes, le PBS introduit est récupéré. La cavité péritonéale est ainsi lavée plusieurs fois afin de récupérer le maximum des macrophages. Le PBS récupéré est ensuite centrifugé à 1500 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Le culot est dissous dans 1 ml de RPMI complet (RPMI 1640 supplémenté par la L-glutamine (4 %), de 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 1% de gentamycine (100 µg/ml)). Le nombre de cellules au niveau du culot est déterminé à l'aide de bleu de trypan et la suspension cellulaire est diluée jusqu'à atteindre une concentration de $6 \cdot 10^6$ cellules/ml.

-Dosage de l'activité lysosomale

Cent µl de la suspension cellulaire ($6 \cdot 10^6$ cellules/ml) sont répartis dans des plaques de 96 puits, au quels sont ajoutés 100 µl de l'échantillon à tester. Le témoin négatif contient 100 µl de RPMI complet à la place des 100 µl d'échantillon. Les plaques sont incubées pendant 48 H à 37°C, sous atmosphère humide et à 5% de CO₂. Les plaques sont ensuite centrifugées à 1500 rpm à 4°C pendant 10 minutes. 100 µl de surnageant sont placés dans une autre plaque de 96 puits, ils serviront à déterminer la production de monoxyde d'azote. Le culot cellulaire est repris dans 20 µl de Triton X-100 (1%), 10 µl de p-nitrophényl-phosphate (p-NPP) (100 mM) substrat de la phosphatase alcaline et 50 µl de tampon citrate (0,1 M, pH= 5). Le tout est incubé à 37°C, sous atmosphère humide et à 5% de CO₂, pendant 30 minutes à l'activité de la phosphatase alcaline est déterminée à 405 nm et le pourcentage de l'activité e, puis 150 ml de tampon borate (0,2 M, pH= 9,8) sont ajoutés et la densité optique associée est déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ activité lysosomale} = \left[\frac{(DO_{\text{essai}} - DO_{\text{contrôle négatif}})}{DO_{\text{contrôle négatif}}} \right] \times 100$$

Avec DO essai : densité optique au niveau des puits contenant la molécule à tester

DO contrôle négatif : densité optique au niveau du puits contenant sans la molécule à tester.

-Dosage de la production de monoxyde d'azote (NO)

Plusieurs études suggèrent que le NO, un dérivé radicalaire réactif, est impliqué dans de nombreux processus pathophysiologiques incluant l'inflammation (Coleman et al., 2001). Les quantités de NO ont été déterminées par le dosage du nitrite (NO₂) produit lors de la réaction du NO avec l'oxygène. Cent µl de surnageant contenant les nitrites a été incubé pendant 10 à 15 minutes à 37°C, sous atmosphère humide et à 5% de CO₂ avec le réactif de Griess de couleur grise, devenant rose violette par interaction avec le nitrite. Cette coloration est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le témoin négatif contient 100 µl de RPMI complet à la place des 100 µl de la molécule à tester. Une gamme étalon de monoxyde d'azote est réalisée en même temps à l'aide de nitrite de sodium (NaNO₂) afin de déterminer la quantité de NO libéré par les cellules traitées par rapport aux cellules non traitées.

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats et Discussion

Partie I : Oligomérisation enzymatique de la rutine et de l'esculine

L'oligomérisation d'espèces phénoliques et notamment de flavonoïdes est susceptible de modifier leur solubilité, leur stabilité tout en maintenant ou en augmentant leurs capacités antioxydantes (Desentis-Mendoza et al., 2006 ; Anthoni et al., 2008 ; Anthoni et al., 2010). Dans ce chapitre, les résultats obtenus concernant l'oligomérisation de la rutine et de l'esculine seront présentés et discutés. Le choix de ces deux polyphénols est justifié du fait de leurs propriétés biologiques bénéfiques (antioxydantes, anticancéreuses, antiulcéreuses, antiinflammatoires) mises en évidence par plusieurs auteurs (Teel et Castonguay, 1992 ; La Casa et al., 2000 ; Kaneko et al., 2007 ; Yang et al., 2008 ; Lin et al., 2009).

I. Oligomérisation enzymatique de la rutine et de l'esculine

L'oligomérisation de la rutine (figure 38) et de l'esculine (figure 39) a été effectuée en présence d'une enzyme ; la laccase de *Trametes versicolor* dans un milieu réactionnel eau/méthanol (70 :30 v/v) à 20°C.

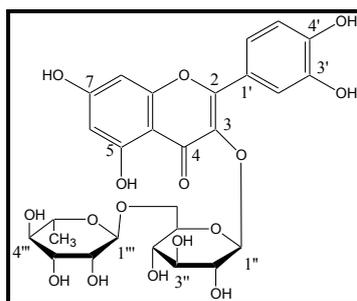


Figure 38. Structure chimique de la rutine.

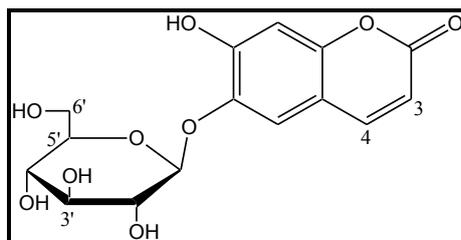


Figure 39. Structure chimique de l'esculine.

Les cinétiques d'oligomérisation de la rutine et de l'esculine par la laccase de *Trametes versicolor* ont été suivies par SEC-UV à 280 nm. Les figures 40 et 41 montrent que la masse moléculaire moyenne (Mw) peut atteindre 4584,1 g/mol au bout de 24 h de réaction pour la rutine et 3198,3 g/mol pour l'esculine au bout de 72 h.

L'arrêt de la réaction de polymérisation a été attribué à plusieurs facteurs (Kulys et Vidziunaitė, 2002 ; Kulys et Vidziunaitė, 2002 ; Kurisawa, et al., 2003). En effet, Kulys et Vidziunaite (Kulys et Vidziunaitė, 2002), ont démontré une baisse de 2,5 à 4,1 fois de l'activité des laccases de *Polyporus pinsitus*, de *Myceliophthora thermophyra*, de *Coprinus cinereus*, et de *Rhizoctonia solani* en présence de leurs produits de polymérisation. Il semblerait que les propriétés chélatantes de la rutine et de l'esculine soient amplifiées par les réactions de polymérisation. Ainsi, les oligomères obtenus peuvent inhiber l'enzyme en piégeant les ions cuivres du site actif de l'enzyme.

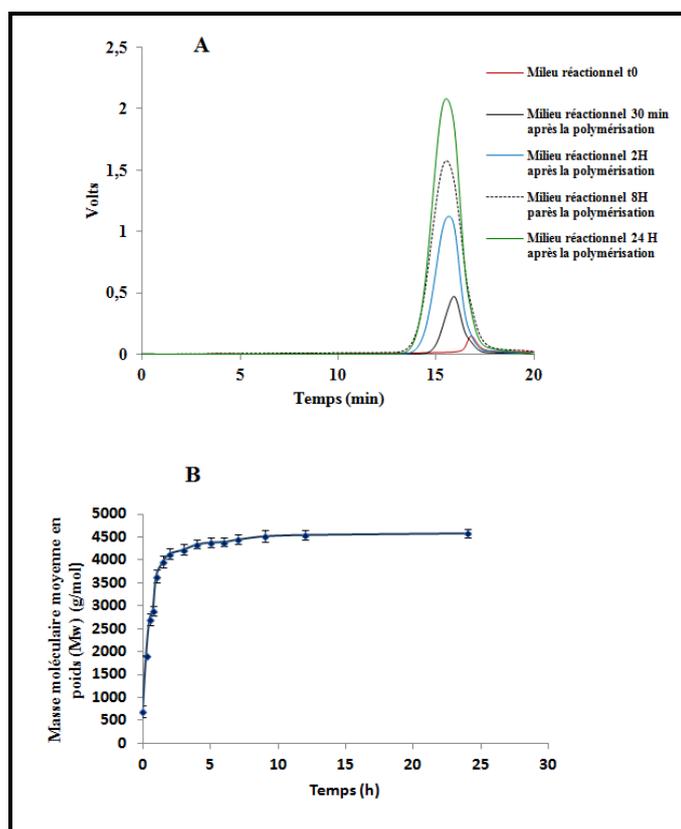


Figure 40. A : Cinétique de polymérisation de la rutine par la laccase de *Trametes versicolor* déterminée par SEC-UV à 280 nm, en utilisant le diméthylformamide (DMF) avec 1 % LiBr

comme phase mobile à un débit de 0,5 ml/min. B : évolution de la masse moléculaire moyenne au cours de la polymérisation de la rutin déterminée par SEC-UV à 280 nm, en utilisant le diméthylformamide (DMF) avec 1 % LiBr comme phase mobile à un débit de 0,5 ml/min.

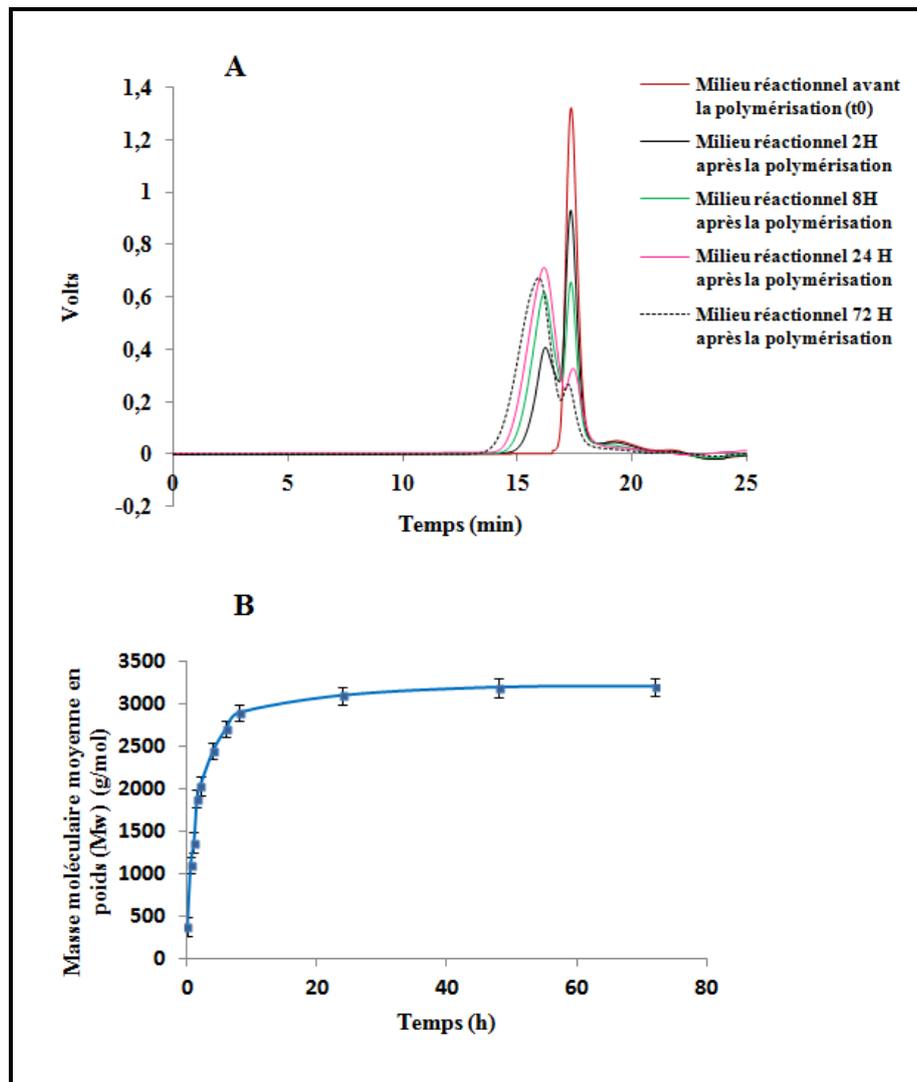


Figure 41. A : Cinétique de polymérisation de l'esculine par la laccase de *Trametes versicolor* déterminée par SEC-UV à 280 nm, en utilisant le diméthylformamide (DMF) avec 1 % LiBr comme phase mobile à un débit de 0,5 ml/min. B : évolution de la masse moléculaire moyenne au cours de la polymérisation de l'esculine déterminée par SEC-UV à 280 nm, en utilisant le diméthylformamide (DMF) avec 1 % LiBr comme phase mobile à un débit de 0,5 ml/min.

I.1. Séparation des oligomères

Les oligomères obtenus à la fin de la réaction de polymérisation sont séparés par filtration tangentielle, en utilisant des membranes de différentes porosités (1 KDa, 3 KDa, 5KDa et 15

KD). Cinq fractions d'oligomères ont été obtenues pour chaque monomère (tableau 1). La masse moléculaire moyenne en poids (\overline{M}_w), la polydispersité (PDI) et l'indice de la masse moléculaire moyenne en poids (I_M) des oligomères obtenus ont été déterminés par SEC-UV, en utilisant le DMF avec 1 % LiBr comme phase mobile à un débit de 0,5 ml/min (tableau 1).

Tableau1. La masse moléculaire moyenne en poids (\overline{M}_w), la polydispersité (PDI) et l'indice de la masse moléculaire moyenne en poids (I_M) des oligomères obtenus.

Fractions	\overline{M}_w (g/mol)	PDI	I_M
Rutine (R)	611.21	1.00	1.00
R1 (perméat de la Mb 1KD)	2127.42	1.17	3.48
R2 (perméat de la Mb 3 KD)	4301.80	1.37	7.05
R3 (perméat de la Mb 5 KD)	5069.93	1.36	8.30
R4 (retentat de la Mb 5 KD)	7106.54	1.35	11.64
R5 (retentat de la Mb 15 KD)	8331.85	1.42	13.65
Esculine (E)	339.36	1.00	1.00
E1 (perméat de la Mb 1KD)	688.12	1.31	1.31
E2 (retentat de la Mb 1KD)	1021.33	1.48	1.48
E3 (retentat de la Mb 3 KD)	3042.10	1.39	1.39
E4 (retentat de la Mb 5 KD)	5080.43	1.41	1.41
E5 (retentat de la Mb 15 KD)	6973.00	1.54	1.54

Avec Mb 15 KD: membrane 15 KDa; Mb 1KD: membrane 1 KDa; Mb 3 KD: membrane 3 KDa; Mb 5 KD: membrane 5KDa; I_M : Indice de la masse moléculaire moyenne en poids; PDI: polydispersité; \overline{M}_w : La masse moléculaire moyenne en poids.

I.2. Analyse de la structure des fractions d'oligomères obtenus

La structure des oligomères et notamment le pontage reliant deux unités monomériques influence les propriétés des polymères. Une étude de la structure des oligomères synthétisés par UV, FTIR, H-RMN, C-RMN a donc été réalisée.

I.2.1. Analyses Ultraviolet des oligomères

Le spectre ultraviolet (UV) de la rutine dans un mélange eau/méthanol (70 :30 v/v) présente deux maximum d'absorption à 282 nm (bande I) et 359 nm (bande II), à cause de la transition π - π^* des électrons du cycle aromatique. Pour les fractions d'oligorutines (R2, R3 et R5) la bande II est plus large et présente un déplacement de 5 nm. Un tel comportement a été observé par d'autres auteurs au cours de la polymérisation de flavonoïdes. En effet, Markham (Markham, 1982) a indiqué que la présence d'un substituant en position 5,7 et 4' sur la structure d'un flavonoïde aboutit toujours à un déplacement.

Les spectres UV de l'esculine et des fractions d'esculine (E2, E3, E4 et E5) présentent les mêmes pics avec un maximum d'absorption à une longueur d'onde de 345 nm. Cependant, ce pic est plus large au niveau du spectre de la fraction d'oligoesculine E5. Ceci pourrait être attribué à la structure conjuguée des oligomères (Kurisawa et al., 2003a). Un spectre sémi-laire a été observé par Anthoni et al. (Anthoni et al., 2008) au cours de la polymérisation de l'esculine.

I.2.2. Analyse FTIR (Infrarouge à Transformée de Fourier) des fractions d'oligomères

Les spectres Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) de la rutine et des fractions d'oligorutine obtenus sont présentés dans les annexes (figures 1 à 3 en annexe). Le spectre FTIR de la fraction de la rutine R1, montre une nouvelle bande à 1220 cm^{-1} . Cette nouvelle bande indique la formation d'une liaison C-O au cours de la polymérisation. La bande 1747 cm^{-1} , présente au niveau de la rutine et correspondant à une bande C-H, a disparu au niveau du spectre de la fraction d'oligorutine R1. Une autre nouvelle bande a été détecté à 1465 cm^{-1} , au niveau de la fraction d'oligorutine R5 et qui a été attribué à un liaison C-C. Une troisième nouvelle bande à 1674 cm^{-1} a été noté au niveau du spectre des fractions d'oligorutine R3 et R5. Cette bande serait attribué à une nouvelle liaison C=O.

Ces résultats indiquent que les fractions d'oligorutine obtenues ont été formés à travers des liaisons C-O, C-C et C=O. En effet, plusieurs auteurs ont montré que les polymères flavonoïques sont composés d'unités de phénylène et/ou d'oxyphénylène (Kobayashi et al., 2001 ; Uyama et

al., 2002 ; Anthni et al., 2008). De plus, Uzan et al.(Uzan et al., 2011) pensent que la polymérisation de la rutine par la laccase de *Pycnococcus*, se fait à travers des liaisons C-C et C-O et plus précisément des liaisons C8-C8, C6-O4' et C8-C5' (Uzan et al., 2011).

Les spectres FTIR des fractions d'oligoesculine (E2, E3, E4 et E5) (figures de 4 à 7 en annexe) montrent une nouvelle bande à 1400 cm^{-1} , qui pourrait être attribué à une nouvelle liaison C-C.

En effet, Anthoni et al. (Anthoni et al., 2010) ont rapporté que la polymérisation de l'esculine se fait à travers des liaisons C-C et C-O aussi bien sur la partie phénolique que sur la partie glycosylée de cette coumarine. Par ailleurs, une étude par modélisation moléculaire par ces mêmes auteurs, indique que la liaison la plus favorable au cours de la polymérisation de la rutine et de type C8-C8 (Anthoni et al., 2010).

I.2.3. Les analyses par résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -RMN) des oligomères obtenus

✓ (^1H -RMN) de la rutine et des fractions d'oligorutines

L'analyse par résonance magnétique nucléaire du proton de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères a été réalisée à l'aide d'un spectromètre Bruker DRX 300 MHz , les molécules ont été reprises dans du $\text{DMSO-}d_6$ à une concentration de 3 g/l et une température de 20°C .

Les spectres ^1H -RMN obtenus pour la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères sont représentés par les figures de 9 à 16 dans la partie annexe.

La rutine présente les signaux suivant :

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): $\delta = 3,4- 5,3$ (H de la partie sucre); 6,20 (H-6); 6,4 (H-8); 6.84 ($J_{\text{H-5'}/\text{H-6'}} = 0.2\text{ Hz}$, H-5'); 7,5 (H-2'); 7,55 ($J_{\text{H-5'}/\text{H-6'}} = 0.2\text{ Hz}$, H-6') ppm.

Pour R2 :

^1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): $\delta = 3,4- 5,3$ (H de la partie sucre); 6,66 ($J_{\text{H-5'}/\text{H-6'}} = 0.2\text{ Hz}$, H-5'); 7,55 ($J_{\text{H-5'}/\text{H-6'}} = 0.2\text{ Hz}$, 6'-H) ppm. Les autres signaux présents sur le spectre RMN de

l'oligorutine R2 n'ont pas pu être attribués à des protons. De nouveaux signaux apparaissent à 4,31 ppm, et dans la zone entre 5 et 5,5 ppm qu'on n'a pas pu être attribués à un proton bien déterminé.

Pour R3 :

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): $\delta=3,4-5,35$ (H de la partie sucre) ; 5,4 (H-6); 6,6 (H-8); 7,22 (H-2') ppm.

Pour R5 :

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz $\delta= 3,4- 5,3$ (H de la partie sucre); 6,2 (H-6); 6,4 (H-8); 6,8 (H-5') ppm.

En comparant le spectre de la rutine à celui des fractions d'oligorutines (R2 et R5) (figures de 8 à 11 dans la partie annexe) montrent des signaux plus larges, on remarque également au niveau de ses spectres l'apparition de nouveau signaux à 4,31 ppm, et dans la zone entre 5 et 5,5 ppm. De même qu'un signal à 4,52 ppm au niveau du spectre de la fraction d'oligorutine R2. Toutefois ces signaux n'ont pas pu être attribués à des protons bien déterminés. Ceci indique que la polymérisation a peut être eu lieu au niveau de la partie glycosylée de la rutine, sans pouvoir préciser à quel niveau exactement. L'analyse $^1\text{H-NMR}$ des fractions d'oligorutines obtenues a déjà été rapportée par Kurisawa et al. (Kurisawa et al., 2003a) . Ces auteurs ont montré des signaux plus larges au niveau des signaux d'oligomères à δ 0,8-1,3 ; 3-4 ; 4,4-5 ppm, toutefois cette étude n'a pas permis l'identification ni du type, ni de la localisation des liaisons formées au cours de la polymérisation de la rutine. Anthoni et al. (Anthoni et al., 2008) ont également étudié la structure des oligorutines par $^1\text{H-NMR}$ et ces auteurs ont identifié des liaisons de type C2'-O4' et C2'-C2'. Cette même étude menée par Anthoni et al.(Anthoni et al., 2008) a montré qu'au niveau des spectres $^1\text{H-NMR}$ des fractions d'oligorutines les signaux étaient plus larges que ce soit au niveau de la partie sucre, ou au niveau de la partie aromatique des oligomères. Ces auteurs (Anthoni et al., 2008) ont pu ainsi supposé que la partie sucre ainsi que la partie

aromatique interviennent au cours de la réaction de polymérisation de la rutine. Uzan et al. (Uzan et al., 2011) ont pu déterminer l'apparition de liaisons de types C8-C8 et C6-O4 lors de l'analyse au moyen d'ionisation par électronébulation associé à une spectroscopie de masse (ESI-MS : ElectroSpray Ionization- Mass Spectroscopy), de la structure des dirutines et des trirutines.

✓ **RMN du proton (¹H-RMN) de l'esculine et des fractions et d'oligoesculine**

Le spectre ¹H-RMN de l'esculine présente les signaux suivant :

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ= 3,3 (H-4'); 3,5 (H-2'); 3,5 (H-3'); 3,5 (H-5') ; 3,72 (H-6') ; 4,78 (H-1') . 6,2 (J_{H-3/H-4}=0,33 Hz, H-3); 6,82 (H-8); 7,41 (H-5); 7,85 (J_{H-4/H-3}= 0,33 Hz ,H-4) ppm.

Le spectre ¹H-RMN de la fraction d'oligoesculine E2 :

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ= 3,31 (H-4'); 3,5 (H-2'); 3,5 (H-3'); 3,5 (H-5') ; 3,73 (H-6') ; 4,75 (H-1') ; 6,16 (J_{H-3/H-4} = 0,32 Hz, H-3) ; 6,75 (H₈); 7,37 (H-5); 7,83 (J_{H-4/H-3} =0,32 Hz, H-4) ppm

Le spectre ¹H-RMN de la fraction d'oligoesculine E3 :

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ= 3,3 (H-4'); 3,5 (H-2'); 3,5 (H-3'); 3,5 (H-5') ; 3,75 (H-6') ; 4,77 (H-1') ; 6,18 (J_{H-3/H-4} =0,33 Hz, H-3); 6,77 (H-8); 7,37 (H-5); 7,85 (J_{H-4/H-3} =0,33 Hz, H-4) ppm.

Le spectre ¹H-RMN de la fraction d'oligoesculine E4 :

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ= 3,3 (H-4') ; 3,52 (H-2') ; 3,52 (H-3') ; 3,52 (H-5') ; 3,76 (H-6') ; 4,79 (H-1') ; 6,20 (J_{H-3/H-4} = 0,33 Hz, H-3); 6,78 (H-8); 7,38 (H-5); 7,86 (J_{H-4/H-3} = 0,33 Hz, H-4) ppm

Le spectre ¹H-RMN de la fraction d'oligoesculine E5 :

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz): $\delta = 3,32$ (H-4'); 3,55 (H-2') ; 3,55 (H-3'); 3,55 (H-5'); 3,78 (H-6'); 4,8 (H-1'); 6,25 ($J_{\text{H-3/H-4}} = 0,33$ Hz, H-3); 6,83 (H₈); 7,42 (H₅); 7,89 ($J_{\text{H-4/H-3}} = 0,33$ Hz, H-4) ppm

La comparaison du spectre de l'esculine à ceux des fractions d'oligoesculines obtenus (E2, E3, E4 et E5) (figures 12 à 16 en annexe) révèle que toutes les signaux présents au niveau du spectre de l'esculine sont retrouvés au niveau des spectres correspondant aux fractions d'oligoesculine. Cependant, 3 nouveaux signaux apparaissent sur les spectres des fractions d'oligoesculines E4 et E5 : le premier signal est à 7,61 ppm, il correspondra à un déplacement chimique (shift up) du H₅ ou au déplacement chimique du H-4 (shift down) expliqué par la formation d'une liaison C4-O7 ; les 2 autres signaux à 8,02 et 8,3 ppm sont probablement dus à un déplacement chimique (shift up) du H₄. Ces résultats indiqueraient que les protons en position 4 et 5 pourraient être impliqués dans la polymérisation de l'esculine, de même que la persistance d'une certaine quantité d'esculine dans la fraction E5.

Anthoni et al. (Anthoni et al., 2010) ont observé l'apparition d'un nouveau signal à 7,5 ppm sur les spectres des fractions d'oligorutine obtenus après filtration sur des membranes de porosité 50 KDa, 8KDa et 3KDa. Ces signaux sont attribués soit à un déplacement du H-5 (shift down) due à la formation d'une liaison C4-O7, soit un déplacement du H₄ (shift up) due à la formation d'une liaison C3-C (Anthoni et al., 2010). L'étude par modélisation moléculaire menée par ces mêmes auteurs a montré qu'une liaison de type C8-C8 est la plus probable.

✓ **Description des spectres RMN du carbone 13 ($^{13}\text{C-RMN}$) de la rutine et des fractions et d'oligorutines**

Les spectres $^{13}\text{C-RMN}$ des fractions d'oligorutines (R2, R3 et R5) (figures 18 à 20 en annexe) montrent les mêmes signaux que la rutine (figure 17 en annexe), sauf qu'au niveau du spectre de la fraction d'oligorutine R2, on remarque des signaux plus larges que ceux obtenus avec la rutine, Cet élargissement à la base des signaux serait dû à une grande diversité dans le type et la

localisation du pontage entre unités monomériques. En plus le spectre de la fraction R2 présente quelques nouveaux signaux entre 126,5 et 131 ppm qui peuvent correspondre à un déplacement en 3C ou en 6'C. Ceci implique que les carbones en position 3 et 6' ont été probablement impliqués dans la polymérisation. Un autre nouveau signal a été identifié à 111,5 ppm au niveau du spectre de la fraction d'oligoesculine R5. Ce signal peut correspondre à un déplacement des carbones en position 5' ou 10.

✓ **Description des spectres RMN du carbone 13 (¹³C-RMN) de l'esculine et des fractions d'oligoesculine**

Les spectres ¹³C-RMN des fractions d'oligoesculine (E2, E3, E4 et E5) (figures 22 à 25 en annexe) montrent plusieurs déplacements chimiques. Le plus important déplacement chimique (+2,69 ppm) a été observé pour le carbone en position 7, au niveau du spectre de la fraction d'oligoesculine E2. Sur ce même spectre un déplacement de +0,52 ppm du carbone en position 9, un déplacement de -0,64 ppm du carbone en position 6, un déplacement de - 1,59 ppm du carbone en position 3 et enfin un déplacement de - 1,44 ppm du carbone 10 ont été observés.

Des déplacements de +1,1 ppm du carbone en position 7, de -0,93 ppm du carbone en position 3 et de -0,86 ppm du carbone 10 ont été notés au niveau du spectre de la fraction d'oligoesculine E3.

Le spectre de la fraction d'oligoesculine E4 présente également des déplacements touchant les carbones en position 3, 7 et 10. En effet des déplacements de +0,52 ppm du carbone 7, de -0,65 ppm du carbone 3 et de -0,62 ppm du carbone 10 ont été observés au niveau de ce spectre.

Le spectre d'oligoesculine E5 ne montre pas de déplacement par rapport à l'esculine, mais il apparaît des nouveaux signaux à 159,5 ppm, 149 ppm et 108 ppm qui n'ont pas pu être attribués à des carbones bien précis.

Une spectroscopie RMN par ordre de diffusion (Dosy) de la fraction d'oligoesculine E5 (figure 27 et 28 en annexes) révèle l'apparition de nouveaux signaux qui correspondraient à des

molécules de masse moléculaire plus importante, migrant à une vitesse moins importante ($7,3 \cdot 10^7 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) comparé au signaux présents au niveau du spectre de l'esculine (figure 26 en annexe) qui migre à une vitesse de $1,21 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Ces observations confirment le déroulement de la polymérisation, mais indiquent également la présence de l'esculine au niveau de la fraction E5.

En conclusion, l'investigation de la structure des fractions d'oligorutine a permis de mettre en évidence que ces derniers se forment à travers des liaisons C-C, C-O et C=O. Les spectres RMN du proton et du carbone montrent que la polymérisation de la rutine touche aussi bien la partie glycosylé que la partie phénolique du monomère. Toutefois, le type de pontage exacte n'a pas pu être mis en évidence. La plupart des auteurs formulent des hypothèses concernant le type de liaisons formées au cours de la polymérisation de monomères flavonoïdique (Kobayashi et al., 2001 ; Kurisawa et al., 2003 ; Kurisawa et al., 2003a ; Anthoni et al., 2008). Rares sont ceux qui ont pu déterminer formellement le type et la localisation de liaisons formées au cours des réactions de polymérisation enzymatique des flavonoïdes (Uzan et al., 2011).

La rutine et l'esculine sont connues pour leurs divers activités biologiques tels que leurs pouvoirs antioxydant, antiradicalaire vis-à-vis de divers radicaux, anti-inflammatoire, anticancéreux (Gacche et Jadhav, 2012 ; Selloum et al., 2003 ; Torres et al., 2006 ; Tian et al., 2008 ; Yang et al., 2008). Certaines études ont montré que la polymérisation enzymatique des composés phénoliques peut améliorer leurs activités biologiques (Kurisawa et al., 2003a, b ; Desentis-Mendoza et al., 2006 ; Uyama et al., 2006 ; Uzan et al., 2011). Ceci nous a orienté vers l'étude de certaines activités biologiques des oligomères obtenues.

Partie II- Etude de la solubilité des oligomères obtenus

Les flavonoïdes et les coumarines sont des métabolites secondaires de plantes qui attirent de plus en plus l'attention des chercheurs du fait de leurs activités biologiques intéressantes (Fesen et al., 1994 ; González-Gallego et al., 2007 ; Kaneko et al., 2007 ; De Medina et al., 2009 ; Gacche et Jadhav, 2012). Toutefois leur utilisation dans le domaine pharmaceutique se heurte à leur faible solubilité (Chebil et al., 2007). Plusieurs auteurs ont montré que la polymérisation enzymatique des flavonoïdes et des coumarines peut affecter leurs solubilité. La solubilité des fractions d'oligorutines (R2, R3 et R5) et des oligoesculines (E2, E3, E4 et E5) dans l'eau et dans l'éthanol a été étudié à 20°C. Les résultats sont illustrés dans les figures 42 et 43.

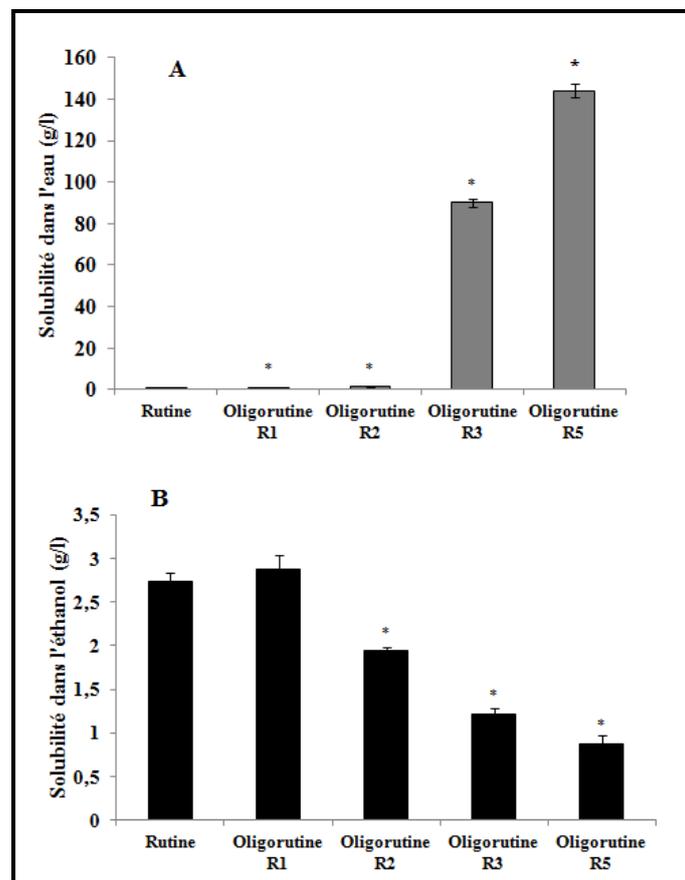


Figure 42. La solubilité de la rutine et des fractions d'oligorutine R1, R2, R3 et R5 dans l'eau (A) et dans l'éthanol (B). Avec * $p < 0.05$ qui implique une différence significative par rapport à la rutine en utilisant le test *t*-student

Les résultats de la solubilité de la rutine et des oligorutines (R1,R2, R3 et R5) dans l'eau à 20°C sont représentés dans la figure 42A. Les fractions d'oligorutines présentent une meilleure solubilité dans l'eau comparées à la rutine (0,41 g/l). Cette solubilité est d'autant plus importante que la masse moyenne ($\overline{M_w}$) de la fraction d'oligomère étudiée est élevée. La solubilité la plus importante dans l'eau a été noté en présence de la fraction d'oligorutine R5, qui est 351 fois plus soluble que son monomère. Des résultats similaires ont été cités par Kurisawa et al. (Kurisawa et al., 2003a) et Anthoni et al. (Anthoni et al., 2008) concernant la solubilité des oligorutines obtenus par polymérisation enzymatique en présence de laccase de différentes origines (*Myceliophthora* et *Trametes versicolor*). Anthoni et al. ont étudié la solubilité du milieu réactionnel enrichi en fraction d'oligorutine non séparés (Anthoni et al., 2008) alors qu'au cours de notre étude nous avons essayé de déterminer si des fractions d'oligorutines de différentes masses moléculaires moyenne peuvent avoir différentes solubilités.

La différence de solubilité entre la rutine et les fractions d'oligorutine (R1,R2, R3 et R5) peut être due aux différences structurales entre le monomère et les oligomères. En effet, une étude par modélisation moléculaire du comportement de la rutine et des oligomères réalisée par Anthoni et al. a montré que dans l'eau la rutine présente une structure repliée où le rhamnose et le cycle A du flavonoïde, se rapprochent (Anthoni et al., 2008). Cette même étude a démontré que les hexamères de rutine ont une structure plus plane où les sucres au niveau de la structure d'hexamère permettent un plus large contact avec les molécules d'eau. Anthoni et al. (Anthoni et al., 2008) ont montré qu'un hexamère de rutine est capable d'avoir 94 liaisons hydrogènes intermoléculaires avec les molécules d'eau, comparé à seulement 6 liaisons hydrogènes entre la rutine et les molécules d'eau. Cette capacité des oligomères à avoir des liaisons hydrogènes avec l'eau expliquerait leurs importante solubilité.

De même l'étude de la solubilité de l'esculine et de ses fractions d'oligomères (E1, E2, E3, E4 et E5) dans l'eau à 20°C montre une amélioration de celle-ci en présence des fractions

d'oligomères d'esculine comparée à la solubilité de l'esculine (1,93 g/l) (figure 43A). La solubilité des fractions d'oligoesculines est d'autant plus importante que la masse moléculaire moyenne est élevée. Ainsi la meilleure solubilité dans l'eau a été notée en présence de la fraction d'oligoesculine E5 (8,02 g/l). L'étude de la solubilité du milieu réactionnel enrichi en oligomère sans séparation réalisée par Anthoni et al. (Anthoni et al., 2010) a révélé une solubilité 189 fois meilleure en présence d'oligoesculines comparée à l'esculine, sans pouvoir préciser si la masse moléculaire moyenne des oligomères obtenus influençait ou pas cette solubilité. Une étude par modélisation moléculaire de l'interaction entre les molécules d'eau et de l'esculine, montre que cette dernière est capable d'avoir 7 à 9 liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau alors que la diesculine est capable d'avoir 22 liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau (Anthoni et al., 2010). Ceci peut expliquer l'importante solubilité des fractions d'oligorutine dans l'eau.

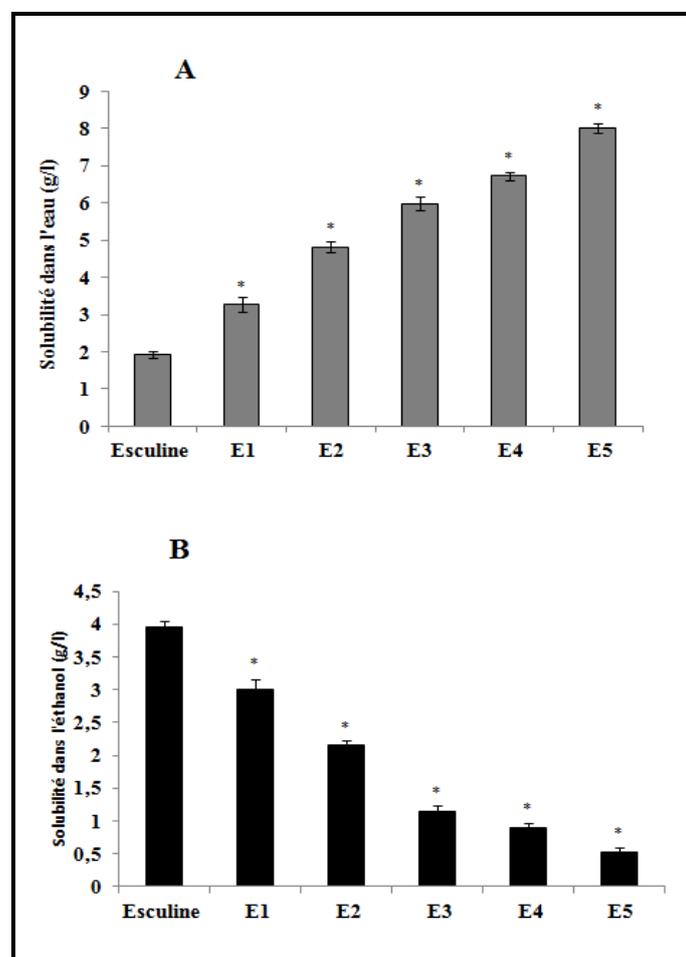


Figure 43. La solubilité de l'esculine et des fractions d'oligoesculine (E1, E2, E3, E4 et E5) dans l'eau (A) et dans l'éthanol (B). Avec $*p < 0.05$ qui implique une différence significative par rapport à l'esculine en utilisant le test *t*-student.

Comme le montre les résultats rapportés dans la figure 42B, la solubilité des fractions d'oligorutine (R1, R2, R3 et R5) dans l'éthanol, contrairement à celle dans l'eau est plus faible que celle de la rutine (2,73 g/l) sauf pour la fraction R1. La différence de solubilité entre la rutine et la fraction d'oligorutine R1 a été jugé statistiquement non significative. Cette différence peut être dûe à des erreurs de mesure. Pour les fractions d'oligorutine R2, R3 et R5, cette solubilité est d'autant moins importante que la masse moléculaire moyenne est plus élevée.

Beth et al. (Beth et Jack, 2003) ont rapporté la solubilité de différents polymères dans des solvants organiques. Ces auteurs ont démontré que la solubilité des polymères est inversement proportionnelle à leur masse. Cette théorie a été supportée par d'autres auteurs (Personage et al., 1987). D'autre part la solubilité des flavonoïdes dans l'éthanol a été étudiée par Saidman et al. (Saidman et al., 2002), qui ont expliqué la haute solubilité des flavonoïdes dans l'éthanol par leur capacité à avoir un nombre important de liaisons hydrogènes avec le solvant. On pense donc que la faible solubilité des fractions d'oligorutine obtenus dans l'éthanol pourrait être due à une capacité inférieure à celle de son monomère à avoir des liaisons hydrogènes avec le solvant.

De même que les fractions d'oligorutines, les fractions d'oligoesculines (E1, E2, E3, E4 et E5) montrent une solubilité réduite dans l'éthanol comparée à celle du monomère esculine, qui présente une solubilité de 3,95 g/l (figure 43B). La solubilité des fractions d'oligoesculines est inversement proportionnelle à leurs masses moléculaires moyennes. Par conséquent la fraction d'oligoesculine R5 possède la plus faible solubilité dans l'éthanol et qui atteint 0,53 g/l. Une faible solubilité des fractions d'oligoesculines a été également rapportée par Anthoni et al. dans un mélange contenant un solvant organique (un mélange eau/méthanol 70 :30 v/v) (Anthoni et al., 2010). Ces auteurs ont montré que les molécules de diesculine sont capables d'avoir 4

liaisons hydrogènes avec le mélange eau/ méthanol (70 :30 v/v) tandis que l'esculine est capable d'avoir 8 à 11 liaisons hydrogènes dans le même mélange (Anthoni et al., 2010). Une plus faible capacité des fractions d'oligoesculines à établir des liaisons hydrogènes avec les molécules d'éthanol pourrait expliquer leurs faibles solubilités dans ce solvant.

Il semble être très important de connaître la solubilité des fractions d'oligomères obtenus, vue l'importance de ce paramètre dans la biodisponibilité de ces molécules d'une part ; d'autre part et afin de pouvoir choisir des concentrations à la limite de la solubilité pour la partie suivante qui est l'étude des activités biologiques des fractions d'oligomères obtenus.

Partie III- Etudes des activités biologiques des oligomères obtenus

I. Etude des activités mutagène et antimutagène à l'aide de test d'Ames

I.1. Vérification des caractéristiques des souches utilisées

Les géotypes de chaque souche sont vérifiés et confirmés immédiatement après réception des cultures, ou lorsque la souche est décongelée. Le nombre de révertants spontanés pour chaque souche, leur besoin en histidine, ainsi leur sensibilité aux mutagènes standards sont également vérifiés. D'autres caractéristiques phénotypiques sont également vérifiées, à savoir la présence ou l'absence de plasmide de résistance, s'il y a lieu (résistance à l'ampicilline des souches *Salmonella typhimurium* TA102, TA104 et à la tetracycline pour la souche *S. typhimurium* TA102), ainsi que la présence des mutations caractéristiques (à savoir la mutation *rfa* d'après la sensibilité au cristal violet et la mutation *uvrB* d'après la sensibilité aux UV. Les souches doivent produire un nombre de colonies révertantes spontanés par boîte qui se situe dans la gamme de fréquences prévue sur la base des données historiques du laboratoire et de préférence comparable aux valeurs citées dans la littérature.

I. 1.1. Besoin en histidine

Après 24 h d'incubation à 37 °C, on observe pour les 2 souches testées, *S. typhimurium* TA102, TA 104, la présence d'un tapis de pousse bactérienne dense dans des boîtes contenant d'histidine. Cette pousse est absente dans les boîtes ne contenant pas d'histidine.

Cette expérience confirme le caractère *His⁻* de ces souches.

I. 1.2. Caractère « deep rough » (*rfa*)

Après 24 h d'incubation à 37°C, on observe une zone d'inhibition autour du disque, imbibé de cristal violet (10 µl à 1 mg/ml) et déposé sur un tapis bactérien de chacune des souches testées. Ceci est vrai pour les souches *S. typhimurium* TA102 et TA104. On en a conclu que toutes les souches testées ont la mutation *rfa*, ce qui permet aux grandes molécules de pénétrer dans la bactérie.

I.1.3. Résistance à l'ampicilline et à la tétracycline

Pour les souches *S. typhimurium* TA 102 et TA 104, on observe que la croissance bactérienne n'est pas inhibée à l'entourage de la strie d'ampicilline et/ou de tetracycline déposée sur la boîte de pétri de milieu nutritif.

I.1.4. Test aux rayons ultraviolets

Les bactéries ayant subi une irradiation aux rayons UV ne poussent pas au bout de 24h d'incubation à 37°C. Ceci est vrai pour toutes les souches testées. Nous avons, ainsi, pu vérifier la présence de la délétion *UvrB*, délétion qui bloque le processus de réparation des lésions par excision-resynthèse et augmente la réparation fautive SOS.

I.1.5. Le taux de réversions spontanées

Nous avons recherché le nombre de révertants spontanés obtenus au bout de 48h d'incubation à 37°C, en absence de la substance à tester, soit en présence, soit en absence de l'extrait microsomal S9.

I.2. Etude de l'activité mutagène à l'aide du test d'Ames

Les mutations sont des étapes importantes dans la carcinogénèse, par conséquent, des tests génétiques de courte durée, tels que le test d'Ames ont été utilisés avec succès pour la détection d'agents mutagènes donc potentiellement cancérigènes, ainsi que des agents antimutagènes donc ayant des chances d'avoir un potentiel anticarcinogène (Rausher et al., 1998 ; Edenharder et al., 1998).

Il apparait qu'aucun des monomères (la rutine et l'esculine) ni leurs fractions d'oligomères respectifs n'induisent une augmentation significative du nombre de révertants des souches *S. typhimurium* TA102 et *S. typhimurium* TA104, aussi bien avec ou sans activation métabolique en présence de l'extrait (S9) (Tableau 2). En effet, Un composé est considéré comme mutagène si le nombre de révertants par boîte est au moins doublé pour les souches *S. typhimurium* TA104 et TA102 (Maron et Ames, 1983 ; Marques et al., 2003).

Tableau 2. Etude de la mutagénicité de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères vis-à-vis des souches *S. typhimurium* TA104 et TA102 en présence et en absence d'un système d'activation métabolique exogène (S9)

Fractions	Dose (μ moles/boite)	Nombre de révertants TA104		Nombre de révertants TA102	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
Rutine	30	650 \pm 15	475 \pm 18	310 \pm 17	319 \pm 18
	60	606 \pm 21	491 \pm 02	337 \pm 24	313 \pm 12
	120	561 \pm 08	514 \pm 14	339 \pm 12	315 \pm 05
R2	30	507 \pm 15	497 \pm 10	262 \pm 13	338 \pm 09
	60	616 \pm 12	526 \pm 14	347 \pm 7	366 \pm 10
	120	702 \pm 04	520 \pm 04	322 \pm 8	370 \pm 04
R3	30	424 \pm 18	484 \pm 08	308 \pm 1	302 \pm 07
	60	430 \pm 23	570 \pm 13	320 \pm 23	366 \pm 08
	120	522 \pm 7	562 \pm 07	354 \pm 10	396 \pm 13
R5	30	492 \pm 14	462 \pm 04	288 \pm 3	322 \pm 04
	60	550 \pm 11	459 \pm 09	394 \pm 5	349 \pm 09
	120	675 \pm 11	479 \pm 11	421 \pm 16	379 \pm 12
Esculine	250	423 \pm 07	463 \pm 07	263 \pm 07	266 \pm 18
	500	417 \pm 02	467 \pm 06	267 \pm 02	274 \pm 12
	1000	412 \pm 03	472 \pm 13	272 \pm 03	283 \pm 05
E2	250	393 \pm 10	493 \pm 12	293 \pm 10	300 \pm 09
	500	416 \pm 04	466 \pm 04	316 \pm 04	310 \pm 10
	1000	429 \pm 03	492 \pm 13	293 \pm 03	331 \pm 04
E3	250	402 \pm 09	472 \pm 09	272 \pm 09	298 \pm 07
	500	396 \pm 03	496 \pm 03	296 \pm 03	306 \pm 08
	1000	413 \pm 12	483 \pm 04	313 \pm 12	319 \pm 13
E4	250	418 \pm 10	488 \pm 11	308 \pm 10	301 \pm 04
	500	422 \pm 02	502 \pm 02	302 \pm 02	299 \pm 09
	1000	430 \pm 07	483 \pm 17	283 \pm 07	292 \pm 12
E5	250	421 \pm 02	481 \pm 02	291 \pm 02	303 \pm 13
	500	425 \pm 06	495 \pm 16	305 \pm 06	316 \pm 15
	1000	432 \pm 05	481 \pm 02	320 \pm 05	332 \pm 04
Révertants spontanés		411 \pm 17	446 \pm 08	254 \pm 10	295 \pm 05
PC		1264 \pm 09 ^a	1257 \pm 05 [*]	267 \pm 06	708 \pm 26 [*]

Avec PC : Contrôle positive : *S.tyhimurium* TA104/-S9, MMS (325 μ g/boite); *S.tyhimurium* TA104/+S9, 2-AA (5 μ g/boite); *S.tyhimurium* TA102/-S9, MMS (130 μ g/boite); TA102/+S9, 2-AA (10 μ g/boite) ; MMS : méthylmethane sulfonate ; 2-AA: 2-amino anthracène ; NC: Contrôle négatif ; * :P<0,05.

I.3. Etude de l'activité antimutagène à l'aide du test d'Ames

Une fois le problème de mutagénicité écarté, du moins aux doses testées, je me suis intéressée à l'étude du potentiel antimutagène de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères

vis-à-vis des mêmes souches de *S. typhimurium*. Des doses de 5 et 10 ug / essai du mutagène de référence 2-AA, 325 et 130 µg / essai du mutagène de référence MMS ont été choisis pour les études d'antimutagenicité vis-à-vis respectivement des souches *S. typhimurium* TA104 et TA102, étant donné que ces doses induisent 1314 ± 21 (en présence de 5µg/essai de 2-AA) et 1234 ± 12 (en présence de 325 µg / essai de MMS) révertants de la souche *S. typhimurium* TA104. Le 2-AA à la concentration de 10 ug / essai, induit 803 ± 22 révertants et le MMS à la concentration de 130 µg / essai, induit 713 ± 06 révertants de la souche *S. typhimurium* TA102.

I.3.1. Etude de l'activité antimutagène directe

Nous avons évalué les capacités de la rutine et de l'esculine, ainsi que leurs fractions d'oligomères à diminuer l'effet mutagène induit par le MMS (Tableau 3).

Tableau 3: Effet de différentes concentrations de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomère sur la mutagenicité induite par le MMS chez *S. typhimurium* TA104 et TA102

Fractions	Dose (µmoles/boite)	<i>S. typhimurium</i> TA104		<i>S. typhimurium</i> TA102	
		Nb de révertants	% d'inhibition de la mutagenicité	Nb de révertants	% d'inhibition de la mutagenicité
Rutine	30	1151 ± 16	10.17*	631 ± 18	16.97*
	60	970 ± 18	32.35*	521 ± 11	39.75*
	120	817 ± 09	51.10*	433 ± 13	57.97*
R2	30	992 ± 21	29.65*	541 ± 16	35.61*
	60	873 ± 06	44.24*	472 ± 03	49.89*
	120	762 ± 11	57.84*	400 ± 12	64.80*
R3	30	910 ± 23	36.70*	506 ± 19	42.85*
	60	807 ± 16	52.32*	423 ± 22	60.04*
	120	706 ± 19	64.70*	364 ± 11	71.12*
R5	30	897 ± 07	41.29*	470 ± 05	50.31*
	60	764 ± 14	57.59*	381 ± 15	68.87*
	120	671 ± 19	68.99*	328 ± 18	79.71*
Esculine	250	1097 ± 03	16.78*	621 ± 09	19.04*
	500	992 ± 10	29.65*	557 ± 02	32.29*
	1000	896 ± 07	41.42*	499 ± 12	44.30*
E2	250	1017 ± 12	26.59*	572 ± 08	29.19*
	500	948 ± 06	35.04*	533 ± 10	37.26*
	1000	834 ± 05	49.01*	465 ± 06	51.34*

E3	250	962 ± 09	33.33*	543 ± 09	35.19*
	500	855 ± 05	46.44*	476 ± 06	49.06*
	1000	788 ± 06	54.65*	443 ± 12	55.90*
E4	250	930 ± 04	37.25*	523 ± 03	39.33*
	500	827 ± 02	49.87*	463 ± 05	51.75*
	1000	753 ± 08	58.94*	417 ± 07	61.28*
E5	250	909 ± 08	39.82*	497 ± 05	44.72*
	500	786 ± 02	54.90*	436 ± 06	57.34*
	1000	705 ± 05	64.82*	380 ± 02	68.94*
Révertants spontanés		418 ± 10	-	230 ± 12	-
MMS		1234 ± 12	-	713 ± 06	-

MMS: Méthylméthane sulfonate, *S. typhimurium* TA104/-S9, MMS (325 µg/essai); *S. typhimurium* TA102/-S9, MMS (130 µg/essai). *p < 0,05 qui implique un pourcentage significatif d'inhibition de la génotoxicité induite par le MMS.

Le tableau 3 montre que les fractions d'oligomères de rutine ont été les plus efficace dans la réduction de la mutagenicité directe provoquée par l'agent mutagène MMS aussi bien en présence de la souche *S. typhimurium* TA104 qu'en présence de la souche *S. typhimurium* TA102, comparé au monomère rutine. Toute les fractions d'oligorutine testées présentent des effets antimutagènes de type dose dépendant. La fraction d'oligorutine R5 montre le meilleur pouvoir inhibiteur de la mutagenicité induite par le MMS vis-à-vis des deux souches *S. typhimurium* TA104 et TA102 avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 69 et 79,7% à une dose de 120 µmoles/boite comparés aux pourcentages d'inhibition respectifs de 51,1 et 58%, obtenus vis-à-vis des mêmes 2 souche en présence du monomère à la même dose.

De même les fractions d'oligomères d'esculine testées (E2, E3, E4 et E5) présentent de meilleurs pouvoirs inhibiteurs de la mutagenicité induite par le MMS vis-à-vis des deux souches *S. typhirium* TA104 et TA102 comparé à celui de l'esculine (Tableau 4). Le monomère et toutes les fractions d'oligomères d'esculine étudiées montrent une activité antimutagène de type dose dépendant. Le pouvoir inhibiteur de la mutagenicité induite par le MMS est d'autant plus important que la masse moléculaire moyenne de la fraction d'oligomères d'esculine étudiée est élevée. La fraction E5 présente le pouvoir antimutagène le plus important que ce soit en

présence de la souche *S.typhimurium* TA104 ou TA102 avec des pourcentages respectifs d'inhibition maximale de la mutagénicité induite par le MMS de 64,8 et 68,9%.

I.3.2. Etude de l'activité antimutagène indirecte vis-à-vis du 2-aminoanthracène (2-AA)

Lors de l'étude mutagène, nous avons envisagé d'étudier les capacités antimutagènes des monomères (rutine ou esculine) et de leurs fractions d'oligomères en présence de l'extrait microsomal de métabolisation (S9). Ceci pour voir si ces flavonoïdes et coumarines testés après métabolisation expriment un meilleur ou un moins bon pouvoir antimutagène.

Cette étude a révélé que les fractions d'oligomères de rutine ont plus efficaces que le monomère dans la réduction de la mutagénicité induite par l'agent mutagène indirecte 2-AA en présence de *S.typhimurium* TA104 et TA102. Il apparaît, de la même façon que vis-à-vis du MMS, que la fraction d'oligorutine R5 ait le meilleur pouvoir inhibiteur de la mutagénicité induite par le 2-AA et ceci aussi bien en présence de la souche *S.typhimurium* TA104 qu'en présence de la souche *S.typhimurium* TA102 avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 82,4% et 89,2% à la plus forte dose testée (120 µmoles/boite). La rutine quand à elle présente des pourcentages d'inhibition maximum de la mutagénicité induite par le 2-AA de 60,1% et 70,1% à une dose de à 120 µmoles/boite respectivement en présence des souches souche *S.typhimurium* TA104 et TA102.

De même un meilleur pouvoir à inhiber la mutagénicité induite par le 2-AA a été observé en présence des fractions d'oligomères d'esculine (E2, E3, E4 et E5) comparé à celui de l'esculine. Les résultats illustrés dans le tableau 4 montrent que la fraction E5 s'avère la plus efficace à réduire la mutagénicité induite par le 2-AA avec des pourcentages d'inhibition qui atteignent 79,3% et 82,9 % à une dose de 1000 µmoles/boite, respectivement vis-à-vis de *S.typhimurium* TA104 et TA102. Les pourcentages d'inhibition de la mutagénicité induite par le 2-AA ne dépassent pas 61,9% et 67,4% à une dose de 1000 µmoles/boite de rutine en présence respectivement de *S.typhimurium* TA104 et TA102.

Tableau 4. Effet de différentes concentrations de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères respectifs, sur la mutagenicité induite par le 2-AA vis-à-vis de *S. typhimurium* TA104 et TA102 en présence de S9.

Fractions	Dose (μ moles/boite)	<i>S.typhimurium</i> TA104		<i>S.typhimurium</i> TA102	
		Nb révertants	% d'inhibition de la mutagenicité	Nb révertants	% d'inhibition de la mutagenicité
Rutine	30	1126 \pm 16	21.26*	635 \pm 08	30.27*
	60	991 \pm 24	36.53*	481 \pm 11	58.01*
	120	783 \pm 12	60.06*	414 \pm 14	70.09*
R2	30	1012 \pm 11	34.16*	579 \pm 10	40.36*
	60	883 \pm 17	48.75*	436 \pm 13	66.12*
	120	721 \pm 15	67.08*	360 \pm 06	79.81*
R3	30	910 \pm 20	36.70*	547 \pm 19	46.12*
	60	807 \pm 15	52.32*	408 \pm 22	71.17*
	120	678 \pm 09	71.94*	347 \pm 11	82.16*
R5	30	862 \pm 07	51.13*	470 \pm 12	60.31*
	60	754 \pm 14	63.34*	381 \pm 15	68.87*
	120	586 \pm 16	82.35*	308 \pm 19	89.18*
Esculine	250	1045 \pm 08	30.42*	604 \pm 09	35.85*
	500	929 \pm 10	43.55*	540 \pm 02	47.38*
	1000	767 \pm 07	61.87*	429 \pm 12	67.38*
E2	250	1019 \pm 12	33.37*	593 \pm 08	37.83*
	500	869 \pm 06	50.33*	491 \pm 10	56.21*
	1000	720 \pm 05	67.19*	399 \pm 06	72.79*
E3	250	977 \pm 09	38.12*	572 \pm 09	41.63*
	500	826 \pm 05	54.86*	457 \pm 06	62.34*
	1000	691 \pm 06	70.47*	375 \pm 12	77.11*
E4	250	939 \pm 04	42.42*	534 \pm 03	48.46*
	500	786 \pm 02	59.72*	439 \pm 05	65.58*
	1000	639 \pm 08	76.35*	352 \pm 07	81.26*
E5	250	910 \pm 08	45.70*	521 \pm 05	50.81*
	500	734 \pm 02	65.61*	417 \pm 06	69.54*
	1000	613 \pm 05	79.29*	343 \pm 02	82.88*
Révertants spontanés		430 \pm 15	-	248 \pm 12	-
2-AA		1314 \pm 21	-	803 \pm 22	-

2-AA : 2-aminoanthracène, *S. typhimurium* TA104/+S9, 2-AA (10 μ g/essai); *S.typhimurium* TA102/+S9, MMS (5 μ g/essai). *p < 0,05 qui implique un pourcentage significatif d'inhibition de la génotoxicité induite par le 2-AA.

Divers flavonoïdes ont présenté des activités antimutagènes similaires à ceux révélés par la rutine et ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5). Duthie et al. (Duthie et al., 1997) ont

rapporté un intéressant effet antimutagène de certains flavonoïdes à l'aide du test d'Ames en présence de *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100. La relation structure-activité antimutagène des flavonoïdes a été bien étudiée par divers auteurs (Hatch et al., 2000). En effet, Hatch et al. (Hatch et al., 2000), ont décrit l'importance d'un substituant 4-keto niveau du cycle C et qui est nécessaire dans la manifestation d'une activité antimutagène des flavonoïdes vis-à-vis d'amines hétérocycliques (tel que le 2-aminoanthracène) (Edenharder et al., 1998 ; Hatch et al., 2000). Ces mêmes auteurs ont rapporté que la planéité du cycle C est également importante pour l'activité antimutagène des flavonoïdes. Effectivement, la double liaison C2-C3 augmente la conjugaison π de la liaison entre le cycle B et le cycle C, ce qui favorise la planéité des deux cycles. Une telle structure presque plane des flavonoïdes augmente leurs capacités antimutagènes (Hatch et al., 2000). Edenharder et al. (Edenharder et al., 1997) ont étudié l'effet antimutagène de 56 flavonoïdes vis-à-vis de la mutagénicité induite par le 2-nitrofluorene, le 2-nitrofluoranthène et le 1-nitropyrene en présence de *Salmonella typhimurium* TA98. Ces études confirment la relation structures-activité antimutagène avancée par Hatch et al. (Hatch et al., 2000). L'important pouvoir inhibiteur de la mutagénicité induite par le MMS et le 2-AA, en présence des fractions d'oligorutine (R2, R3 et R5) comparé à la rutine implique que le substituant 4-keto et/ou la double liaison C2-C3 qui sont identifiés comme étant responsable de l'activité antimutagène des flavonoïdes, n'ont pas été affecté au cours de la polymérisation de la rutine.

Une étude menée par Edenharder et Tang (Edenharder et Tang, 1998), se focalisant sur l'origine du pouvoir antimutagène de 32 coumarines vis-à-vis de différents mutagènes a pu démontrer que les groupements hydroxyles en position 3, 4 et 7 au niveau de la structure générale d'une coumarine sont importants pour l'expression de pouvoir antimutagène de ces molécules. On en déduit que l'unique groupement hydroxyle en position 7 de l'esculine, n'a pas été affecté au cours de la polymérisation de cette molécule, dans la mesure où les fractions d'oligoesculine inhibent très efficacement la mutagénicité induite par le MMS et le 2-AA.

Un effet antimutagène ou antigénotoxique est complexe et peut être réalisé à travers plusieurs mécanismes (Kada, 1993) :

L'inhibition du système mono-oxygénase P450 est un des mécanismes largement décrit comme étant à l'origine de l'effet antigénotoxique de certains métabolites secondaires des plantes (Zani et al., 1993). Ceci peut être extrapolé aux flavonoïdes et coumarines, faisant l'objet de cette étude. L'activité antigénotoxique des molécules testées, pourrait être expliquée également par :

- Un effet antagoniste : Dans ce cas, la molécule serait capable de provoquer des altérations au niveau de l'ADN qui corrigeraient l'effet provoqué par l'agent mutagène. Cela serait vrai si le composé testé agissait directement au niveau de l'ADN.

- Les molécules pourraient former un complexe avec l'agent mutagène, de telle façon que cet agent devienne inoffensif.

- Une autre possibilité peut être envisagée : c'est l'aptitude des molécules à entrer en compétition pour les sites de pénétration de l'agent mutagène au niveau de la membrane cellulaire, s'empêchant ainsi mutuellement de pénétrer dans la bactérie.

- La capacité des molécules à capter des radicaux libres, pourrait s'appliquer aux radicaux issus de la métabolisation du 2-aminoanthracène avant leur fixation sur l'ADN. Cette macromolécule serait alors protégée des effets génotoxiques des métabolites génotoxiques. Par conséquent, l'activité antimutagène serait la conséquence d'une activité antiradicalaire.

Etant donné que nous avons étudié les activités mutagène et antimutagène des fractions d'oligorutine (R2, R3 et R5) et d'oligoesculine (E2, E3, E4 et E5) en utilisant un système procaryote, nous avons donc jugé nécessaire de tester ces mêmes fractions sur un deuxième système en l'occurrence le système eucaryote (Cellules leucémiques humaines : K562) qui représente les organismes supérieurs et ce à l'aide du test des comètes qui permet d'évaluer l'effet des fractions d'oligomères sur l'ADN nucléaire des cellules traitées.

Avant d'évaluer les activités génotoxique ou antigénotoxique sur le système eucaryote, une étude

de la cytotoxicité des fractions d'oligomères d'esculine et de rutine sur ces mêmes cellules est nécessaire.

II. Etude de l'activité cytotoxique des fractions d'oligomères de rutine et d'esculine

Nous avons examiné l'effet de différentes concentrations de chacune de ces fractions sur la prolifération des cellules leucémiques *in vitro*, à l'aide du test MTT.

La figure 44 montre que seule la rutine induit une cytotoxicité dépassant les 50% d'inhibition de la prolifération cellulaire des cellules leucémiques K562. La CI_{50} de ce monomère est de 400 $\mu\text{g/ml}$.

Les fractions d'oligomères R2, R3 et R5 montrent une cytotoxicité beaucoup plus faible comparé à la rutine, elle ne dépasse pas les 30% à la plus forte dose testée (800 $\mu\text{g/ml}$).

D'ailleurs, la cytotoxicité de la rutine à forte dose a été mis en évidence par plusieurs auteurs (Romero et al., 2002 ; Lee et al., 2004 ; Plochmann et al., 2007 ; Marcarini et al., 2011), vis-à-vis de plusieurs lignés cellulaire (HTC, NCI-H889, LLCaP...). En effet, Polchmann et al. (Polchmann et al. 2007) ont déterminé les structures responsables de l'effet cytotoxique des flavonoïdes. Ces auteurs ont rapporté que la présence d'une double liaison C2-C3 au niveau de la structure d'un flavonoïde augmente son pouvoir cytotoxique. Donc la diminution de la cytotoxicité des fractions d'oligorutine comparée au monomère, implique que la double liaison C2-C3 aurait été affectée au cours de la réaction de polymérisation.

Comme le montre la figure 45, l'esculine et ses fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et E5) ne présentent pas de cytotoxicité significative à toutes les concentrations testées.

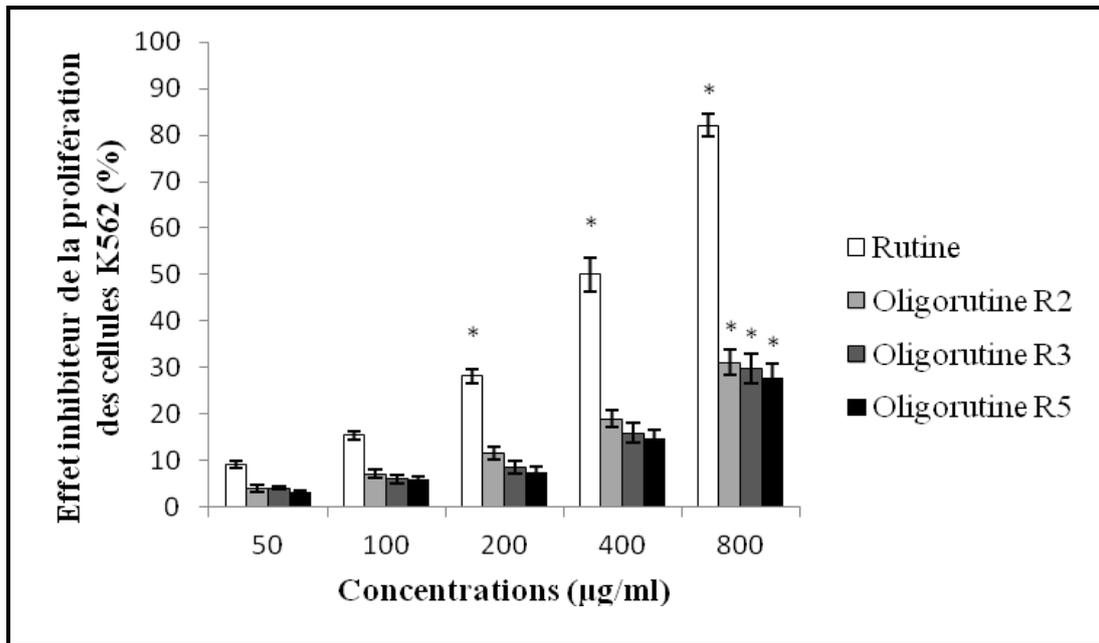


Figure 44. Effet de différentes concentrations de la rutine et ses fractions d'oligomère (R2, R3 et R4) sur la prolifération des cellules leucémiques humaines K562. * $p < 0,05$: pourcentage significative d'inhibition de la prolifération des cellules K562.

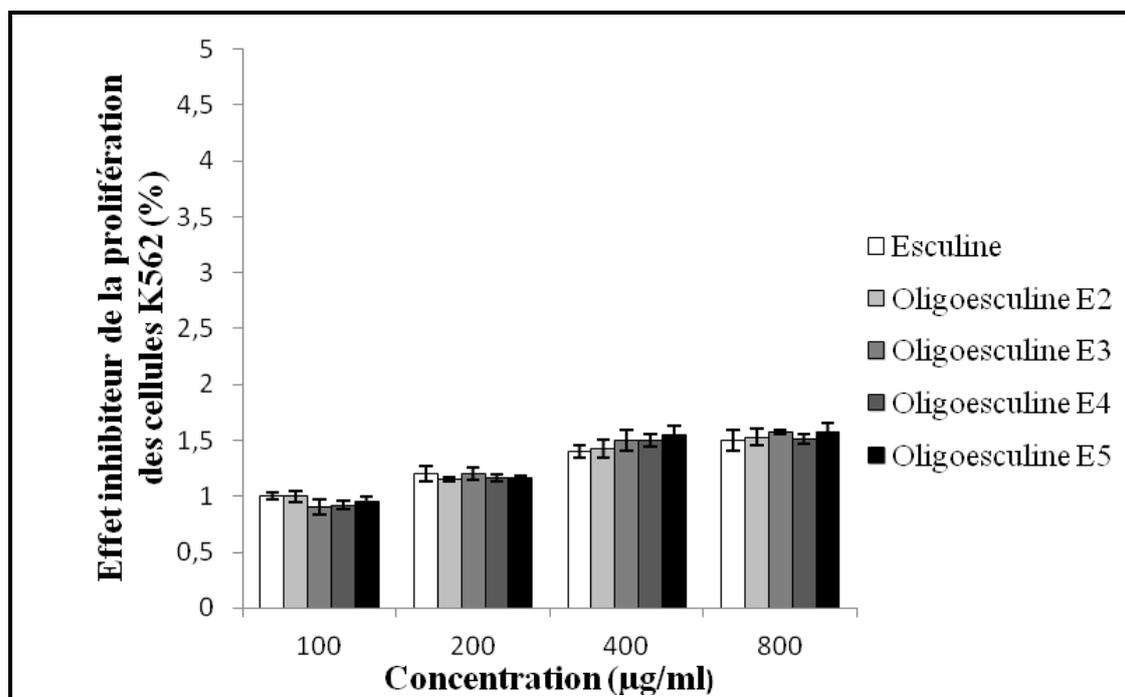


Figure 45. Effet de différentes concentrations de l'esculine et de ses fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et E5) sur la prolifération des cellules leucémiques humaines K562. * $p < 0,05$: pourcentage significative d'inhibition de la prolifération des cellules K562.

III. Etude des activités génotoxique et antigénotoxique de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur un système eucaryote à l'aide du test des comètes

III.1. Etude de l'activité génotoxique

Le test des comètes est un test d'électrophorèse en gel d'agarose de cellules isolées. Après électrophorèse, les noyaux de cellules dont l'ADN a subi des cassures prennent une forme de comète et les noyaux dont l'ADN n'est pas endommagé restent compactes (ronds). Le test des comètes permet de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique, indirectement lors des processus enzymatiques de réparation des dommages et enfin lors des processus secondaires de fragmentation de l'ADN tel que l'apoptose.

Après avoir été traitées pendant 24h, par la rutine, l'esculine ou leurs fractions d'oligomères, les cellules leucémiques K562 sont lysées et soumises à une électrophorèse. En raison de sa charge négative, l'ADN migre vers l'anode lorsqu'il est placé dans un champ électrique, puis détecté à l'aide d'un marqueur fluorescent spécifique (bromure d'ethidium). Deux propriétés sont importantes pour évaluer la migration de l'ADN. D'une part, la capacité de l'ADN à migrer, migration qui se fait en fonction de la taille et donc du nombre de coupures. La longueur de la queue de la comète, augmente avec l'importance des dommages à l'ADN. La lecture a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence. Nous avons pu quantifier la génotoxicité des molécules testées en évaluant le taux d'ADN endommagé, des cellules traitées par des concentrations de 400, 200 et 100 µg/ml de chacun flavonoïdes (rutine et ses fractions d'oligomères) et par des concentrations de 800, 400 et 200 µg/ml de chacun des coumarines (esculine et ses fractions d'oligomères), et en les comparant à celui obtenu avec les cellules non traitées par les molécules.

Les résultats obtenus à l'aide du test des comètes, révèlent que le taux d'ADN endommagé (TDD) des cellules K562 traitées par les différents monomères et fractions d'oligomères obtenus n'augmente pas significativement par rapport aux cellules non traitées (Témoin négatif). En effet, le TDD du témoin négatif est de 108 ± 6 , alors que le TDD le plus élevé (111) a été obtenu

en présence de la fraction d'oligoesculine E5 à la plus forte concentration testée (800 µg/ml) (Tableau 5). Donc on peut dire que la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères ne sont pas génotoxiques vis-à-vis des cellules K562.

Tableau 5. Evaluation de la génotoxicité induite par différentes concentrations de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur les cellules K562 à l'aide de test de comète

Molécules	Concentration (µg/ml)	TDD
Témoin négatif		108 ± 6
H₂O₂	75 µM	223,5 ± 8*
Rutine	100	108,5 ± 3
	200	107 ± 4
	400	109,5 ± 3
R2	100	107,5 ± 5
	200	106,5 ± 2,5
	400	107 ± 4
R3	100	109 ± 7
	200	109,5 ± 4
	400	110,5 ± 8
R5	100	106 ± 3
	200	108,5 ± 4
	400	109,5 ± 2
Esculine	200	109,6 ± 3
	400	110,1 ± 2
	800	109,8 ± 2
E2	200	108,6 ± 1
	400	109,5 ± 3
	800	110,3 ± 1
E3	200	110 ± 2
	400	110,7 ± 3
	800	109,8 ± 1
E4	200	109,1 ± 3
	400	109,9 ± 2
	800	110,5 ± 1
E5	200	110,5 ± 3
	400	110 ± 1
	800	111 ± 3

Avec *p < 0,05 : pourcentage significatif de génotoxicité induite par le H₂O₂ sur les cellules K562 comparé aux cellules non traitées en utilisant le test *t*-student.

III.2. Etude de l'activité antigénotoxique des molécules testées vis-à-vis d'un génotoxique ; le H₂O₂ à l'aide du test des comètes

Nous avons par ailleurs, envisagé l'étude d'une éventuelle activité antigénotoxique des monomères ainsi que de leurs fractions d'oligomères vis-à-vis d'un agent génotoxique de référence ; le H₂O₂ (75 µM), en présence des cellules leucémiques K562.

Le pourcentage d'inhibition de la génotoxicité induite par le H₂O₂, est estimé selon la formule

$$\% \text{ d'inhibition de la génotoxicité} = \left(1 - \left[\frac{(\text{ST. ext} - \text{ST. tn})}{(\text{ST. tp} - \text{ST. tn})} \right] \right) \times 100$$

suivante :

ST.ext : Score total en présence des molécules à tester.

ST.tn : Score total des cellules témoins non traitées.

ST.tp : Score total des cellules traitées par le H₂O₂ (75 µM).

Ce test révèle que les fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) montrent un plus important pouvoir inhibiteur de la génotoxicité induite par le H₂O₂ comparé à la rutine (Figure 46). Cette capacité antigénotoxique est dose dépendante et augmente en présence d'oligomères d'importante masse moléculaire moyenne. Ainsi, la fraction d'oligorutine R5 s'avère la plus efficace à inhiber la génotoxicité induite par le H₂O₂ avec un pourcentage d'inhibition de 60% à la plus forte concentration testée (400 µg/ml), tandis que ce pourcentage d'inhibition ne dépasse pas 26% en présence du monomère à la même concentration. Une activité antigénotoxique de la rutine a été mise en évidence par Barcelos et al. (Barcelos et al., 2011) vis-à-vis de 3 agents mutagènes (l'aflatoxine, le méthyl méthanesulfonate, et la doxorubicin), à l'aide du test des comètes.

De même, les fractions d'oligomères d'esculine (E2, E3, E4 et E5) montrent une meilleure activité antigénotoxique que le monomère correspondant (Figure 47). Le pouvoir inhibiteur de la génotoxicité induite par le H₂O₂ en présence de l'esculine et ses fractions d'oligomères est elle aussi dose dépendante. Cette activité s'avère d'autant plus importante que la masse moléculaire moyenne de la fraction testée est plus élevée. La fraction d'oligoesculine E5 illustre le meilleur pouvoir inhibiteur de la génotoxicité induite par le H₂O₂ avec un pourcentage d'inhibition de

69% à la plus grande concentration testée (800 µg/ml), alors que le monomère présente 16% d'inhibition à la même concentration.

La meilleure activité antigénotoxique observée en présence des fractions d'oligomères peut être due à un meilleur pouvoir desmutagène (un agent qui agit directement sur le mutagène ou son précurseur afin de les activer) de ces fractions. En effet, des oligomères de rutine obtenus par Kurisawa et al. (Kurisawa et al., 2003a) et des oligoesculines obtenus par Anthoni et al. (Anthoni et al., 2008) montrent un important pouvoir antiradicalaire vis-à-vis de divers radicaux libres comparé à leurs monomères respectifs. Ceci pourrait expliquer le meilleur pouvoir antigénotoxique observé en présence des fractions d'oligomères. Toutefois, cette constatation (le meilleur pouvoir antiradicalaire des oligomères) ne peut pas exclure la possibilité que ces fractions puissent aussi se comporter comme agent bioantimutagène (agent agissant sur les mécanismes de mutagenèse ou sur les mécanismes de régulation et de réparation de l'ADN et aboutissant à une décroissance de la fréquence des mutations), en agissant sur les mécanismes de mutagenèse ou sur les mécanismes de régulation et de réparation de l'ADN, ce qui et aboutit à une décroissance de la génotoxicité.

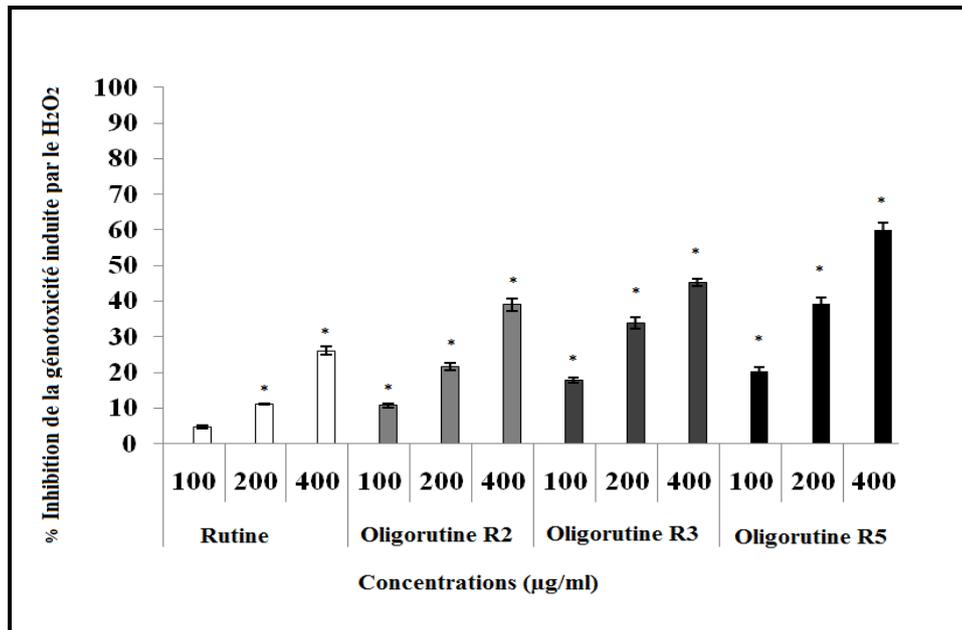


Figure 46. Inhibition de l'activité génotoxique induite par le H₂O₂ (75 μM), par la rutine et ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) vis-à-vis des cellules K562 à l'aide du test des comètes.*p< : un pourcentage significatif d'inhibition de la génotoxicité induite par le H₂O₂ comparé aux cellules non traitées en utilisant le test *t*-student.

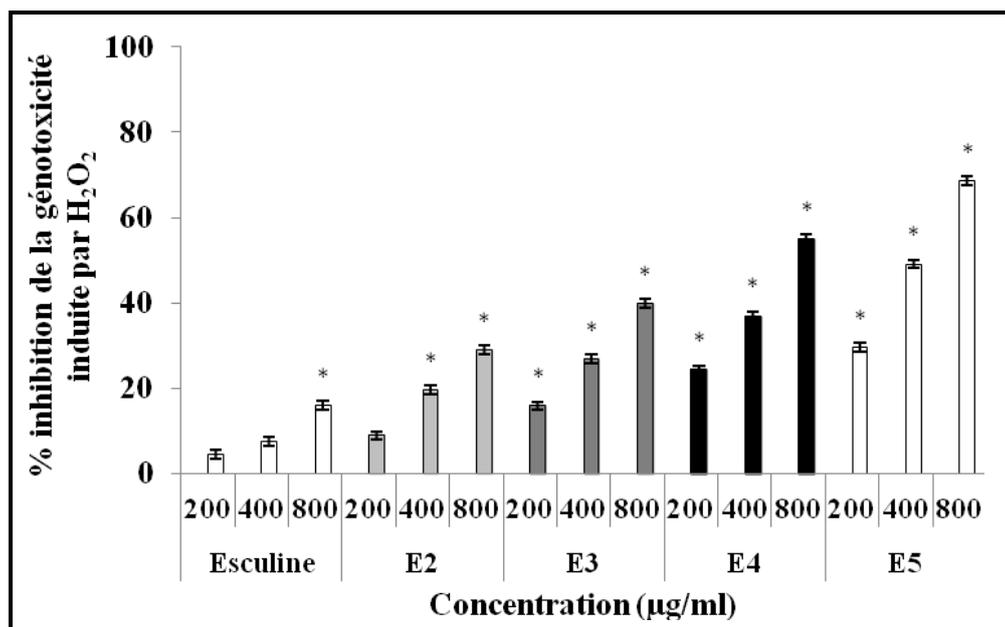


Figure 47. Inhibition de l'activité génotoxique induite par le H₂O₂ (75 μM), par l'esculine et ses fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et E5) vis-à-vis des cellules K562 à l'aide du test des comètes. .*p< : un pourcentage significatif d'inhibition de la génotoxicité induite par le H₂O₂ comparé aux cellules non traitées en utilisant le test *t*-student.

Les résultats obtenus à l'aide du test des comètes confirment ceux obtenus à l'aide du test d'Ames.

Ce chapitre nous a permis de montrer d'une part que l'oligomérisation de la rutine et de l'esculine a amélioré leurs activités antimutagène/ antigénotoxique sans affecter leurs pouvoirs non géntoxiques/ non antigénotoxiques et ceci aussi bien vis-à-vis d'un système procaryote (test d'Ames) ainsi que vis-à-vis d'un système eucaryote (test de comète).

D'autre part, on a pu démontré une diminution de la cytotoxicité de la rutine grâce à l'oligomérisation, tandis que cette activité demeure inchangée suite à l'oligomérisation de l'esculine.

Partie IV- Etude des activités antiradicalaire et antioxydante

Les activités antigénotoxique et antimutagène révélés par les fractions oligomères étudiées, à l'aide du test des comète et le test d'Ames nous ont amené à envisager l'étude de leurs potentiels antiradicalaire et antioxydant. En effet, des lésions induites par les radicaux libres dans le matériel génétique (bases modifiées, cassures simple et double brin de la chaîne oligonucléotidique...) semblent être impliquées dans de nombreux processus délétères (mort cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) ainsi que le vieillissement cellulaire. En effet, les réactions de dérivés de radicaux avec l'ADN sont très nombreuses, entre autres l'action du radical OH^\bullet sur la guanine entraînant la formation du 8-hydroxyguanine, l'oxydation de la thymine qui donne la 5 hydroxy-methyluracil et l'oxydation du désoxyribose qui entraîne une coupure des brins d'ADN. Toutes ces modifications ont des conséquences très graves sur la réplication. Ceci nous a amené à penser que l'activité antigénotoxique pourrait être le résultat d'un pouvoir piègeur des radicaux libres formés entre autres lors de la métabolisation du produit génotoxique. En effet, les flavonoïdes et les coumarines présentent la propriété de piéger des radicaux libres, tels que l'anion superoxide, l'oxygène singulet, le radical hydroxyle...(Kancheva et al., 2010; Murat-Bilgin et al., 2011; Puppo, 1992; Pietta 2000) .

I. Evaluation de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH[•] de la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères

A température ambiante, le radical DPPH[•] présente une intense coloration violette qui disparaît au contact d'une substance capable de saturer sa couche électronique. On peut donc détecter la diminution de l'intensité de la coloration par spectrophotométrie. Cette réduction rend compte du pouvoir piègeur des molécules testées. Les résultats sont exprimés en CI_{50} (concentration capable de piéger 50% des radicaux DPPH dans le milieu) et en TEAC (Trolox equivalent antioxidant activity) (Tableau 6).

La rutine et ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) montrent un important pouvoir piègeur du radical DPPH[•] . Les fractions d'oligomères R2, R3 et R5 s'avèrent moins efficace à piéger le

radical DPPH[•] que la rutine, avec une CI₅₀ maximale de $39 \pm 0,2 \mu\text{M}$ en présence de la fraction d'oligomère R2 comparé à une CI₅₀ de $11 \pm 0,1 \mu\text{M}$ en présence de la rutine. Cette activité antiradicalaire est d'autant plus faible que la masse moléculaire moyenne de la fraction d'oligomère est élevée.

Contrairement aux fractions d'oligomères de rutine, les fractions d'oligomère d'esculine (E2, E3, E4 et E5) illustrent un pouvoir antiradicalaire vis-à-vis du radical DPPH[•] significativement plus important que celui de l'esculine. Ces fractions montrent des valeurs de CI₅₀ très rapprochées (entre 17 et 19 μM) et donc la masse moléculaire moyenne de ces fractions d'oligoesculine ne semble pas avoir un effet sur leurs pouvoirs piègeur du radical DPPH[•].

II. Evaluation de l'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical ABTS de la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères

L'activité antiradicalaire a été évaluée vis-à-vis du radical ABTS^{•+}, grâce à la capacité de celui-ci à donner une couleur bleue intense (Figure 48) que l'on peut suivre spectrophotométriquement à 734 nm (Pannala et al., 2001).

L'intensité de cette couleur disparaît progressivement en présence d'un donneur de H[•].

Les résultats sont exprimés en CI₅₀ (concentration capable de piéger 50% des radicaux ABTS dans le milieu) et en TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity).

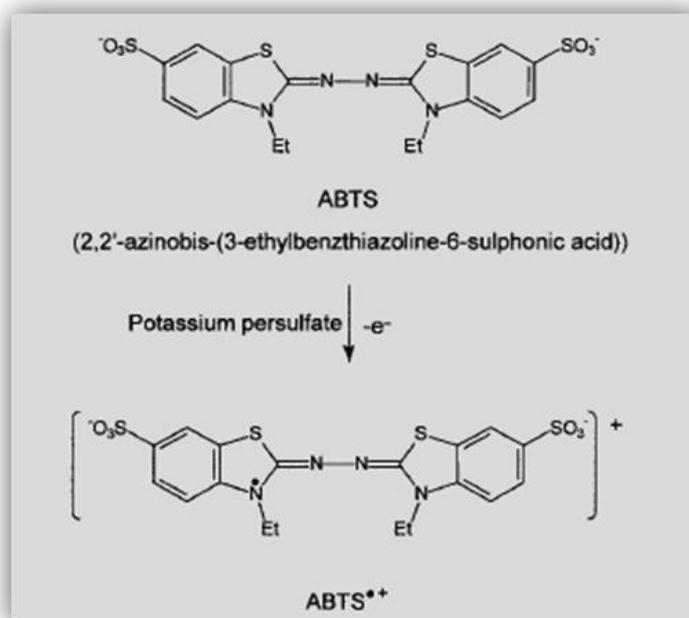


Figure 48. Formation du radical ABTS^{•+}

De même que vis-à-vis du radical DPPH[•], les fractions d'oligomères R2, R3 et R5 présentent des valeurs de CI₅₀ supérieures à celle de la rutine (32 ± 2 μM), ce qui traduit un plus faible pouvoir piègeur du radical ABTS^{•+} comparé au monomère (Tableau 6). Cette activité est d'autant plus faible que la masse moléculaire moyenne de la fraction d'oligomère de rutine est élevée ; ainsi la fraction d'oligorutine R5 présente l'activité antiradicalaire la plus faible avec une CI₅₀ de 276 ± 18 μM.

L'augmentation de l'activité antiradicalaire, observée vis-à-vis du radical DPPH[•], en fonction du degré de polymérisation de l'esculine, a été confirmée vis-à-vis du radical ABTS^{•+}. Ce pouvoir antiradicalaire vis-à-vis de ce radical augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligomères d'esculine. La fraction d'oligoesculine R5, qui possède la masse moléculaire moyenne la plus importante, présente un pouvoir antiradicalaire 15 fois plus important que celui du monomère avec une valeur de CI₅₀ de 150 ± 2 μM comparée à une valeur de CI₅₀ de 10 ± 2 μM en présence de l'esculine. Toutes les fractions oligomères d'esculine testées montrent un

TEAC > 1 ce qui implique qu'elles sont plus efficaces que notre témoin positif (le trolox) à piéger le radical ABTS^{•+}.

III. Etude du pouvoir piègeur du radical hydroxyle et du pouvoir chélateur du fer par la rutine, l'esculine et de leurs fractions d'oligomères

III.1. Etude du pouvoir piègeur direct du radical hydroxyle

La mise en évidence du radical hydroxyle n'est pas facile, car il est très réactif et a une durée de vie très courte. Pour le mettre en évidence, des méthodes indirectes qui détectent les produits de sa réaction, sont utilisées.

Le désoxyribose, réagit avec le radical hydroxyle, donnant lieu à la formation du malondialdéhyde (MDA) qui en présence d'acide thiobarbiturique (TBA) donne un produit chromogène formé par le complexe MDA-TBA à 532 nm. La capture du radical OH[•] par la substance à étudier, se fait par compétition avec le désoxyribose. Ainsi une diminution de la quantité du chromogène formé est illustrée par une diminution de l'absorbance et traduirait un effet capteur du radical OH[•] par les molécules testées (Figure 49). (Paya et al., 1992).

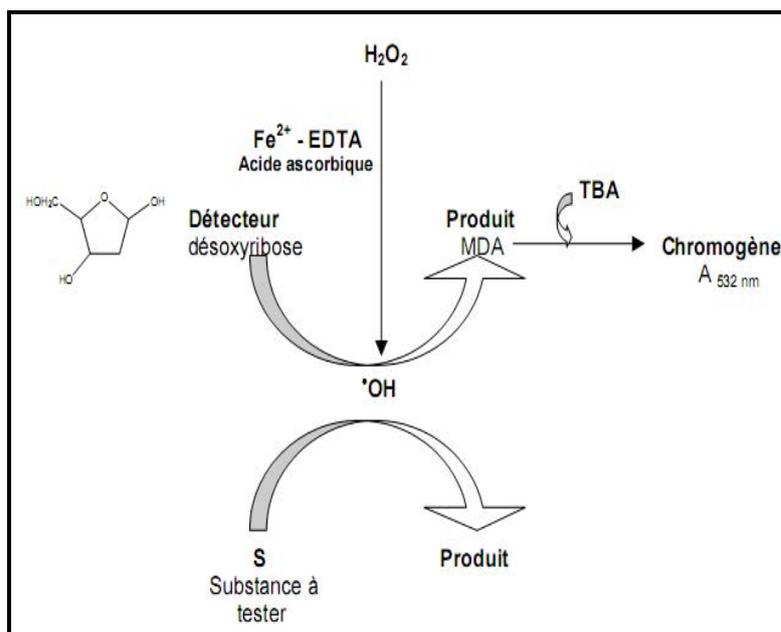


Figure 49. Principe du test au 2-désoxyribose

Les résultats de l'étude du pouvoir piègeur du radical hydroxyle des monomères et de leurs fractions d'oligomère sont exprimés en CI_{50} et en TEAC.

Il apparait que, les fractions d'oligomère de rutine (R2, R3 et R5) sont moins efficaces que le monomère ($CI_{50} = 18,6 \mu M$) à capturer les radicaux OH^\bullet (Tableau 6). Le pouvoir antiradicalaire des oligomères est d'autant plus faible que la masse moléculaire moyenne de la fraction d'oligomères est élevée. La fraction R5 a le pouvoir piègeur de radical hydroxyle et montre par conséquent la plus faible valeur de CI_{50} de $172 \pm 8 \mu M$.

L'activité antiradicalaire de divers flavonoïdes y compris la rutine vis-à-vis de divers radicaux libres a été mis en évidence par plusieurs auteurs (Hanasaki et al., 1994 ; La Casa et al., 2000 ; Cotellet et al., 2001 ; Yang, 2008). La relation structure- activité antiradicalaire des flavonoïdes a été largement établie (Pannala, 2001 ; Seyoum et al., 2006 ; Chen et al., 2012). Ces auteurs ont rapporté que les hydroxyles en position C3' et C4' jouent un rôle très important dans l'expression du pouvoir antiradicalaire et antioxydant des flavonoïdes. Donc une faible activité antiradicalaire vis-à-vis des radicaux DPPH $^\bullet$, ABTS $^{+\bullet}$ et hydroxyle en présence des fractions d'oligomères de rutine étudiées, laisse penser que les hydroxyles en position C3' et/ou C4' ont été affectés au cours de la réaction de polymérisation. Une diminution similaire du pouvoir piègeur du radical DPPH a été observé pour des oligomères de flavonoïdes obtenus par polymérisation enzymatique (Desentis-Mendoza et al., 2006 ; Anthoni et al., 2008).

Contrairement aux fractions d'oligomères de rutine, les fractions d'oligomères d'esculine (E2, E3, E4 et E5) présentent un pouvoir piègeur du radical hydroxyle significativement plus important que celui du monomère correspondant (esculine) (Tableau 6). Cette activité antiradicalaire augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligomères obtenues. Ainsi, la fraction E5, qui possède la masse moléculaire moyenne la plus élevée, est dotée du meilleur pouvoir antiradicalaire vis-à-vis du radical hydroxyle avec une valeur de CI_{50} de $5 \pm 0,5 \mu M$, tandis que l'esculine présente une CI_{50} de $56 \pm 4 \mu M$.

Diverses études se sont focalisées sur le pouvoir antiradicalaire et antioxydant des coumarines et ont pu démontrer que la présence de la partie catéchol et/ou des groupements hydroxyles sont cruciales pour la manifestation ces activités. Le fort pouvoir antiradicalaire de nos fractions d'oligoesculine vis-à-vis des radicaux DPPH[•], ABTS^{•+} et hydroxyle indique que la partie catéchol et/ou les groupements hydroxyles n'ont pas été affectés au cours de la réaction de polymérisation de l'esculine.

III.2. Etude du pouvoir chélateur de fer par la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères

Il s'agit d'évaluer l'effet antioxydant de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères vis-à-vis des radicaux générés par la réaction de Fenten. Pour cela nous avons étudié le pouvoir chélateur de fer des monomères et de leurs fractions d'oligomères à l'aide de test au 2-déxyribose. En effet, Un pouvoir chélateur de fer des molécules testées empêchera la transformation du H₂O₂ en OH[•] et OH⁻; ainsi il y aura moins de radicaux hydroxyles, susceptible de dégrader le déoxyribose en MDA dans le milieus réactionnel. Ceci sera traduit par une diminution de la coloration rose (figure 49) (Paya et al., 1992 ; Valentéo et al., 2002). Les résultats sont exprimés en CI₅₀ et en TEAC.



Il apparait d'après les résultats (Tableau 6) obtenus que les fractions de rutine sont plus efficaces chélateurs de fer que le monomère correspondant (CI₅₀= 58,3 ± 5 μM).

Ce pouvoir chélateur de fer est d'autant plus important que la masse moléculaire moyenne de la fraction d'oligomère est élevée. La fraction d'oligomère R5 s'avère la plus efficace à chélater le fer avec une CI₅₀ de 27,5 ± 4 μM.

Les hydroxyles en position 5, 3', 4' et le groupement carbonyl en position 4 ont été identifiés par plusieurs auteurs (Puppo, 1992 ; Fernandez et al., 2002 ; Macakova et al., 2012) comme étant responsable de la chélation du fer par les flavonoïdes ; ainsi le meilleur pouvoir chélateur de fer

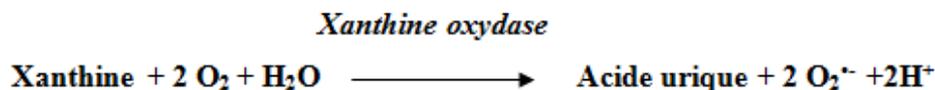
observé en présence des fractions d'oligorutines comparé au monomère implique que les hydroxyles en position 5, 3', 4' et/ou le groupement carbonyle en position 4 n'ont pas été affectés au cours de la réaction de polymérisation de la rutine.

De même que les fractions d'oligomères de rutine, les fractions d'oligomères d'esculine (E2, E3, E4 et E5) présentent un pouvoir chélateur de fer significativement plus important que celui du monomère esculine. Cette activité augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligomères. L'activité chélatrice de fer la plus importante a été notée en présence de la fraction E5 (CI_{50} de $31,5 \pm 5 \mu\text{M}$) comparé à l'esculine (CI_{50} de $168 \pm 9 \mu\text{M}$) (Tableau 6). Mladenka et al. (Mladenka et al., 2010) ont rapporté que pour les coumarines les structures essentielles pour l'expression de leur pouvoir chélateur de fer semble être les mêmes structures recommandées pour l'activité antiradicalaire (Mladenka et al., 2010). Ces constatations ont été supportées par d'autres auteurs (Pedersen et al., 2007 ; Mladenka et al., 2010). Ainsi, l'important pouvoir chélateur obtenu en présence des fractions d'oligomères indique que la partie catéchol et/ou les groupements hydroxyles n'ont pas été affectés au cours de la réaction de polymérisation de l'esculine.

IV. Etude du pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase, de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères

Etant donné que jusqu'à présent les systèmes d'étude que nous avons utilisés, permettent de détecter soit une activité de piégeage directe des radicaux, soit un effet sur la balance oxydo-réductrice chélation de fer, nous avons choisi un troisième système mettant en jeu des enzymes qui génèrent la formation de radicaux libres telle que la xanthine oxydase.

Ce système permettrait de savoir si l'activité antioxydante des monomères et de leurs fractions d'oligomères étudiés est uniquement due à l'effet capteur des radicaux libres ou pourrait être également imputée, probablement, à l'inhibition d'enzyme intervenant dans les réactions de génération des radicaux libres.



La xanthine oxydase est une enzyme qui catalyse l'élimination de la xanthine toxique pour la cellule sous forme d'acide urique, avec formation d'anion superoxyde.

Nous avons recherché l'effet des monomères et de leurs fractions d'oligomère testées, sur le pouvoir de la xanthine oxydase à transformer la xanthine en acide urique et anion superoxyde.

Nous avons donc suivi la production d'acide urique par lecture de la densité optique à 290 nm, longueur d'onde d'absorption de la molécule en question.

Les résultats obtenus nous ont révélé que la rutine et ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) sont capables d'inhiber l'activité enzymatique de la xanthine oxydase (Tableau 6). Il existe donc un meilleur pouvoir inhibiteur de cet enzyme par ces derniers, comparé à la rutine. Ce pouvoir inhibiteur augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligomères, avec une CI_{50} de $64,1 \pm 1,5 \mu\text{M}$ pour la fraction R5.

D'après plusieurs auteurs (Cos et al., 1998 ; Van Hoorn et 2002), l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase par les flavonoïdes est en étroite relation avec la présence des groupements hydroxyyles au niveau des carbones 5 et 7, et une double liaison entre les carbones 2 et 3. Ainsi, l'importante inhibition de la xanthine oxydase en présence des fractions d'oligomères de rutine indique que les groupements cités précédemment n'ont pas été affectés au cours de la polymérisation.

Il apparait également que l'esculine et ses fractions d'oligomères sont capables d'inhiber l'activité de la xanthine oxydase (Tableau 6) de façon plus significative que la rutine et ses oligomères. La fraction d'esculine E5 est dotée d'un pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase 10 fois supérieur à celui de l'esculine, avec une CI_{50} de $186 \pm 6 \mu\text{M}$. D'autres coumarines telles que la 4-méthylcoumarine, 6-hydroxy-4-méthylcoumarine ont été décrites comme étant

d'efficaces inhibiteurs (Chang et Chiang, 1995 ; Yu et al., 1999, Lin et al., 2008). Ces auteurs indiquent que les groupements hydroxyles en position 6 et 7 au niveau de la structure générale d'une coumarine, sont responsables de ce pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase. Or, la structure de l'esculine comporte un sucre en position 6 et un seul groupement hydroxyle en position 7, celui-ci participerait à la capacité inhibitrice de l'esculine. On pense que l'importante capacité inhibitrice de la xanthine oxydase en présence des fractions d'oligomères d'esculine sous entendrait que le groupement hydroxyle en position 7 n'ait pas été impliqué au cours de la polymérisation.

V. Test de la capacité antioxydante évaluée à l'aide du test de réduction du cuivre : test (CUPRAC)

C'est une méthode développée par Apak et al. (Apak et al., 2004). Le principe de ce test se base sur la conversion des hydroxyles phénoliques en quinones à travers la réduction du complexe Cu^{2+} -Nc, produisant ainsi un complexe chromogène de Cu^{+} -Nc qui absorbe à 450 nm.

Les résultats sont exprimés en TEAC et sont résumés dans le tableau 6.

La rutine et ses fractions de d'oligomères (R2, R3 et R5) se sont tous révélés capables de réduire le cuivre. Toutefois, les fractions d'oligomères montrent un pouvoir réducteur de cuivre plus important que celui du monomère rutine. Ce pouvoir chélateur du cuivre augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligomères testées. Le TEAC maximal (527 μM) a été obtenu en présence de la fraction R5, comparé à un TEAC de 315 μM en présence de la rutine. Apak et al. (Apak et al., 2004) ont identifié au niveau de la structure d'un flavonoïde les groupements responsables de la chélation du cuivre. Ces structures sont les groupements hydroxyles en position 3', 4' et 5 ainsi que le groupement carbonyle en position 4 et la double liaison C2-C3. Donc, l'important pouvoir réducteur de cuivre des fractions d'oligomères peut être due au fait que les groupements identifiés comme essentiels pour la réduction du cuivre n'ont pas été affectés au cours de la réaction de polymérisation.

De même, les fractions d'oligomères d'esculine s'avèrent plus efficaces que le monomère esculine à réduire le cuivre. Ce pouvoir réducteur de cuivre augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligomères étudiées. La fraction E5 étant 10 fois plus active que l'esculine avec un TEAC maximal de 498 μM comparé à un TEAC de 49 μM en présence du monomère. Les groupements hydroxyles en position 6 et 7 au niveau de la structure générale d'une coumarine ont été identifiés comme responsables du pouvoir chélateur de ces molécules (Apak et al., 2007). Or, la structure de l'esculine comporte un sucre en position 6 et un seul groupement hydroxyle en position 7. Celui-ci participerait donc au pouvoir chélateur de cuivre observé. La significative capacité chélatrice du cuivre en présence des fractions d'oligoesculine testées, indique que le groupement hydroxyle en position 7 n'a pas été impliqué au cours de la polymérisation.

En conclusion de ce chapitre, on a pu démontrer que l'oligomérisation de la rutine a diminué sa capacité à piéger directement les radicaux testés, à savoir l'ABTS⁺, le DPPH[•] et le radical hydroxyle, contrairement à l'esculine dont ce pouvoir a considérablement augmenté suite à son oligomérisation.

Nous avons pu également mettre en évidence une amélioration du pouvoir chélateur de fer, du pouvoir antioxydant par réduction de cuivre (CUPRAC) et du pouvoir inhibiteur de xanthine oxydase de la rutine et de l'esculine grâce à leur oligomérisation.

L'importante activité antiradicalaire pourrait en partie expliquer leurs considérables pouvoirs antimutagènes et antigénotoxiques des fractions d'oligoesculines.

La question qui se pose à ce stade, est la suivante ; est ce que les fractions d'oligomères agiraient uniquement en empêchant les molécules génotoxiques d'endommager les macromolécules cellulaires ou bien interviendraient également par d'autres mécanismes tels que la stimulation ou la suppression de phénomène inflammatoire induit par des agents génotoxiques. Ainsi on a envisagé l'étude de l'activité immunomodulatrice, qui fera l'objet du chapitre suivant.

Tableau 6. Activités antiradicalaires, inhibitrice de la xanthine oxidase , chélatrice de fer et CUPRAC de la rutine, l'esculine et leurs oligomères

	ABTS		DPPH		Radical hydroxyle		inhibition de la XO		Chélation de fer		CUPRAC
	IC ₅₀ ^b (μM)	TEAC (μM)	IC ₅₀ (μM)	TEAC (10 ⁻¹ μM)	TEAC (μM)						
R	32±2	3.9±0.2	11±0.1	1.2±0.3	18.6±1.6	2.1±0.1	962±16	0.5±0.1	58.3±5	1±0.1	315±18
R2	54±1	2.3±0.2	39±0.2	0.9±0.2	47.7±4	0.8±0.1	419±14	1.2±0.2	44.7±6	1.3±0.1	411±27
R3	97±8	1.3±0.4	70±0.9	0.7±0.2	89.6±5.5	0.4±0.2	129.7±7	3.8±0.6	35.3±1	1.7±0.2	483±13
R5	276±18	0.5±0.1	110±0.2	0.6±0.1	172±8	0.2±0.1	64.1±1.5	8.3±0.4	27.5±4	2.1±0.1	527±29
E	150±2	0.8±0.1	72±9	0.2±0.1	56±4	0.7±0.1	1954±33	0.2±0.1	168±9	0.2±0.1	49±1.5
E2	90±9	1.4±0.2	19±4	0.7±0.2	16±3	2.4±0.5	601±21	0.8±0.3	121±5	0.5±0.2	89±4
E3	50±1	2.5±0.3	19±3	0.7±0.1	13±2	3.1±0.7	260±9	1.9±0.5	65±9	0.9±0.1	228±10
E4	21±3	6.0±0.8	17±2	0.8±0.3	9±0.8	4.4±0.5	224±14	2.2±0.4	40±12	1.5±0.5	338±4
E5	10±2	12.6±0.4	17±3	0.8±0.2	5±0.5	8.1±0.9	186±6	2.6±0.6	31.5±5	1.85±0.5	498±34

Partie V. Activité immunomodulatrice

I. Etude de l'effet de la rutine, l'esculine et leurs fractions d'oligomères sur la prolifération des splénocytes

Les splénocytes sont des cellules primaires de la rate. Ces cellules sont de bons indicateurs du déroulement de l'activité immunitaire. L'étude de l'effet proliférateur des molécules à tester a été réalisée à l'aide du test au MTT, d'abord en absence de mitogènes, et ensuite pour mieux comprendre l'effet de nos monomères et leurs fractions d'oligomères sur les deux populations majeurs présentes dans la rate à savoir les lymphocytes T (L_T) et les lymphocytes B (L_B), on a ajouté aux molécules à tester deux types de mitogènes : La lectine et les lipopolysaccharides (LPS). Les lipopolysaccharides stimulent principalement les lymphocytes B alors que la lectine stimule les lymphocytes T. L'étude de la prolifération des splénocytes permettra alors de déterminer sur quel type de cellules (L_T ou L_B) nos monomères et leurs fractions d'oligomères agissent pour stimuler le système immunitaire.

I.1. Etude de l'effet de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur la prolifération des splénocytes en absence de mitogènes

L'effet de la rutine et de ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) sur la prolifération des splénocytes a été réalisé à l'aide du test MTT. Le MTT est un sel de tétrazolium de couleur jaune. Les cellules vivantes sont capables de convertir le MTT en formazan de couleur bleu foncé qui est facilement détectable à 540 nm.

Les splénocytes ont été traités par des concentrations de 25, 50, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de rutine ou de ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5).

Comme le montre la figure 50A la rutine et ses fractions d'oligomères montrent un effet stimulateur de la prolifération des splénocytes significatif à partir de la concentration 50 $\mu\text{g/ml}$. Cet effet stimulateur est de type dose dépendant. Le meilleur effet stimulateur de la prolifération des splénocytes est obtenu à la plus forte concentration testée (200 $\mu\text{g/ml}$) de rutine et de ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5). Les fractions d'oligomères de rutine

testées présentent des pourcentages de stimulation de la prolifération des splénocytes plus importantes que celui du monomère. Le meilleur pouvoir stimulateur de la prolifération des splénocytes a été obtenu en présence de la fraction R5 avec un pourcentage de stimulation de ces cellules de 35,2% à 200 µg/ml tandis que ce pourcentage ne dépasse pas 16,8% à la même concentration de rutine.

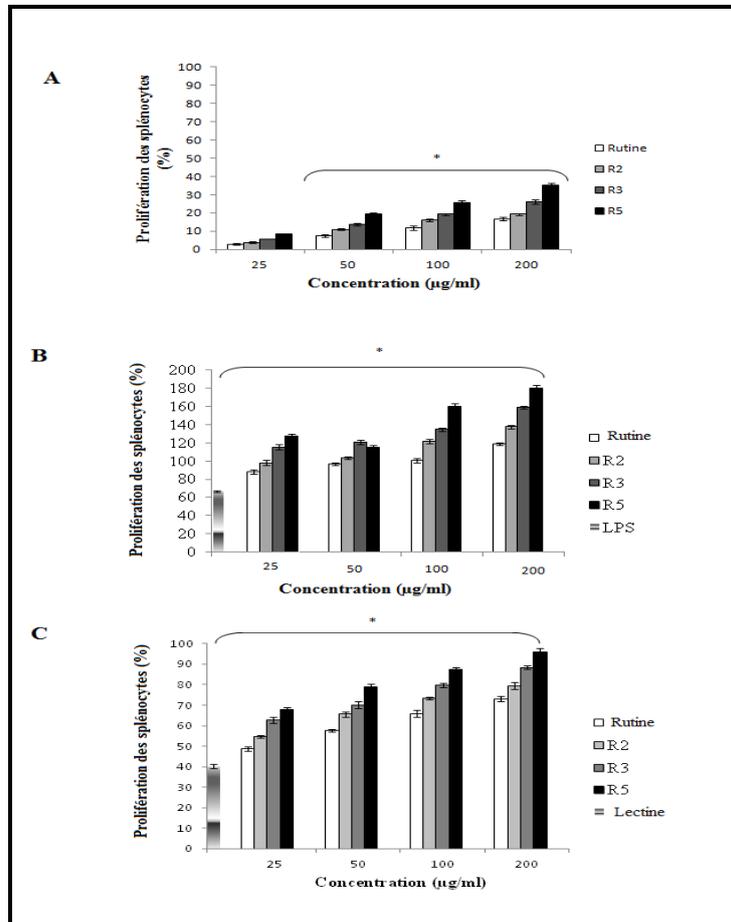


Figure 50. Effet de la rutine et de ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) sur la prolifération des splénocytes: (A) Les splénocytes sont incubés seulement avec les molécules à tester, en absence de mitogène pendant 24h. (B) Les splénocytes sont incubés avec les lipopolysaccharides (5 µg LPS/ml) en présence et en absence des molécules à tester pendant 24h. (C) Les splénocytes sont incubés en présence de la Lectine (5 µg/ml) en présence et en absence des molécules à tester pendant 24h. * $p < 0,05$: pourcentage significative de prolifération des splénocytes comparé aux cellules non traités en utilisant le t student test.

Les résultats de l'effet de l'esculine et de ses fractions d'oligomères (de 100 à 800 µg/ml) sur la prolifération des splénocytes en absence des mitogènes sont illustrés par la figure 51A. Cette figure montre un pouvoir stimulateur des splénocytes aussi bien en présence de l'esculine que de ses fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et E5) de type dose dépendant. Toutefois, les fractions d'oligomères testées présentent un meilleur pouvoir stimulateur de la prolifération des splénocytes, comparé au monomère. Ce pouvoir augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligomères d'esculine.

I.2. Etude de la prolifération des splénocytes en présence du mitogène lipopolysaccharidique (LPS)

Les lymphocytes, jouent un rôle très important dans la réponse immunitaire humorale ou cellulaire, puisque la capacité d'induire une réponse effective des lymphocytes T et B est totalement dépendante de la capacité de prolifération de ces cellules. Les effets de la rutine et de ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) à des concentrations de 25 à 200 µg/ml sur la prolifération des splénocytes en présence du mitogène les lipopolysaccharides (LPS), sont résumés dans la figure 50B. Ce mutagène est connu pour sa capacité à stimuler préférentiellement la prolifération des lymphocytes B.

La rutine et ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) associées au LPS, induisent la prolifération des splénocytes de façon plus importante qu'en présence du LPS seul (66,5%) (Figure 50B). Ainsi, on peut dire que la rutine et ses fractions d'oligomères testées sont capables de stimuler les lymphocytes B. Ils agiraient donc par voie humorale en stimulant les lymphocytes B qui se transformeraient en plasmocytes capables de fabriquer des anticorps. Les fractions d'oligomères de rutine testées semblent être plus efficaces à stimuler les lymphocytes B. Ce pouvoir proliférateur des lymphocytes B augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligomères. Une stimulation maximale de la prolifération des splénocytes additionnés au LPS est notée en présence de la fraction R5 à la

plus forte dose (200 µg/ml) avec un pourcentage de stimulation des splénocytes de 180,3% comparé à 119,2% en présence de la rutine à la même concentration.

L'esculine et ses fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et E5) associés aux LPS, présentent des pourcentages de prolifération plus élevée que celui obtenus en présence des LPS uniquement (66,5%) (Figure 51B). Ceci signifie que l'esculine et ses fractions d'oligomères sont capables également de stimuler les lymphocytes B en agissant donc sur le système immunitaire par voie humorale. Cet effet est dose-dépendant, le meilleur pouvoir proliférateur en cotraitement avec les LPS étant obtenu avec la fraction E5 à la plus forte concentration testée (800 µg/ml ; 189,4%) comparé à 121,2% en présence de l'esculine à la même concentration.

I.3. Etude de la prolifération des splénocytes en présence la lectine

La lectine est un mutagène capable de stimuler préférentiellement des lymphocytes T.

La rutine et ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) amplifient la prolifération des splénocytes, induite en présence de la lectine uniquement (38,2 %). Ceci nous amène à conclure que la rutine et ses fractions d'oligomères sont capables de stimuler les lymphocytes T, et qu'ils peuvent par conséquent agir au niveau du système immunitaire par voie cellulaire. En effet, une fois stimulés, les lymphocytes T agissent en stimulant la sécrétion des substances de nature protéique : les cytokines capables d'exercer leurs propriétés cytotoxiques.

Il apparait d'après nos résultats (Figure 50C) que les fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) stimulent les lymphocytes T mieux que le monomère correspondant ; la rutine. Cette stimulation est dose dépendante, la fraction R5 étant la plus efficace avec un pourcentage de 95,8 à 200 µg/ml.

Nous avons également étudié l'effet de l'esculine et de ses fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et E5) sur la prolifération des splénocytes en présence de la lectine (5µg/ml). Les résultats illustrés par la figure 51C montrent que le monomère et ses fractions d'oligomères induisent

de façon plus efficace la prolifération des splénocytes lorsqu'ils sont associés à la lectine seul. Ceci indiquerait que l'esculine et ses fractions d'oligomères sont également capables de stimuler les lymphocytes T, et par conséquent agirait au niveau du système immunitaire par voie cellulaire. Le pouvoir stimulateur des splénocytes en présence de l'esculine et de ses fractions d'oligomères est de type dose dépendant. Les fractions d'oligomères présentent des meilleurs pouvoirs stimulateurs de la prolifération des splénocytes en présence de la lectine que le monomère esculine. La fraction E5 a le pouvoir stimulateur le plus important (124,8%) à la plus forte concentration testée (800 µg/ml), comparée à celui obtenu avec l'esculine (77,1%) à la même concentration.

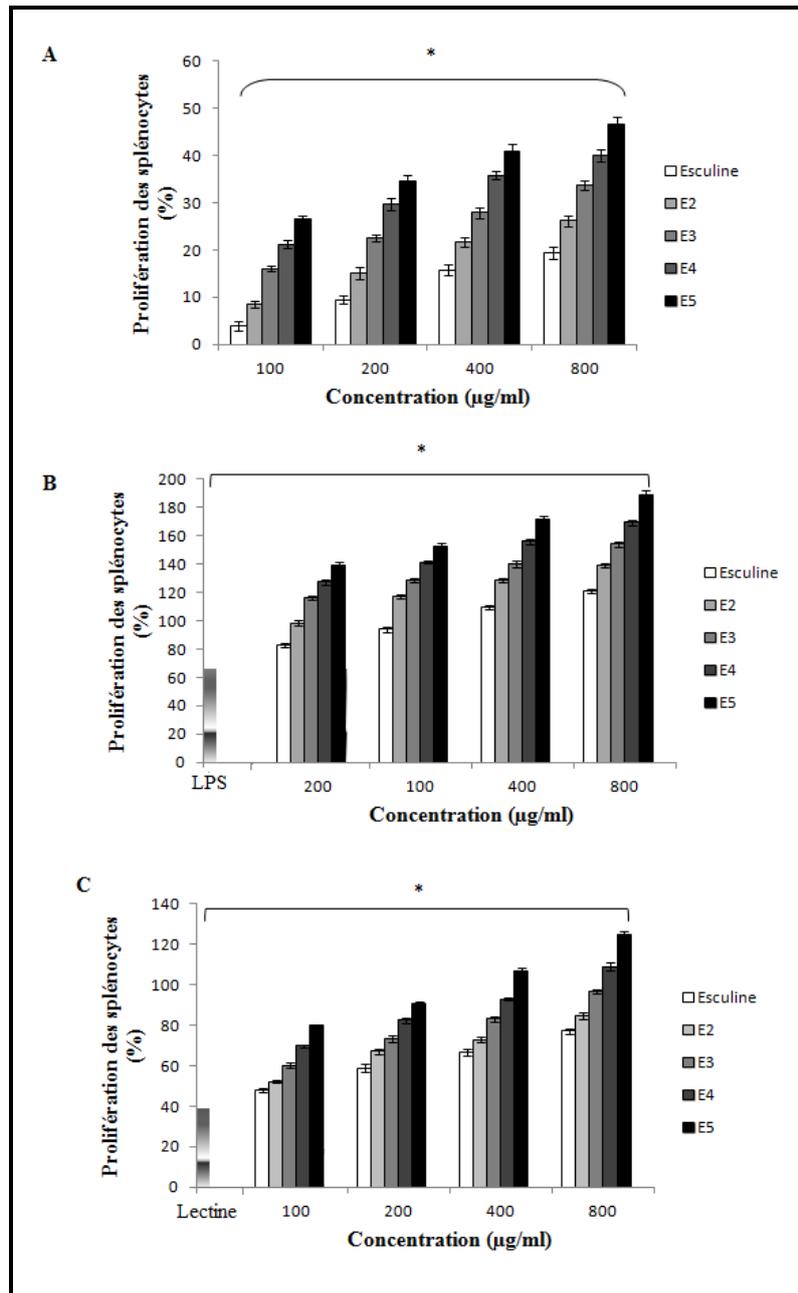


Figure 51. Effet de l'esculine et de ses fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et R5) sur la prolifération des splénocytes: (A) Les splénocytes sont incubés avec les molécules à tester, en absence de mitogène, pendant 24h. (B) Les splénocytes sont incubés avec les lipopolysaccharides (5 µg LPS/ml) en présence et en absence des molécules à tester pendant 24h. (C) Les splénocytes sont incubés avec la Lectine (5 µg/ml) en présence et en absence des molécules à tester pendant 24h.* $p < 0,05$: pourcentage significative de prolifération des splénocytes comparé aux cellules non traités en utilisant le t student test.

II. Etude de l'effet de la rutine, de l'esculine et de leurs fractions d'oligomère sur l'induction des macrophages

Les macrophages sont des cellules provenant des monocytes et sont primordiales dans la réaction anti-inflammatoire. L'effet des monomères étudiés et de leurs fractions d'oligomères sur l'induction des macrophages est suivi en évaluant leurs effets sur l'activité lysosomale et la production du monoxyde d'azote (NO) par ces macrophages. En fait le monoxyde d'azote est produit par les macrophages lors d'une réaction inflammatoire. C'est un messenger de l'action inflammatoire qui agit selon le mode de transmission paracrine, c'est-à-dire à proximité de son site de production conduisant à des réactions variés au cours de l'inflammation. C'est un puissant vasodilatateur (relaxation des cellules musculaires lisses des vaisseaux), il diminue l'agrégation plaquettaire, régule le recrutement leucocytaire, participe à une action anti microbienne (les radicaux libres de NO sont cytotoxiques).

II.1. Effet sur la production de monoxyde d'azote (NO)

D'après la figure 52, l'incubation de macrophages en présence de la rutine ou de ses fractions d'oligomères inhibe significativement la production des NO induit par Le LPS. Ceci étant vrai pour toutes les concentrations testées, et traduit le pouvoir antiinflammatoire de la rutine et de ses fractions d'oligomères. Cette activité antiinflammatoire est dose dépendante, dans la mesure où la diminution du taux de NO est d'autant plus importante que la concentration du monomère ou des fractions d'oligomères correspondants, sont élevées. Néanmoins les oligomères de rutine sont plus efficaces que la rutine. Le pouvoir antinflammatoire le plus significatif, est obtenu en présence de la fraction R5, avec un pourcentage de production de NO de 19,7% à une concentration de 200 µg/ml tandis que le pourcentage de production de NO en présence de la rutine est de 49,6% à la même concentration.

L'effet de divers flavonoïdes y compris la rutine sur la production de NO a été étudié par certains auteurs (Selloum et al., 2003 ; Comalada et al., 2006 ; Lee et al., 2012). En effet, Lee et al. (Lee et al., 2012) ont démontré l'effet réducteur de la rutine sur la production de NO.

Ces auteurs ont associé l'inhibition de la production de NO par la rutine à une inhibition de la voie de NF- κ B, qui est une protéine impliquée dans la réponse immunitaire. Une fois activée, elle active à son tour les cellules phagocytaires. Donc l'importante diminution du taux de NO en présence des fractions d'oligomère d'esculine étudiées pourrait être expliquée par une importante inhibition de la voie de cette protéine.

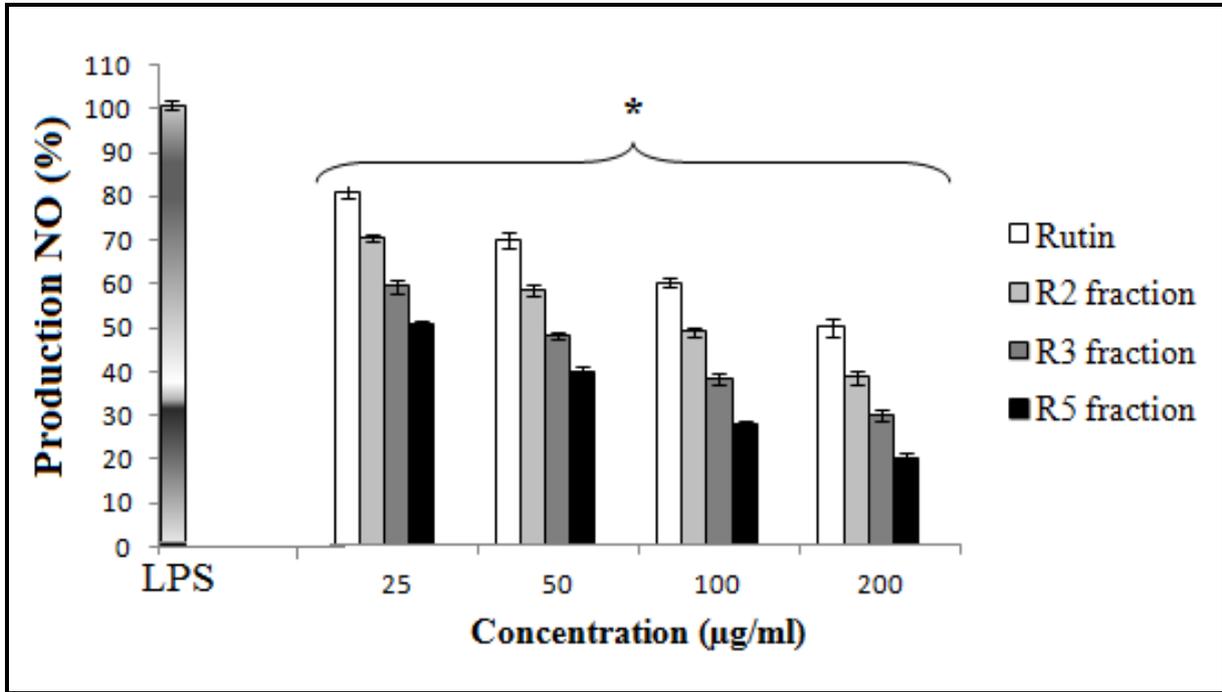


Figure 52. Production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages traités par la rutine et ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) additionné à 2 µg/ml de LPS par rapport au témoin positif tout seul (LPS à 2µg/ml). * $p < 0,05$: pourcentage significatif de production de NO comparé aux cellules traités avec les LPS seulement en utilisant le *t* student test.

L'incubation des macrophages en présence de l'esculine et de ses fractions d'oligomères inhibe significativement la production de NO induit par Le LPS, traduisant un pouvoir antiinflammatoire. Cette activité antiinflammatoire est dose dépendante. Le taux de réduction de la production de NO le plus important est obtenu avec la fraction E5, avec un pourcentage de production de NO de 33,6%, à une concentration de 100 µg/ml, comparé à un pourcentage de 70,6% en présence de l'esculine à la même concentration (figure 53).

Les effets de quinze coumarines extraites des fleurs de *Mammea siamensis* sur la production de NO induit par le LPS au niveau des cellules RAW264.7 ont été rapportés par Morikawa et al. (Morikawa et al., 2012). Cette étude a mis en évidence un intéressant pouvoir antiinflammatoire des coumarines testées par inhibition de la production de NO. Ces auteurs ont démontré que cette réduction était attribuée à une inhibition de l'oxyde nitrique synthase (NOS) qui est l'enzyme responsable de la synthèse de NO. Une forte inhibition de cette enzyme par les fractions d'oligoesculine pourrait être à l'origine de l'important pouvoir inhibiteur de la production de NO, comparé au monomère. Cette hypothèse reste à confirmer.

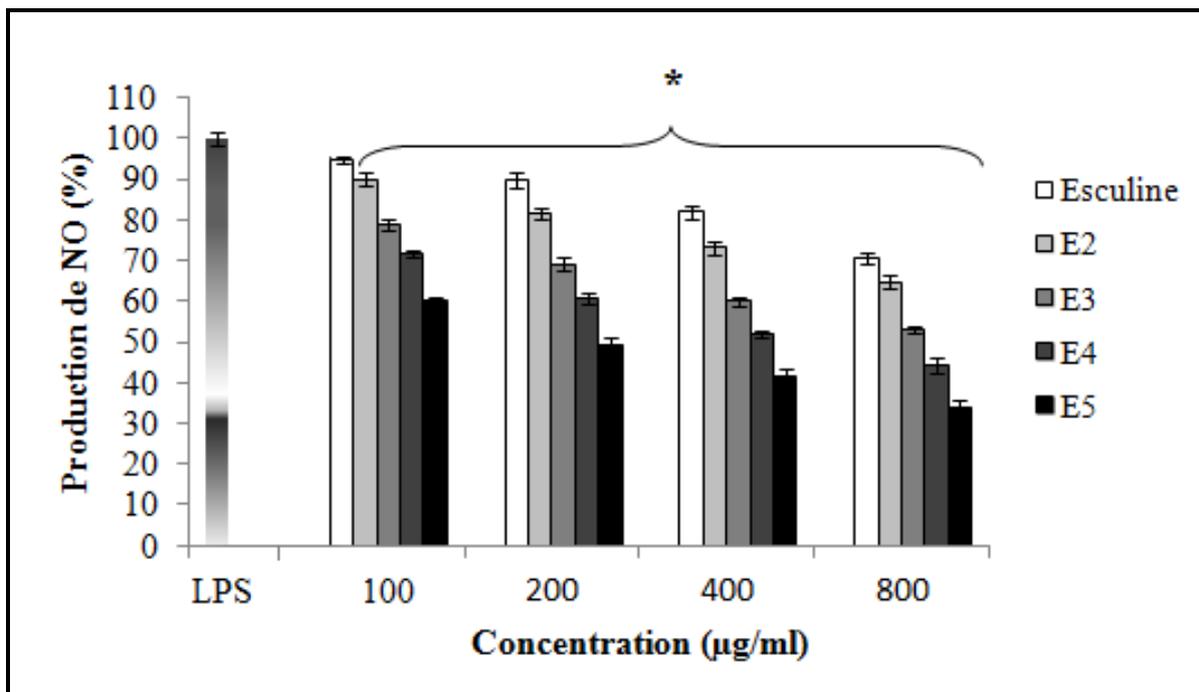


Figure 53. Production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages traités par l'esculine, les fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et E5) additionné à 2 µg/ml de LPS et par le témoin positif (LPS à 2µg/ml). *p < 0,05 : un pourcentage significatif de production de NO comparé aux cellules traités avec les LPS seulement en utilisant le *t* student test.

II.2. Effet de la rutine de l'esculine et de leurs fractions d'oligomères sur l'activité lysosomale.

La rutine ainsi que ses fractions d'oligomères étudiées stimulent significativement l'activité lysosomale des macrophages à toutes les concentrations testées (de 25 à 200 µg/ml) (Figure 54). Ces constatations, impliquent que le monomère et ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) sont dotés de pouvoirs immunostimulateurs de type dose dépendant. L'activité lysosomale la plus importante est obtenue en présence de la fraction d'oligomère R5 à la plus forte concentration testée (200 µg/ml) avec un pourcentage de 94,1% alors que le monomère présente un pourcentage de 54,8% à la même concentration.

Une étude réalisée par Bae et al. (Bae et al., 2012) a permis de mettre en évidence le pouvoir immunostimulateur de la rutine. Cette constatation a été supportée par Stanely-Mainzen et Priya (Stanely-Mainzen et Priya, 2010) qui ont précisé que l'importante activité lysosomale notée en présence de la rutine est due à un effet stimulateur de ce flavonoïde sur des enzymes lysosomales tel que la β -glucuronidase, la β -N-acetylglucosaminidase, la β -galactosidase et les cathépsine-B et D. Le pouvoir immunostimulateur des fractions d'oligomère de rutine pourrait également être associé à une forte induction de certains ou tous les enzymes cités précédemment.

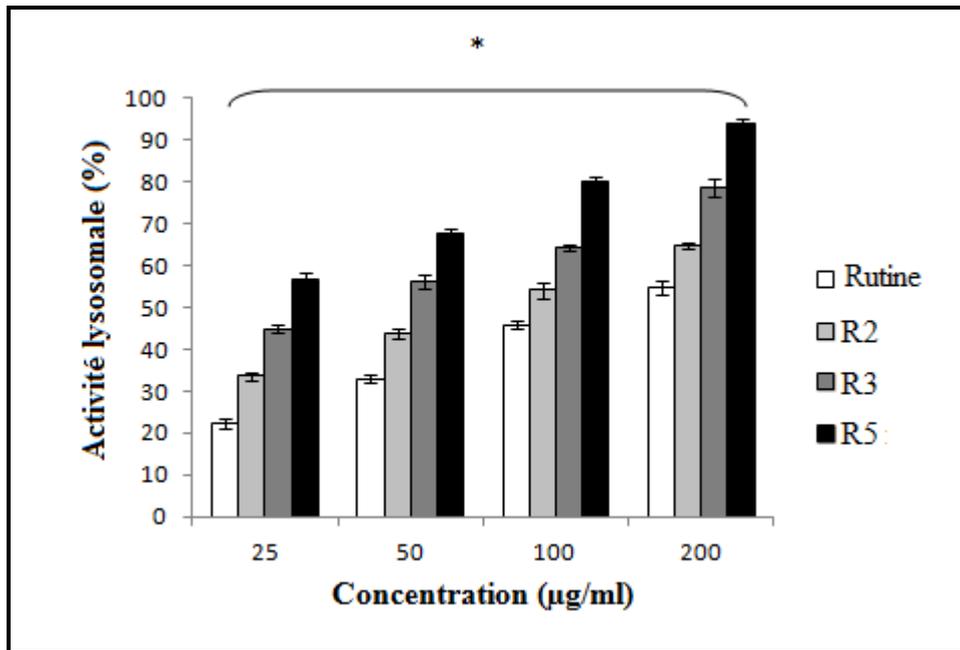


Figure 54. Effet de la rutine et de ses fractions d'oligomères (R2, R3 et R5) sur l'activité lysosomale des macrophages. * $p < 0,05$: un pourcentage d'activité lysosomale significative comparé aux cellules non traités en utilisant le *t* student test.

Un effet stimulateur de l'activité lysosomale, inversement proportionnelle à la masse moléculaire moyenne est observé en présence de l'esculine et de ses fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et E5) (figure 55). Cet effet immunostimulateur qui diminue avec l'augmentation de la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligoesculines pourrait être due au fait que les molécules d'importantes masses moléculaires ont plus de difficulté à traverser la membrane cellulaire. Un tel phénomène a été décrit par plusieurs auteurs (Chakrabarty et al., 2009; Symonds et al., 2005). Le pouvoir stimulateur de l'activité lysosomale mis en évidence en présence de l'esculine et de ses fractions d'oligomères est inversement proportionnelle à la concentration. Plusieurs auteurs ont montré qu'il pourrait y avoir un phénomène de compétitivité entre les molécules actifs sur les récepteur des macrophages à forte dose. Ceci pourrait expliquer la faible stimulation de l'activité lysosomale au fure et à mesure que la concentration testée augmente. La capacité de l'esculine et de ses fractions d'oligomères à

stimuler l'activité lysosomale indique que ces molécules sont dotées de pouvoirs immunostimulateurs.

La stimulation la plus importante de l'activité lysosomale a été notée en présence de l'esculine à la plus faible concentration (100 µg/ml) avec un pourcentage de stimulations de 69,3% comparée à 27,6% en présence de la fraction d'oligomères E5 à la même concentration. L'effet immunostimulateur des certaines coumarines a été rapporté par plusieurs auteurs (Luo et al., 2011 ; Kumar et al., 2012). En effet, Kumar et al., (Kumar et al., 2012) pensent que le pouvoir stimulateur de l'activité lysosomale dans le cas des coumarines est lié à une stimulation de la cathépsine B.

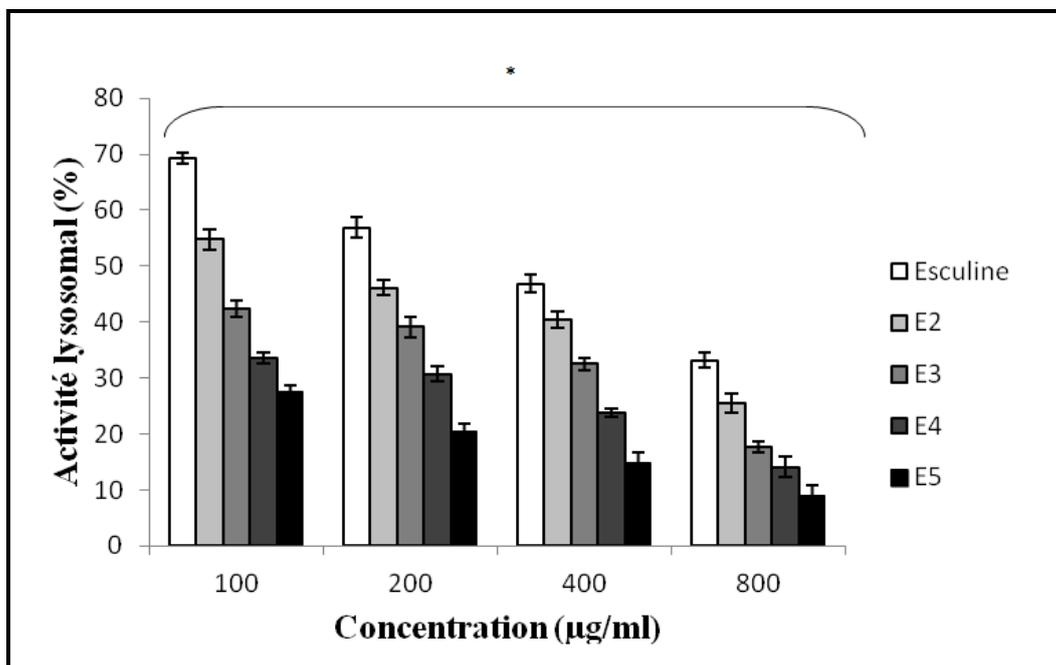


Figure 55. Effet de l'esculine et de ses fractions d'oligomères (E2, E3, E4 et E5) sur l'activité lysosomale des macrophages. * $p < 0.05$: un pourcentage d'activité lysosomale significative comparé aux cellules non traitées en utilisant le *t* student test.

Au cours de ce chapitre, on a pu montrer d'une part le pouvoir stimulateur des splénocytes, des lymphocytes T et B par les fractions d'oligorutines et d'oligoesculines. D'autre part, on a mis en évidence l'important pouvoir anti-inflammatoire de ces mêmes fractions en

suivant l'effet de ces derniers sur la production de monoxydes d'azote (NO) induite par les LPS.

En plus de leurs pouvoirs anti-inflammatoires, les fractions d'oligorutines et d'oligoesculines montrent un effet immunostimulateur, qui est traduit par la stimulation de l'activité lysosomale des macrophages, qui augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligorutines étudiées. Ce même pouvoir a été inversement proportionnel à la masse moléculaire dans le cas des fractions d'oligoesculines.

CONCLUSIONS

Conclusion

La solubilité des polyphénols est un paramètre très important dans la biodisponibilité de ces molécules. Notre équipe a envisagé d'étudier la polymérisation de différents polyphénols dont la rutine et l'esculine qui font l'objet de ce travail, ainsi que son effet sur leur solubilité.

L'analyse cinétique de la réaction de polymérisation de la rutine et de l'esculine par la laccase de *Trametes versicolor* a permis de mettre en évidence que cette réaction permet d'atteindre une masse moléculaire moyenne (Mw) de 4584,1 g/mol au bout de 24 h de réaction pour la rutine et de 3198,3 g/mol pour l'esculine au bout de 72 h. L'arrêt observé de la réaction pourrait être dû à un phénomène de chélation de l'enzyme par les oligomères formés, conduisant à son inhibition.

Cinq fractions d'oligomères de masse moléculaire moyenne entre 2127,42 et 8331,85 g/mol pour la rutine et entre 688,12 et 6973 g/mol pour l'esculine ont été obtenues après séparation sur des membranes de différentes porosités. L'analyse de ces fractions d'oligorutines et d'oligoesculines par FTIR a permis de mettre en évidence que les oligomères de rutine sont obtenus à travers des liaisons C-C, C-O et C=O tandis que les fractions d'oligoesculine sont obtenus vis-à-vis de liaison C-C. L'analyse des fractions d'oligomères obtenues par RMN montre que pour les oligorutines, les liaisons entre les unités peuvent avoir lieu aussi bien sur la partie glycosylée que sur la partie phénolique de la rutine sans pouvoir préciser la localisation exacte de ces liaisons. Ceci est dû à la grande hétérogénéité des fractions étudiées. En effet, pour des molécules d'oligorutines de même masse moléculaire moyenne, plusieurs types de liaisons peuvent exister. Pour les fractions d'oligoesculines une liaison de type C4-O7 a été mise en évidence par RMN.

Les fractions d'oligorutine et d'oligoesculine montrent une importante solubilité dans l'eau, soit 351 fois plus soluble que le monomère pour les fractions d'oligorutines, et à peu près 4 fois plus importante que celle du monomère pour les fractions d'oligoesculines. Cette

importante solubilité des fractions d'oligorutines et oligoesculines est probablement dûe aux différences structurelles entre les monomères et les fractions d'oligomères.

Plusieurs études (Kurisawa et al., 2003a ; Anthoni et al., 2008 ; Anthoni et al., 2010) ont montré que la polymérisation de monomères phénoliques améliorerait considérablement la biodisponibilité des molécules en question. Par ailleurs, les polyphénols ont été largement décrits dans la littérature pour leurs capacités protectrices vis-à-vis de différentes pathologies (cancérogénèse, maladies neurogénéralives ...) (Link et al., 2010 ; Choi et al., 2012 ; Ebrahimi et Schluesener, 2012 ; Stagos et al., 2012 ; Sun et al., 2012), ce qui nous a amené à étudier dans un premier temps la toxicité de ces molécules et spécialement afin d'établir les intervalles de concentrations adéquates à l'étude de leurs éventuels effets protecteurs. Nous avons pour notre part utilisé deux tests de génotoxicité pour évaluer la génotoxicité des fractions d'oligorutines et d'oligoesculines obtenues : Le test d'Ames (système procaryote) et le test des comètes (système eucaryote). Ces tests ont révélé l'absence de génotoxicité des fractions d'oligorutines et d'oligoesculines, aux concentrations testées. Celle-ci n'aurait donc pas un effet direct sur l'ADN. De même, j'ai pu mettre en évidence la capacité des fractions d'oligomères à inhiber la génotoxicité induite par des agents mutagènes directs ou indirects, capacité qui augmente avec la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligomères étudiées.

Par ailleurs, différentes études ont révélé une corrélation entre l'effet antigénotoxique de polyphénols vis-à-vis de différents mutagènes et l'activité antioxydante de ces polyphénols. En effet, les radicaux libres oxygénés et non oxygénés sont souvent à l'origine d'effets génotoxiques, de dérèglement de métabolismes cellulaires et par conséquent de dérèglement du déroulement du cycle cellulaire. Pour cela, nous avons entrepris d'évaluer les capacités antioxydantes des oligomères polyphénoliques obtenus vis-à-vis de différents types de radicaux (DPPH, ABTS et hydroxyle). Nous avons observé une diminution de la capacité

antiradicalaire des fractions d'oligorutines par rapport au monomère, contrairement aux fractions d'oligoesculines qui montrent une augmentation du potentiel antiradicalaire par rapport au monomère.

Concernant la rutine, nous pensons que cette chute de l'activité antiradicalaire des oligomères serait due au fait que les groupements identifiés comme responsables de cette activité au niveau de la structure des flavonoïdes, à savoir les groupements hydroxyles en position C3' et/ou C4' (Cao et al., 1997 ; Heim et al., 2002 ; Chen et al., 2012), ont été affectés au cours de la réaction de polymérisation de la rutine. Ces résultats indiquent que l'activité angénotoxique vis-à-vis de l'MMS, du 2-AA et du H₂O₂ exhibée par les fractions d'oligorutines n'est pas directement liée à leurs capacités antiradicalaires. Pour les fractions d'oligoesculines, nous pensons que l'augmentation de l'activité antiradicalaire par rapport au monomère serait due au fait que la partie catéchol et/ou les groupements hydroxyles, identifié comme étant à l'origine de l'activité antiradicalaire des coumarines n'ont pas été affectés au cours de la polymérisation de l'esculine. L'importante activité antiradicalaire en présence des fractions d'oligoesculines pourrait en partie expliquer la capacité antigénotoxique des fractions d'oligoesculines. Par ailleurs, les fractions d'oligorutines et d'oligoesculines montrent de fortes activités chélatrice du fer comparé à leurs monomères respectifs. Ceci serait probablement dû au fait que les groupements identifiés comme responsables de la chélation des métaux, en l'occurrence les hydroxyles en position 5, 3', 4' et/ou le groupement carbonyle en position 4 pour la rutine et la partie catéchol et/ou des groupements hydroxyles pour l'esculine (Kancheva, Boranova et al.; Lin, Tsai et al. 2008), n'ont pas été affectés au cours des réactions de polymérisations des monomères (Fernandez et al., 2002 ; Guo et al., 2002 ; Mladeanka et al., 2011). Dans la mesure où cette activité chélatrice de métaux augmente en fonction de degré de polymérisation, ceci expliquerait éventuellement l'arrêt de la polymérisation aussi bien de la rutine que de l'esculine au bout de 24 h et 72 h

respectivement. En effet, le site actif de l'enzyme de polymérisation utilisé, en l'occurrence la laccase, comporte un site cuivrique. L'effet chélateur des polymères pouvant être à l'origine de sa désactivation.

Dans le cas de la rutine comme de l'esculine, l'oligomérisation a permis d'augmenter leur pouvoir inhibiteur de la xanthine oxydase. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les groupements essentiels pour cette activité, en l'occurrence groupements hydroxyles en position 5 et 7, et/ou la double liaison C2-C3 (Cos et al., 1998 ; Lin et al., 2008) dans le cas de la rutine et le groupement hydroxyle en position 7, dans le cas de l'esculine (Chang et Chiang, 1995) n'ont pas été affectés durant les réactions de polymérisation de ses monomères.

La question qui se pose à ce stade, est la suivante : est ce que les fractions d'oligomères agiraient uniquement en empêchant les molécules génotoxiques d'endommager les macromolécules cellulaires ou bien interviendraient également par d'autres mécanismes tels que la stimulation ou la suppression de phénomène inflammatoire induit par des agents génotoxiques. Il paraît que les fractions d'oligorutines et d'oligoesculines ont de remarquables pouvoirs stimulateurs de la prolifération des splénocytes, des lymphocytes B et des lymphocytes T. Ces fractions d'oligomères seraient donc capables d'agir sur le système immunitaire par voie humorale et par voie cellulaire.

L'importante activité antiinflammatoire des fractions d'oligorutine et d'oligoesculine a été mise en évidence suite à l'inhibition de la production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages en présence de ces fractions. Cette inhibition des NO serait probablement dûe à une inhibition de la voie des NF-kB pour les fractions d'oligorutines (Lee et al., 2012) et à une inhibition de l'oxyde nitrique synthase (NOS) pour les fractions d'oligoesculines (Morikawa et al., 2012).

L'étude de l'effet des fractions d'oligorutines sur l'activité lysosomale des macrophages révèle un effet stimulateur de celle-ci sur l'activité lysosomale des macrophages. Ce pouvoir, est le résultat de la stimulation d'enzymes lysosomales telles que la β -glucuronidase, la β -N-acetylglucosaminidase, la β -galactosidase et la cathépsine-B et D.

Les fractions d'oligoesculines stimulent à leurs tours l'activité lysosomale des macrophages, mais de façon moins importante que leur monomère, révélant ainsi un effet immunostimulateur pouvant être bénéfiques pour améliorer nos défences naturelles (dans le cas des vaccins par exemple).

Les résultats de nos travaux ont fait l'objet de deux articles dont le premier, intitulé « Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of oligorutin and oligoesculin » qui a été accepté à « Food chemistry » et le second intitulé « Cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potencies of oligorutins » qui a été accepté à « Human & Experimental Toxicology ».

En perspective de cette étude, et vu l'intérêt des résultats obtenus en présence des fractions d'oligorutines et d'oligoesculines il est important de compléter ce travail par une étude biologique plus approfondie. Cette étude aura comme but de rechercher le mode d'action de ces molécules vis-à-vis d'autres cellules en culture. D'autres activités biologiques *in vivo* devraient également être réalisées avant d'envisager des investigations plus poussées quant à l'utilisation à des fins thérapeutiques de ces fractions d'oligoflavonoïdes. Il est également intéressant de pouvoir mieux comprendre les étapes de l'oligomérisation des monomères étudiés en essayant par exemple d'identifier les radicaux générés au cours de cette réaction.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

References bibliographique

A

- Abou El Hassan, M., Touw, D. J., Wilhelm, A. J., Bast, A., et van der Vijgh, W. J. F. (2000). "Stability of monoHER in an aqueous formulation for i.v. administration." International Journal of Pharmaceutics **211**(1-2): 51-56.
- Akiyama M, Yamada, O., Kanda, N., Akita, S., Kawano, T., Ohno, T., Mizoguchi, H., Eto, Y., Anderson, K. C., et Yamada, H. (2002) Telomerase overexpression in K562 leukemia cells protects against apoptosis by serum deprivation and double-stranded DNA break inducing agents, but not against DNA synthesis inhibitors. Cancer Letters **178**:187-97.
- Aktas, N., G. Kibarer, G., et Tanyolac, A. (2000). "Effects of reaction conditions on laccase-catalyzed alpha-naphthol polymerization." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **75**: 840-846
- Aktas, N. (2005). "Optimization of biopolymerization rate by response surface methodology (RSM)." Enzyme and Microbial Technology **37**(4): 441-447.
- Aktas, N. et Tanyolas A. (2003). "Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol." Bioresource Technology **87**(3): 209-214.
- Ames B, Mccann J et Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation research **6**:374-64.
- Angerer, P. S., A., Studer, A., Witholt, B., et Li, Z. (2005). "Oxidative polymerization of a substituted phenol with ion-paired horseradish peroxidase in an organic solvent." Macromolecules **38**(15): 6248-6250.
- Anthoni, J., Lionneton, F., Wieruszeski, J.-M., Magdalou, J., Engasser, J.-M., Chebil, L., Humeau, C., et Ghoul, M. (2008). "Investigation of enzymatic oligomerization of rutin." Rasayan J. Chem. **1**(4): 718-731
- Anthoni, J., Humeau, C., Maia, E., Chebil, L., Engasser, J.-M., et Ghoul, M. (2010). "Enzymatic synthesis of oligoesculin: structure and biological activities characterizations." European Food Research and Technology **231**(4): 571-579.
- Apak, R., Güçlü, K., Özurek, M., et Karademir, S. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine:CUPRAC Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(26), 7970-7981
- Apak, R., Kubilay, G., Birsen, D., Özyürek, M., Esin Çelik, S., Burcu, B., et Özyurt, D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Molecules **12** : 1496-1547.
- Arockia Babu, M., N. Shakya, et al. (2002). "Development of 3D-QSAR models for 5-Lipoxygenase antagonists: chalcones." Bioorganic & Medicinal Chemistry **10**(12): 4035-4041.

B

- Bae, S.-H., Kim, B.-R., Kang, B. J., Tsutsui, N., Okutsu, T., Shinji, J., Jang, I. K., Han, C.-H., et Wilder, M. N. (2012). Molecular cloning of prophenoloxidase and the effects of dietary Beta-glucan and rutin on immune response in hemocytes of the fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish & Shellfish Immunology **33**(3), 597-604
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). "Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses." Food chemistry **99**(1): 191-203.
- Baldrian, P. (2006). "Fungal laccases – occurrence and properties." FEMS Microbiology Reviews **30**(2): 215-242.
- Barcelos, G. M., Grotto, D., Angeli, J. P. F., Serpeloni, J. M., Rocha, B. A., Bastos, J. K., et Barbosa, F. J. (2011). Evaluation of antigenotoxic effects of plant flavonoids quercetin and rutin on HepG2 cells. Phytotherapy Research **25**: 1381-1388
- Bateman, J.R., Peters R.L., Hazen J.G., et Steinfield J.L. 1996. Methyl methane sulfonate. Phase I. Clinical Study. Cancer Chemother Rep .50. 675-682.
- Beil W, Birkholz C, Sewing KF (1995) Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. Arzneimittelforschung **45** (6): 697-700.
- Bento, I., L. O. Martins, L. O., Gato Lopes, G., Armenia Carrondo, M., et Lindley, P. F. (2005). "Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective." Dalton Transactions(21): 3507-3513.
- Bernhardt, R. (2006). "Cytochromes P450 as versatile biocatalysts." Journal of Biotechnology **124**(1): 128-145.
- Beth, M. et Jack, K. (2003). A review of polymer dissolution. *Progress in Polymer Science*, **28**(8), 1223-1270
- Bindhu, L. V. and E. T. Abraham (2003). "Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan for use in nonaqueous media." Journal of Applied Polymer Science **88**(6): 1456-1464.
- Bors, W., C. Michel, C., & Schikora, S. b. (1995). "Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study." Free Radical Biology and Medicine **19**(1): 45-52.
- Bouhrel, I., Kilani, S., Skandrani, I., Amar, R. B., Nefatti, A., Laporte, F. o., Hininger-Favier, I., Ghedira, K., et Chekir-Ghedira, L. (2008). Acacia salicina extracts protect against DNA damage and mutagenesis in bacteria and human lymphoblast cell K562 cultures. *Nutrition Research*, **28**(3), 190-197
- Brown, J. E., H. Khodr, H., Hider, R. C., & Rice-Evans, C (1998). "Structural dependence of flavonoïdesinteractions with Cu²⁺ ions : implication for their antioxidant properties." The Biochemical journal. **330**: 1173-1178.
- Bruneton, J. (1964). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. Paris, Lavoisier.
- Bruneton, J. (1987). Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Paris, Techniques et documentation Lavoisier.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. Paris, lavoisier.
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales. Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales.

- Bruno, F. F., J. A. Akkara, J. A., Samuelson, L. A., Kaplan, D. L., Mandal, B. K., Marx, K. A., Kumar, J., et Tripathy, S. K. (1995). "Enzymic Mediated Synthesis of Conjugated Polymers at the Langmuir Trough Air-Water Interface." Langmuir **11**(3): 889-892.
- Bruno, F. F., S. Nagarajan, S., Nagarajan, R., Kumar, J., & Samuelson, L. A. (2005). "Biocatalytic synthesis of water-soluble oligo(catechins)." Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry **42 A**(11): 1547-1554.
- Bu-Abbas, A., M. N. Clifford, M. N., Ioannides, C., & Walker, R. (1995). "Stimulation of rat hepatic UDP-glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea." Food and Chemical Toxicology **33**(1): 27-30.
- Budzianowski, J. (1990). "Kaempferol glycosides from *Hosta ventricosa*." Phytochemistry **29**(11): 3643-3647.

C

- Calias, P., T. Galanopoulos, T., Maxwell, M., Khayat, A., Graves, D., Antoniadis, H. N., et d'Alarcao, M. (1996). "Synthesis of inositol 2-phosphate-quercetin conjugates." Carbohydrate Research **292**(0): 83-90.
- Canfora, L., G., Iamarino, G., Rao, M. A., et Gianfreda, L (2008). "Oxidative Transformation of Natural and Synthetic Phenolic Mixtures by *Trametes versicolor* Laccase." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(4): 1398-1407.
- Cao, G., E. Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). "Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships." Free Radical Biology and Medicine **22**(5): 749-760.
- Chakrabarty B., Ghoshal A.K., Purkait M.K. (2009). "Effect of molecular weight of PEG on membrane morphology and transport properties". Journal of Membrane Science 309: 209–221
- Chang, W., S., et Chiang, C. H. (1995). "Structure-Activity relationship of coumarin in Xanthine oxidase inhibition." Anticancer Research **15**: 1969-1973.
- Charles E.M., Henderson R.F. et Roger O. M. (1984). Distribution, retention, and fate of 2-aminoanthracene in rats after inhalation. Toxicology and Applied Pharmacologie. 75. 52-59.
- Chebil, L., C. Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., et Ghoul, M. (2006). "Enzymatic acylation of flavonoids." Process Biochemistry **41**(11): 2237-2251.
- Chebil, L., C. Humeau, C., Anthoni, J., Dehez, F. o., Engasser, J.-M., et Ghoul, M. (2007). "Solubility of Flavonoids in Organic Solvents." Journal of Chemical & Engineering Data **52**(5): 1552-1556.
- Chen, Y.H., Z.S. Yang, Z.S., Wen, C.C., Chang, Y.S., Wang, B.C., Hsiao, C.A., et Shih, T.L. (2012). "Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae." Food chemistry **134**(2): 717-724.
- Chi, Y. S., H. G. Jong, H. G., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S., et Kim, H. P. (2001). "Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases." Biochemical Pharmacology **62**(9): 1185-1191.
- Choi, D.-Y., Lee, Y.-J., Hong, J. T., et Lee, H.-J. (2012). Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. Brain Research Bulletin, **87**(2-3) : 144-153.
- Cimanga, K., De Bruyne, T., Hu, J. P., Cos, P., Apers, S., Pieters, L., Tona, L., Kambu, K., Berghe, D. V., et Vlietinck, A. J. (1999). Constituents from *Morinda morindoides* Leaves as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Scavengers of Superoxide Anions. Pharmacy and Pharmacology Communications **5**(6): 419-424

- Claus, H. (2004). "Laccases: structure, reactions, distribution." Micron **35**(1-2): 93-96.
- Cohen, A. J. (1979). "Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man." Food and Cosmetics Toxicology **17**(3): 277-289.
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. International Immunopharmacology, **1**(8): 1397-1406
- Collins, A., Dusinská, M., Gedik, C. M., et Stětina, R. (1996). Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? Environmental Health Perspectives **104**(3): 465-469
- Comalada, M., Ballester, I., Bailon, E., Sierra, S., Xaus, J., Galvez, J., De Medina, F. S., et Zarzuelo, A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. Biochemical Pharmacology, **72**(8): 1010-1021.
- Cos, P., L. Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. J., et Berghe, D. V. (1998). "Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers." Journal of Natural Products **61**(1): 71-76.
- Cotelle, N. (2001). "Role of flavonoids in oxidative stress." Current topics in medicinal chemistry **1**: 569-590.
- Cox, D., O'Kennedy, R., et Thornes, R. D. (1989). "The Rarity of Liver Toxicity in Patients Treated with Coumarin (1, 2-Benzopyrone)." Human & Experimental Toxicology **8**(6): 501-506.
- Crespy, V., C. Morand, C., Besson, C., Manach, C., Christian, D., et Rémaéy, C. (2001). "Comparison of the Intestinal Absorption of Quercetin, Phloretin and Their Glucosides in Rats." The Journal of Nutrition **131**(8): 2109-2114.
- Crespy, V., C. Morand, C., Besson, C., Cotelle, N., Vézin, H., Demigné, C., et Rémésy, C. (2003). "The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound." American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology **284**(6): G980-G988.

D

- Dai, L. et A. M. Klibanov (1999). "Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(17): 9475-9478.
- Dai, L. et A. M. Klibanov (1999). "Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(17): 9475-9478.
- Da Silva, E. J. A., O. A. Braga, O. A., et Lapa, A. J. (1994). "Pharmacological Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of a Citrus Bioflavonoid, Hesperidin, and the Isoflavonoids, Duartin and Claussequinone, in Rats and Mice." Journal of Pharmacy and Pharmacology **46**(2): 118-122.
- Da Silva, S. L., da Silva, A., Honario, K. M., Marangoni, S., Toyama, M. H., et Da Silva, A. B. F. (2004). The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, **684**(1-3), 1-7
- De Medina, F., Sanchez, F., Posadas, O., Lopez, R., Romero-Calvo, C., Mascaraque, G., Daddaoua, A., Perez, R., Gonzalez Herrera, M. M., Gonzalez, G. H., Martinez-Plata, E., Ortega, M., Suarez Zarzuelo, A., et Martinez-Augustin, O. (2009). "The intestinal

- antiinflammatory activity of the flavonoid rutin requires oral administration and may involve effects on mucosal lymphocytes." Clinical Nutrition Supplements: 49.
- De Rijke, E., P. Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. (2006). "Analytical separation and detection methods for flavonoids." Journal of Chromatography A **1112**(1-2): 31-63.
- Densiov, E. T. et Afanasev I. B. (2005). Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. USA, Taylor & Francis Group.
- Desentis-Mendoza, R. M., H. Hernandez-Sanchez, H., Moreno, A., Rojas del C, E., Chel-Guerrero, L., Tamariz, J., et Jaramillo-Flores, M. E. (2006). "Enzymatic Polymerization of Phenolic Compounds Using Laccase and Tyrosinase from *Ustilago maydis*." Biomacromolecules **7**(6): 1845-1854.
- Dexeus, F. H., C. J. Logothetis, C. J., Sella, A., Fitz, K., Amato, R., Reuben, J. M., et Dozier, N. (1990). "Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal cell carcinoma." Journal of Clinical Oncology **8**(2): 325-9.
- Dickinson, M. et P. D. I. Fletchert (1989). "Enzymes in organic solvents." Enzyme and Microbial Technology **11**(1): 55-56.
- Dordick, J. S., Marletta, M. A., et Klibanov, A. M. (1987). "Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media." Biotechnology and Bioengineering **30**(1): 31-36.
- Dubey, S., Singh, D., et Misra, R. A. (1998). "Enzymatic synthesis and various properties of poly(catechol)." Enzyme and Microbial Technology **23**(7-8): 432-437.
- Duhan, O. M., Baryliak, I. R., Nester, T. I., Dvornyk, A. S., et Kunakh, V. A. (1999). The antimutagenic activity of biomass extracts from the cultured cells of medicinal plants in the Ames test. TSitologija i genetika **33**(6), 19-25

E

- Ebrahimi, A., et Schluesener, H. (2012). Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls. Ageing Research Reviews **11**(2), 329-345
- Edenharder, R., Rauscher, R., et Platt, K. L. (1997). The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **379**(1), 21-32
- Edenharder, R., et Tang, X. (1998). Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. Food and Chemical Toxicology **35**(3-4), 357-372
- Egan, D., R. O'Kennedy, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., et Thornes, R. D. (1990). "The Pharmacology, Metabolism, Analysis, and Applications of Coumarin and Coumarin-Related Compounds." Drug Metabolism Reviews **22**(5): 503-529.
- Eker, B., Zagorevski, D., Zhu, G., Linhardt, R. J., et Dordick, J. S. (2009). "Enzymatic polymerization of phenols in room-temperature ionic liquids." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **59**(1-3): 177-184.
- Enguita, F. J., Martins, L. O., Henriques, A. O., et Carrondo, M. A. (2003). "Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component." Journal of Biological Chemistry **278**(21): 19416-19425.

F

- Falcimaigne, A. (2004). Mise au point d'un procédé de production enzymatique des esters de flavonoïde : cinétique, purification, étude conformationnelle et caractérisation des

propriétés physico-chimiques et biologiques. Nancy, Institut National Polytechnique de Lorraine. **thèse**.

- Fentem, J. H. et J. R. Fry (1993). "Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin." Comparative Biochemistry and Physiology **104C**: 1-8.
- Fernandez, M. T., Mira, M. L., Florancio, M. H., et Jennings, K. R. (2002). "Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study." Journal of Inorganic Biochemistry **92**(2): 105-111.
- Fesen, M. R., Y. Pommier, Y., Leteurtre, F. o., Hiroguchi, S., Yung, J., et Kohn, K. W. (1994). "Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds." Biochemical Pharmacology **48**(3): 595-608.
- Floc'h, F., Mauger, F., et Desmurs, J. R. (2002). "coumarin in plants and fruits." Perfumer & flavorist **27**(2): 32-36.
- Florin, I., Rutberg, L., Curvall, M., & Enzell, C. R. (1980). "Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test." Toxicology **15**(3): 219-232.

G

- Gacche, R. N., et Jadhav, S. G. (2012). Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Selected Coumarin Derivatives: Preliminary Results of a Structure-Activity Relationship Study Using Computational Tools. Journal of Experimental & Clinical Medicine **4**(3), 165-169.
- Galati, E. M., Monforte, M. T., Kirjavainen, S., Forestieri, A. M., Trovato, A., et Tripodo, M. M. (1994). "Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity." Farmaco Prat **40**(11): 709-712.
- Garavaglia, S., Teresa, C., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., & Rizzi, M. (2004). "The Structure of Rigidoporus lignosus Laccase Containing a Full Complement of Copper Ions, Reveals an Asymmetrical Arrangement for the T3 Copper Pair." Journal of Molecular Biology **342**(5): 1519-1531.
- Garnier RC, Miller EC et Miller JA. (1972). Liver microsomal metabolism of Aflatoxin B1 to a reactive derivative toxine to Salmonella typhumurium TA 1535. Cancer Res **32**: 2058-2066.
- Gee, J. M., DuPont, M. S., Day, A. J., Plumb, G. W., Williamson, G., et Johnson, I. T. (2000). "Intestinal Transport of Quercetin Glycosides in Rats Involves Both Deglycosylation and Interaction with the Hexose Transport Pathway." The Journal of Nutrition **130**(11): 2765-2771.
- Gibbs, P. A., Janakidevi, K., et Feuer, G. (1971). "Metabolism of Coumarin and 4-Methylcoumarin by Rat-Liver Microsomes." Canadian Journal of Biochemistry **49**(2): 177-184.
- Gilani AH, Janbaz KH (1993) Protective effect of *Artemisia scoparia* extract against acetaminophen-induced hepatotoxicity. Gener Pharmacol: The Vascular System **24** (6): 1455-8
- Gonçalves JLS, Leitão SG, Delle Monache F (2001) In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. Phytomedicine **8** (6): 477-80
- González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S., et Tuñón, M. J. (2007). "Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids." Nutrition hospitalaria **22**(3): 287-293.

- Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-Abdallah, F., & Chasteen, N. D. (2007). "Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects." Dalton Transactions(43): 4951-4961.
- Guresir, M., Aktas, N., & Tanyolaç, A. (2005). "Influence of reaction conditions on the rate of enzymic polymerization of pyrogallol using laccase." Process Biochemistry **40**(3-4): 1175-1182.

H

- Hagensee M E et Moses R E (1989). Multiple pathways for repair of hydrogen peroxide-induced DNA damage in Escherichia coli. Journal of Bacteriology. **171** (2): 991-994.
- Hahlbrock, K. et J. Ebel (1982). In the flavonoids advances in research eds J. B. Harborne and T. J. Mabry. London, Chapman and Hall.
- Hamid, M. et R. Khalil ur (2009). "Potential applications of peroxidases." Food chemistry **115**(4): 1177-1186.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., & Fukui, S. (1994). "The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids." Free Radical Biology and Medicine **16**(6): 845-850.
- Harborne, J. B., Mabry, T. J., et Mabry, H. (1975). Solubility of naringin in water. London, Solubility of naringin in water.
- Harborne, J. B. (1993). The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. C. P. Inc: 241-245.
- Harborne, J. B. et Williams C. A. (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." Phytochemistry **55**: 481-504.
- Harborne, J. B. et Williams C. A. (2001). "Anthocyanins and other flavonoids." Natural Product Reports **18**(3): 310-333.
- Haslam E.T. (1998). Bitterness and astringency. In: Practical polyphenolics (from structure to molecular recognition and physiological action). London Cambridge University Press.
- Hatch, F. T., Lightstone, F. C., et Colvin, M. E. (2000). Quantitative structure-activity relationship of flavonoids for inhibition of heterocyclic amine mutagenicity. Environmental and Molecular Mutagenesis **35**(4), 279-299
- Havsteen, B. H. (2002). "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." Pharmacology & Therapeutics **96**(2-3): 67-202.
- Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., et Zeiger, E. (1983). "Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals." Environmental Mutagenesis **5**(S1): 3-49.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., et Bobilya, D. J. (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." The Journal of Nutritional Biochemistry **13**(10): 572-584.
- Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., & Katan, M. B. (1995). "Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers." The American Journal of Clinical Nutrition **62**(6): 1276-82.
- Hollman, P. C. H., Van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., Gaag, M. S., Mengelers, M. J. B., de Vries, J. H. M., et Katan, M. B. (1997). "Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man." FEBS Letters **418**(1-2): 152-156.
- Hollman P.C.H. et Katan M.B. (1998). "Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man." Archives of Toxicology supplement **25**: 237-239.
- Holwerda, R. A. et Gray H. B. (1975). "Kinetics of the reduction of Rhus vernicifera laccase by ferrocyanide ion." Journal of the American Chemical Society **97**(21): 6036-6041.

Hosny, M. et Rosazza J. P. N. (2002). "Novel Oxidations of (+)-Catechin by Horseradish Peroxidase and Laccase." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(20): 5539-5545.

I

Iinuma, M. et M. Mizuno (1989). "Natural occurrence and synthesis of 2'-oxygenated flavones, flavonols, flavanones and chalcones." Phytochemistry **28**(3): 681-694.

Ikeda, R., J. Sugihara, J., Uyama, H., et Kobayashi, S. (1996). "Enzymatic oxidative polymerization of 2,6-dimethylphenol." Macromolecules **29**: 8702-8705.

Ikeda, R., Sugihara, J., Uyama, H., & Kobayashi, S. (1998). "Enzymatic oxidative polymerization of 4-hydroxybenzoic acid derivatives to poly(phenylene oxide)s." Polymer International **47**(3): 295-301.

Intra, A., Nicotra, S., Riva, S., & Danieli, B. (2005). "Significant and Unexpected Solvent Influence on the Selectivity of Laccase-Catalyzed Coupling of Tetrahydro-2-naphthol Derivatives." Advanced Synthesis & Catalysis **347**(7-8): 973-977.

Ishihara, K. et N. Nakajima (2003). "Structural aspects of acylated plant pigments: Stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **23**: 411-417.

Ishii, K., Furuta, T., et Kasuya, Y. (2003). "High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection." Journal of Chromatography B **794**(1): 49-56.

J

Jassim SA, Naji MA (2003) Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. Appl Microbiol **95** (3): 412-27.

Jiang Du, Zhen-Dan He, Ren-Wang Jiang, et al. (2003) Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. Phytochemistry **62** (8): 1235-8.

Job, D. et H. B. Dunford (1976). "Substituent Effect on the Oxidation of Phenols and Aromatic Amines by Horseradish Peroxidase Compound I." European Journal of Biochemistry **66**(3): 607-614.

Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic, M. G. (1994). "Flavonoids as antioxidants." Journal of the American Chemical Society **116**(11): 4846-4851.

K

Kada, T. (1993). Environmental mutagens and cancerogens. Tokyo: University of Tokyo Press

Kamiya, N., Inoue, M., Goto, M., Nakamura, N., et Naruta, Y. (2000). "Catalytic and Structural Properties of Surfactant-Horseradish Peroxidase Complex in Organic Media." Biotechnology Progress **16**(1): 52-58.

Kancheva, V. D., Boranova, P. V., Nechev, J. T., et Manolov, I. I. (2010). Structure-activity relationships of new 4-hydroxy bis-coumarins as radical scavengers and chain-breaking antioxidants. *Biochimie*, **92**(9), 1138-1146

- Kaneko, T., Baba, N., et Matsuo, M. (2003). "Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity." Chemico-Biological Interactions **142**(3): 239-254.
- Kaneko, T., Tahara, S., et Takabayashi, F. (2007). Inhibitory Effect of Natural Coumarin Compounds, Esculetin and Esculin, on Oxidative DNA Damage and Formation of Aberrant Crypt Foci and Tumors Induced by 1,2-Dimethylhydrazine in Rat Colons. Biological and Pharmaceutical Bulletin **30**(11), 2052-2057.
- Kato, R., Nakadate, T., Yamamoto, S., et Sugimura, T. (1983). "Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition." Carcinogenesis **4**(10): 1301-1305.
- Kazandjian, R. Z. et A. M. Klibanov (1985). "Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform." Journal of the American Chemical Society **107**(19): 5448-5450.
- Kim, Y.-J. et J. A. Nicell (2006). "Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A." Bioresource Technology **97**(12): 1431-1442.
- Kim, Y. J., Shibata, K., Uyama, H., et Kobayashi, S. (2008). "Synthesis of ultrahigh molecular weight phenolic polymers by enzymatic polymerization in the presence of amphiphilic triblock copolymer in water." Polymer **49**(22): 4791-4795.
- Klinenberg, J. R., Goldfinger, S. E., & Seegmiller, J. E. (1965). "The effectiveness of xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout." Annals of internal medicine **62**: 639-647.
- Kobayashi, S., Shoda, S. I., et Uyama, H. (1995). Enzymatic polymerization and oligomerization. Polymer Synthesis/Polymer Engineering, Springer Berlin / Heidelberg. **121**: 1-30.
- Kobayashi, S., Uyama, H., Tonami, H., Oguchi, T., Higashimura, H., Ikeda, R., et Kubota, M. (2001). Regio- and chemo-selective polymerization of phenols catalyzed by oxidoreductase enzyme and its model complexes. Macromolecular Symposia, **175**(1), 1-10
- Kong J.M, Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., et Brouillard, R. (2003). "Analysis and biological activities of anthocyanins." Phytochemistry **64**: 923-933.
- Krajewska, B. (2004). "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review." Enzyme and Microbial Technology **35**(2-3): 126-139.
- Kulys, J., et Vidziunaitė, R. (2002). Modulation of laccase by water soluble polymers Biologija, **2**, 3-6
- Kumar, P., Arora, S., et Yogesh, C. Y. (2012). Anti-inflammatory activity of coumarins and steroidal fractions from leaves of *Moringa oleifera*. International Journal of Drug Discovery and Medical Research **1**(1), 22-25
- Kurisawa, M., Chung, J. E., Uyama, H., et Kobayashi, S. (2003a). "Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin)." Biomacromolecules **4**(5): 1394-1399.
- Kurisawa, M., Chung, J. E., Uyama, H., et Kobayashi, S. (2003b). "Laccase-catalyzed Synthesis and Antioxidant Property of Poly(catechin)." Macromolecular Bioscience **3**(12): 758-764.
- Kurisawa, M., Chung, J. E., Kim, Y. J., Uyama, H., & Kobayashi, S. (2003c). "Amplification of Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization." Biomacromolecules **4**(3), 469-471.

L

- La Casa, C., Villegas, I., Alarcán de la Lastra, C., Motilva, V., et Martan Calero, M. J. (2000). Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. Journal of Ethnopharmacology **71**(1-2), 45-53
- Lake, B. G. (1999). "Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment." Food and Chemical Toxicology **37**(4): 423-453.
- Lasker, J. M., Huang, M. T., et Conney, A. H. (1984). "In vitro and in vivo activation of oxidative drug metabolism by flavonoids." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **229**(1): 162-170.
- Lee, S. J., Kim, J. C., Kim, M. J., Kitaoka, M., Park, C. S., Lee, S. Y., Ra, M. J., Moon, T. W., Robyt, J. F., & Park, K. H. (1999). "Transglycosylation of Naringin by *Bacillus stearothermophilus* Maltogenic Amylase To Give Glycosylated Naringin." Journal of Agricultural and Food Chemistry **47**(9): 3669-3674.
- Lee, S. E., Shin, H.T., Hwang, H. J., et Kim, J. H. (2003). Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. Phytotherapy Research **17**(9), 1041-1047
- Lee, C. S., Park, S. Y., Ko, H. H., et Han, E. S. (2004). Effect of change in cellular GSH levels on mitochondrial damage and cell viability loss due to mitomycin c in small cell lung cancer cells. Biochemical Pharmacology **68**(9), 1857-1867
- Lee, W., Ku, S.K., et Bae, J.S. (2012). Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. Food and Chemical Toxicology **50**(9), 3048-3055
- Lin, H.C., Tsai, S. H., Chen, C. S., Chang, Y. C., Lee, C. M., Lai, Z. Y., & Lin, C. M. (2008). "Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities." Biochemical Pharmacology **75**(6): 1416-1425.
- Lin, J.P., Yang, J.S., Lin, J.J., Lai, K.C., Lu, H.F., Ma, C.Y., Sai-Chuen Wu, R., Wu, K.C., Chueh, F.S., Gibson Wood, W., et Chung, J.-G. (2009). Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. Environmental Toxicology **27**(8), 480-484
- Link, A., Balaguer, F., et Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. Biochemical Pharmacology **80**(12), 1771-1792.
- Liyana-Pathirana, C. M. et Shahidi F. (2006). "Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions." Journal of the Science of Food and Agriculture **86**(3): 477-485.
- Luo, X., Li, L.L., Zhang, S.S., Lu, J.L., Zeng, Y., Zhang, H.Y., et Xiang, M. (2011). Therapeutic effects of total coumarins from *Urtica dentata* Hand on collagen-induced arthritis in Balb/c mice. Journal of Ethnopharmacology **138**(2), 523-529

M

- Ma, H.L., Kermasha, S., Gao, J. M., Borges, R. M., et Yu, X. z. (2009). "Laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds in organic media." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **57**(1-4): 89-95.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., et Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Macheix, J., Fleuriet, A., et Jay-Allemand, C. (2006). Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne, Presses polytechniques et universitaires romande.

- Magliulo E, Carosi PG, Minoli L, et al. (1973) Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. Arzneimittelforschung 23 (Suppl): 161-7
- Mahmood, N., Pizza, C., Aquino, R., De Tommasi, N., Piacente, S., Colman, S., Burke, A., et Hay, A. J. (1993). "Inhibition of HIV infection by flavanoids." Antiviral Research 46(7): 1257-1271.
- Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M. L., Agullo, G., Regeat, F., et Remesy, C. (1995). "Quercetin Metabolites In Plasma of Rats Fed Diets Containing Rutin or Quercetin " The Journal of Nutrition 125(7): 1911-1922.
- Marcarini, J., Ferreira Tsuboy, M. S., Cabral Luiz, R., Regina Ribeiro, L., Beatriz Hoffmann-Campo, C., et Sérgio Mantovani, M. (2011). Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. Experimental and Toxicologic Pathology, 63(5), 459-465
- Markham, K. (1982). Techniques of flavonoid identification. London, Academic Press.
- Maron D et Ames B. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 113, 173-215.
- Marques, R. C. P., de Medeiros, S., Ivia Regina, B., da Silva Dias, C., Barbosa-Filho, J. M., et Agnez-Lima, L. F. (2003). Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 536(1-2), 117-120
- Marshall, M. E., Mendelsohn, L., Butler, K., Cantrell, J., Harvey, J., et Macdonald, J. (1987). "Treatment of non-small cell lung cancer with coumarin and cimetidine." Cancer Treatment Reports 71: 91±92.
- Marshall, M. E., Butler, K., Cantrell, J., Wiseman, C., & Mendelsohn, L. (1989). "Treatment of advanced malignant melanoma with coumarin and cimetidine: a pilot study." Cancer Chemotherapy and Pharmacology 24(1): 65-66.
- Martens, S., Forkmann, G., Britsch, L., Wellmann, F., Matern, U., & Lukacin, R. (2003). "Divergent evolution of flavonoid 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in parsley. FEBS Letters." FEBS Letters 544(1-3): 93-98.
- Martens, S. et A. Mithöfer (2006). "Corrigendum to "Flavones and flavone synthases"." Phytochemistry 67(5): 521.
- Martin MJ, Marhuenda E, Perez-Guerrero C, et al. (1994) Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. Pharmacology 49 (3): 144-50
- Massiot, G., et Lavaud, C. (1995). Structural elucidation of saponins. In: . In: ur-Rahman, Studies in Natural Product Chemistry , Amsterdam, : Elsevier.
- Masuda, M., Sakurai, A., & Sakakibara, M. (2001). "Effect of reaction conditions on phenol removal by polymerization and precipitation using *Coprinus cinereus* peroxidase." Enzyme and Microbial Technology 28(4): 295-300.
- Masuoka, N., Matsuda, M., et Kubo, I. "Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids." Food chemistry 131(2): 541-545.
- McCord, J. M. (1995). "Superoxide Radical: Controversies, Contradictions, and Paradoxes." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 209(2): 112-117.
- Mejias, L., Reihmann, M. H., Sepulveda-Boza, S., & Ritter, H. (2002). "New polymers from natural phenols using horseradish or soybean peroxidase." Macromolecular Bioscience 2: 24-32.
- Middleton E. et G. Drzewiecki (1984). "Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents." Biochemical Pharmacology 33(21): 3333-3338.

- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). "The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer." Pharmacological Reviews **52**(4): 673-751.
- Mila I. et Scalbert A. (1994). "Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: a new hypothesis." International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance **381**(2): 749- 755.
- Milane H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Strasbourg, Université de Louis Pasteur. **Thèse de doctorat**: 13-36.
- Mishra, K., Ojha, H., et Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food chemistry, **130**(4), 1036-1043
- Mita, N., Tawaki, S. I., Uyama, H., et Kobayashi, S. (2003). "Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenols." Macromolecular Bioscience **3**(5): 253-257.
- Mita, N., S. I. Tawaki, et al. (2003). "Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenols." Macromolecular Bioscience **3**: 253-257.
- Mladeanka, P., Macakovà, K., Filipisky, T., Zatloukalova, L., Jahodar, L., Bovicelli, P., Silvestri, P., Hrdina, R. et Saso, L. (2011). "In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids." Journal of Inorganic Biochemistry **105**(5): 693-701.
- Mompon, B., Mengal, P. et Surbled, M. (1996). Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle. Bordeaux, in Polyphenols.
- Montoro, P., Braca, A., Pizza, C. et De Tommasi, N. (2005). Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. Food chemistry, **92**(2), 349-355
- Mookerjee, B. K., Lee, T. P., Logue, G. P., Lippes, H. A., et Middleton, E. (1986). "Effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses." Journal Name: Prog. Clin. Biol. Res.; (United States): Medium: X; Size: Pages: 511-520.
- Moon, Y. J., Wang, X., et Morris, M. E. (2006). "Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism." Toxicology in Vitro **20**(2): 187-210.
- Morikawa, T., Sueyoshi, M., Chaipech, S., Matsuda, H., Nomura, Y., Yabe, M., Matsumoto, T., Ninomiya, K., Yoshikawa, M., Pongpiriyadacha, Y., Hayakawa, T., et Muraoka, O. (2012) "Suppressive effects of coumarins from *Mammea siamensis* on inducible nitric oxide synthase expression in RAW264.7 cells." Bioorganic & Medicinal
- Morpurgo, L., Graziani, M. T., Finazzi-Agrò, A., Rotilio, G., et Mondovì, B. (1980). "Optical properties of japanese-lacquer-tree (*Rhus vernicifera*) laccase depleted of type 2 copper(II). Involvement of type-2 copper(II) in the 330nm chromophore." Biochem Journal **187**: 361-366.
- Morris, C. J., Earl, J. R., Trenam, C. W., & Blake, D. R. (1995). "Reactive oxygen species and iron- dangerous partnership in inflammation." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **27**(2): 109-122.
- Morris, D. L. et J. B. Ward (1992). "Coumarin inhibits micronuclei formation induced by benzo(a)pyrene in male but not female ICR mice." Environmental and Molecular Mutagenesis **19**(2): 132-138.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, **65**(1-2), 55-63
- Mucsi, I. et B. M. Prágai (1985). "Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids." Cellular and Molecular Life Sciences **41**(7): 930-931.

Murat-Bilgin, H., Atmaca, M., Deniz Obay, B., Aekinci, S., Tademir, E., et Ketani, A. (2011). Protective effects of coumarin and coumarin derivatives against carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. Experimental and Toxicologic Pathology, **63**(4), 325-330

N

Nabid, M. R., Zamiraei, Z., Sedghi, R., et Nazari, S. (2010). "Synthesis and characterization of poly(catechol) catalyzed by porphyrin and enzyme." Polymer Bulletin **64**(9): 855-865.

Nagarajan S, Santhosh P, Sankarasubramanian M, Vasudevan T, Gopalan A et Lee K-P. UV-spectroscopy for following the kinetics of homogeneous polymerization of diphenylamine in p-toluene sulphonic acid. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2005;62:420-30.

Nakajima, N., Ishihara, K., Itoh, T., Furuya, T., et Hamada, H. (1999). "Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments." Journal of Bioscience and Bioengineering **87**: 105-107.

National Toxicology Program. (1992). Toxicology and carcinogenesis studies of coumarin (CAS No. 91-64-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice. , Research Triangle Park, CA: US Department of Health and Human Services.

National Toxicology Program. (1993). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Coumarin (CAS No. 91-64-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). US Department of Health and Human Services, NIH, Research Triangle Park, NC.

Nauck, M. A. (1998). "Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective." Acta Diabetologica **35**(3): 117-129.

Nayak, P. L. (1998). "Enzyme-catalyzed polymerization: an opportunity for innovation." Designed Monomers and Polymers **1**(3): 259-284.

Ncanana, S., Baratto, L., Roncaglia, L., Riva, S., et Burton, S. G. (2007). "Laccase-mediated oxidation of totarol." Advanced Synthesis & Catalysis **349**: 1507-1513.

Nguyen, M. T. T., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, Q. L., Watanabe, H., et Kadota, S. (2004). Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Vietnamese Medicinal Plants. Biological and Pharmaceutical Bulletin, **27**(9), 1414-1421

Nijhoff W. A., Bosboom, M. A., Smidt, M. H., & Peters, W. H. (1995). "Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by alphaangelicalactone and flavone." The Netherlands Carcinogenesis **16**(3): 607-612.

Nijveldt, Van Nood, E., Van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., Van Norren, K., et Van Leeuwen, P. A. M. (2001). "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications." The American Journal of Clinical Nutrition **74**(4): 418-425.

Nugroho, P. E., Kudanga, T., Astergaard, L., Rencoret, J., Gutierrez, A., Del Rao, J., Ignacio, S., Nieto, L., Jimenez-Barbero, J., Martinez, A., Li, J., Gellerstedt, G., Lepifre, S., Silva, C., Kim, S. Y., Cavaco-Paulo, A., Seljebakken Klausen, B., Lutnaes, B. F., Nyanhongo, G. S., et Guebitz, G. M. (2010). "Polymerization of lignosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility." Bioresource Technology **101**(14): 5054-5062.

O

- Obermeier, M. T., White, R. E., & Yang, C. S. (1995). "Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities." *Xenobiotica* **25**(6): 575-584.
- Oguchi, T., Tawaki, S., Uyama, H., & Kobayashi, S. (2000). "Enzymatic Synthesis of Soluble Polyphenol." *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **73**: 1389-1396.
- Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., & Barrett, J. F. (1993). "DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1)." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **3**(2): 225-230.
- Omura, T. (1961). "Studies on Laccases of Lacquer Trees." *Journal of Biochemistry* **50**(3): 264-272.
- Ono, K. et H. Nakane (1990). "Mechanisms of Inhibition of Various Cellular DNA and RNA Polymerases by Several Flavonoids." *Journal of Biochemistry* **108**(4): 609-613.
- Opdyke, D. L. J. (1974). "Monographs on fragrance raw materials: coumarin." *Food and Cosmetics Toxicology* **12**: 385-388.
- Osiadacz, J., Al-Adhami, A. J. H., Bajraszewska, D., Fischer, P., et Peczynska-Czoch, W. (1999). "On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore." *Journal of Biotechnology* **72**(1-2): 141-149.

P

- Pabon, A., Lopera, T., Carmona, J., et Blair, S. (2001). Evaluation of mutagenic activity of several antimalarial extracts from *eupatorium inulaefolium*. *Pharmazie*, **56**, 412 – 414.
- Papinutti, L., Dimitriu, P., et Forchiassin, F. (2008). "Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases." *Bioresource Technology* **99**(2): 419-424.
- Pannala, A., Chan, T. S., O'Brien, P. J., et Rice-Evans, C. A. (2001). Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **282**(5), 1161-1168
- Paradkar, V. M. et Dordick J. S. (1994). "Aqueous-like activity of alpha-chymotrypsin dissolved in nearly anhydrous organic solvents." *Journal of the American Chemical Society* **116**: 5009-5014.
- Paradkar, V. M. et Dordick J. S. (1994). "Mechanism of extraction of chymotrypsin into iso-octane at very low concentrations of aerosol OT in the absence of reversed micelles." *Biotechnology and Bioengineering* **43**(6): 529-540.
- Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C., et Kefalas, P. (2000). Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **44**(3), 507-512
- Pavlin, M., V. Leben, V., et Miklavcic, D. (2007). "Electroporation in dense cell suspension-Theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization." *Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects* **1770**(1): 12-23.
- Paya, M., Halliwell, B., et Hoult, J. R. S. (1992). Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochemical Pharmacology*, **44**(2), 205-214
- Parsonage, E., Peppas, N. A., et Lee, P. I. (1987). Properties of positive resists. II. Dissolution characteristics of irradiated poly(methyl methacrylate) and poly(methyl methacrylate-

- co-maleic anhydride). Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures, **5**(2), 538-545
- Pedersen, J. Z., Oliveira, C., Incerpi, S., Kumar, V., Fiore, A. M., De Vito, P., Prasad, A. K., Malhotra, S. V., Parmar, V. S., et Saso, L. (2007). Antioxidant activity of 4-methylcoumarins. Journal of Pharmacy and Pharmacology, **59**(12), 1721-1728
- Perrier, E., Mariotte, A. M., Boumendjel, A., & Bresson-Rival, D. (1998). Nouveaux esters de flavonoïdes, leur utilisation en cosmétique, dermatopharmacie, en pharmacie et en agroalimentaire. **FR2778663 (A1)**.
- Pietta, P.G. (2000). "Flavonoids as Antioxidants." Journal of Natural Products **63**(7): 1035-1042.
- Pilz, R. P., E. H. Hammer, E. H., Schauer, F. S., et Kragl, U. K. (2003). "Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors." Applied Microbiology and Biotechnology **60**(6): 708-712.
- Pinelo, M., Manzocco, L., José Nunez, M., et Cristina Nicoli, M. (2004). "Solvent effect on quercetin antioxidant capacity." Food chemistry **88**(2): 201-207.
- Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieris, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Schreier, P., et Scheller, C. (2007). Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. Archives of Biochemistry and Biophysics, **460**(1), 1-9
- Preat, J., Jacquemin, D., et Perpate, E. A. (2005). "Theoretical investigations of the UV spectra of coumarin derivatives." Chemical Physics Letters **415**(1-3): 20-24
- Puppo, A. (1992). Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by fenton-type reactions; influence of the iron chelator. Phytochemistry, **31**(1), 85-88.

Q

- Qiu, H., Xu, C., Huang, X., Ding, Y., Qu, Y., et Gao, P. (2009). "Immobilization of Laccase on Nanoporous Gold: Comparative Studies on the Immobilization Strategies and the Particle Size Effects." The Journal of Physical Chemistry C **113**(6): 2521-2525.

R

- Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D. A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J. M., Cornwell, T., Pastor, I., et Fridlender, B. (2002). "Plants and human health in the twenty-first century." Trends in Biotechnology **20**(12): 522-531.
- Rausher, R., Edenharder, R., et Platt, K. L. (1998). In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. Mutation research, **413**, 129-142
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., et Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, **26**(9-10), 1231-1237
- Rechner, A. R., Spencer, J. P. E., Kuhnle, G., Hahn, U., et Rice-Evans, C. A. (2001). "Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo." Free Radical Biology and Medicine **30**(11): 1213-1222.
- Reihmann, M. H. et H. Ritter (2001). "Oxidative Copolymerisation of para-Functionalized Phenols Catalyzed by Horseradish peroxidase and Thermocrosslinking via Diels-Alder and (1+3) Cycloaddition." Macromolecular Bioscience **1**(3): 85-90.

- Ribeiro, M. E. N. P., Vieira, A. G. P., Cavalcante, I. M., Ricardo, N. M. P. S., Attwood, D., Yeates, S. G., et Booth, C. (2009). "Solubilisation of griseofulvin, quercetin and rutin in micellar formulations of triblock copolymers E62P39E62 and E137S18E137." International Journal of Pharmaceutics **378**(1-2): 211-214.
- Rice-Evans, C. (2001). "Flavonoid as Antioxidants." Current medicinal chemistry **8**: 797-807.
- Riva, S. (2006). "Laccases: blue enzymes for green chemistry." Trends in Biotechnology **24**(5): 219-226.
- Rogalski, J., Jozwik, E., Hatakka, A., et Leonowicz, A. (1995). "Immobilization of laccase from *Phlebia radiata* on controlled porosity glass." Journal of Molecular Catalysis A: Chemical **95**(1): 99-108.
- Romero, I., Páez, A., Ferruelo, A., Luján, M., et Berenguer, A. (2002). Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells. BJU International, **89**(9), 950-954
- Roubaty, J.-L., Bréant, M., Lavergne, M., et Revillon, A. (1978). "Mechanism of the oxidative coupling of phenols: Influence of pH upon the electrochemical oxidation of xylenol in methanol." Die Makromolekulare Chemie **179**(5): 1151-1157.
- Rundles, R. W., Bréant, M., Lavergne, M., et Revillon, A. (1966). "Allopurinol in the treatment of gout." Annals of Internal Medicine **64**: 229-258.

S

- Sadik, C. D., Sies, H., & Schewe, T. (2003). "Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action." Biochemical Pharmacology **65**(5): 773-781.
- Sahoo, S. K., Liu, W., Samuelson, L. A., Kumar, J., et Cholli, A. L. (2002). "Biocatalytic Polymerization of p-Cresol: An in-Situ NMR Approach To Understand the Coupling Mechanism." Macromolecules **35**(27): 9990-9998.
- Saidman, E., Yurquina, A., Rudyk, R., Molina, M. A. A., & Ferretti, F. H. (2002). "A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol." Journal of Molecular Structure: THEOCHEM **585**(1-3): 1-13.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Luisa Pellegrino, M., Tita, B., Messina, C., Bonina, F. P., Rocco, C., Nicolosi, G., & Castelli, F. (2003). "'In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **56**(2): 167-174.
- Saito, K., Kobayashi, M., Gong, Z., Tanaka, Y., et Yamazaki, M. (1999). "Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: Molecular cloning and functional expression of cDNA from a red form of *Perilla frutescens*." Plant Journal **17**(2): 181-189.
- Saki, M., Suzuki, M., NANJO, F., et HARA, Y. (1994). 3-O-acylated catechins and methods of producing same. **EP0618203**.
- Saleh, N. A. M. (1979). "The biosynthesis of flavonoid glycosides and their importance in chemosystematics." Biochemical Systematics and Ecology **7**(1): 37-45.
- Sato, M., H. Tsuchiya, H., Takase, I., Kureshiro, H., Tanigaki, S., et Iinuma, M. (1995). "Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics." Phytotherapy Research **9**(7): 509-512.

- Schrader, T. J., Cherry, W., Soper, K., Langlois, I., et Vijay, H. M. (2001). Examination of *Alternaria alternata* mutagenicity and effects of nitrosylation using the Ames Salmonella test. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, **21**(4), 261-274
- Schwengel, L., Fasolo, D., Holzschuh, M., Lula, I., Sinisterra, R., Koester, L., Teixeira, H., et Bassani, V. (2008). "Association of 3-O-methylquercetin with beta-cyclodextrin: complex preparation, characterization and ex vivo skin permeation studies." *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **62**(1): 149-159.
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., et Boudoukha, C. (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **54**(4), 313-318
- Sergediene, E., Jönsson, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Rietjens, I., et Cenas, N. (1999). "Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships." *FEBS Letters* **462**(3): 392-396.
- Serkedjjeva J, Ivancheva S (1998) Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *J Ethnopharmacol* **64** (1): 59-68
- Seyoum, A., Asres, K., et El-Fiky, F. K. (2006). "Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids." *Phytochemistry* **67**(18): 2058-2070.
- Sharma, P., Goel, R., et Capalash, N. (2007). "Bacterial laccases." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23**(6): 823-832.
- Shimoda, S. et Smela E. (1998). "The effect of pH on polymerization and volume change in PPy(DBS)." *Electrochimica Acta* **44**(2-3): 219-238.
- Shin JE, Kim JM, Bae EA, et al. (2005) *In vitro* inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. *Planta Med* **71** (3): 197-201
- Shleev, S., Jarosz-Wilkolazka, A., Khalunina, A., Morozova, O., Yaropolov, A., Ruzgas, T., et Gorton, L. (2005). "Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes." *Bioelectrochemistry* **67**(1): 115-124.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., et Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**(1), 184-191
- Smyth, T., Ramachandran, V. N., et Smyth, W. F. (2009). "A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins." *International Journal of Antimicrobial Agents* **33**(5): 421-426.
- Sokmen M, Angelova M, Krumova E, et al. (2005) *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sci* **76** (25): 2981-93
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., et Wichers, H. J. (2000). An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, **11**(5), 330-338
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., et Machonkin, T. E. (1996). "Multicopper Oxidases and Oxygenases." *Chemical Reviews* **96**(7): 2563-2606.
- Solomon, E. I., Chen, P., Metz, M., Lee, S.-K., et Palmer, A. E. (2001). "Oxygen Binding, Activation, and Reduction to Water by Copper Proteins." *Angewandte Chemie International Edition* **40**(24): 4570-4590.
- Solomon, E. I., Augustine, A. J., et Yoon, J. (2008). "O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases." *Dalton Transactions*(30): 3921-3932.
- Sovcikova, A., Mikulasova, M., Horakova, K., et Floch, L. (2001). "Antibacterial and mutagenic activities of new isothiocyanate derivatives". *Folia Microbiologica*, **46**(2), 113-117
- Spedding, G., A. Ratty, A., et Middleton Jr, E. (1989). "Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids." *Antiviral Research* **12**(2): 99-110.

- Sproll, C., Ruge, W, Andlauer, C., Godelmann, R., Lachenmeier, D.W. (2008). "HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods". Food Chemistry **109**(2): 462-469.
- Stagos, D., Amoutzias, G. D., Matakos, A., Spyrou, A., Tsatsakis, A. M., et Kouretas, D. (2012). "Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols". Food and Chemical Toxicology, **50**(6): 2155-2170
- Stanely Mainzen Prince, P., et Priya, S. (2010). "Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: Biochemical, histological and in vitro evidences". European Journal of Pharmacology, **649**(1-3), 229-235
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R. W., et Villanueva, A. (2012). "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets". Acta Histochemica, **114**(8), 785-796.
- Sun, T., Chen, Q. Y., Wu, L. J., Yao, X. M., et Sun, X. J. (2012). "Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer". Food and Chemical Toxicology, **50**(10), 3462-3467.
- Symonds, P., Clifford Murray, J., Christy Hunter, A., Debska, G., Szewczyk, A., Moein Moghimi, S. "Low and high molecular weight poly(l-lysine)s/poly(l-lysine)-DNA complexes initiate mitochondrial-mediated apoptosis differently". FEBS Letters. **579** : 6191-6198.

T

- Taguri T, Tanaka T, Kouno I (2004) Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol Pharm Bull **27** (12): 1965-9
- Takahashi T, Kokubo R, Sakaino M (2004) Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. Lett Appl Microbiol **39** (1): 60-4
- Takano, Y., Hase-Aoki, K., Horiuchi, H., Zhao, L., Kasahara, Y., Kondo, S., et Becker, M. A. (2005). Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. Life Sciences, **76**(16), 1835-1847
- Teel, R. W., et Castonguay, A. (1992). Antimutagenic effects of polyphenolic compounds. Cancer Letters, **66**(2), 107-113
- Thornes, D., Daly, L., Lynch, G., Browne, H., Tanner, A., Keane, F., O'Loughlin, S., Corrigan, T., Daly, P., & Edwards, G. (1989). "Prevention of early recurrence of high risk malignant melanoma by coumarin." European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology **15**(5): 431-435.
- Tian, X., Li, F., Zhu, L., & Ye, B. (2008). Study on the electrochemical behavior of anticancer herbal drug rutin and its interaction with DNA. Journal of Electroanalytical Chemistry, **621**(1), 1-6
- Tischer, W. (1999). "Immobilized Enzymes: Methods and Applications." Topics in Current Chemistry **200**: 96-126.
- Tonami, H., Uyama, H., Kobayashi, S., Fujita, T., Taguchi, Y., et Osada, K. (2000). "Chemoselective oxidative polymerization of m-ethynylphenol by peroxidase catalyst to a new reactive polyphenol." Biomacromolecules **1**(2): 149-151.
- Torres, R., Faini, F., Modak, B., Urbina, F., Labba, C., et Guerrero, J. (2006). Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. Phytochemistry, **67**(10), 984-987
- Tseitlin, G., Beksaev, S., & Medzhitov, D. (2006). "Enzymatic polymerization of phenols." Polymer Science Series A **48**(8): 798-802.

U

- Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., et Uwajima, T. (2001). "Polymerization of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*." Biochemical and Biophysical Research Communications **287**: 355-358.
- Uyama, H., Kurioka, H., et Kobayashi, S. (1997). "Novel bienzymatic catalysis system for oxidative polymerization of phenols." Polymer Journal **29**(2): 190-192.
- Uyama, H., Kobayashi, S., Ritter, H., et Kaplan, D. (2006). Enzymatic Synthesis and Properties of Polymers from Polyphenols Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers, Springer Berlin / Heidelberg. **194**: 51-67.
- Uzan, E., Lubrano, C., Milesi, S., Favel, A., Lesage-Meessen, L., et Lomascolo, A. (2011). "Pycnoporus laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications." Applied Microbiology and Biotechnology **90**(1): 97-105.

V

- Valentéo, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., et Bastos, M. L. (2002). Antioxidative Properties of Cardoon (*Cynara cardunculus* L.) Infusion Against Superoxide Radical, Hydroxyl Radical, and Hypochlorous Acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **50**(17), 4989-4993
- Van Acker, S. A. B. E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M. I. N. J. L., Griffioen, D. s. e. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J. F., et Bast, A (1996). "Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids." Free Radical Biology and Medicine **20**(3): 331-342.
- Van Hoorn, D. E. C., Nijveldt, R. J., Van Leeuwen, P. A. M., Hofman, Z., M'Rabet, L., De Bont, D. B. A., & Van Norren, K. (2002). "Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids." European Journal of Pharmacology **451**(2): 111-118.
- Velozo, L. S. M., Ferreira, M. J. P., Santos, M. I. S., Moreira, D. L., GuimarÃães, E. F., Emerenciano, V. P., & Kaplan, M. A. C. (2009). "C-glycosyl flavones from *Peperomia blanda*." Fitoterapia **80**(2): 119-122.
- Verma, A. K., Ferreira, M. J. P., Santos, M. I. S., Moreira, D. L., GuimarÃães, E. F., Emerenciano, V. P., et Kaplan, M. A. C. (1988). "Inhibition of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene- and N-Nitrosomethylurea-induced Rat Mammary Cancer by Dietary Flavonol Quercetin." Cancer Research **48**(20): 5754-5758.
- Villar A, Gasco MA, Alcaraz MJ (1987) Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. J Pharm Pharmacol **39** (7): 502-7
- Viskupicova, J., Ondrejovic, M., et Sturdik, E. (2009). "The potential and practical applications of acylated flavonoids." Pharmazie **64**(6): 355-360.
- Vogel, A. (1820). "Darstellung von Benzoesäure aus der Tonka-Bohne und aus den Meliloten - oder Steinklee - Blumen." Annalen der Physik **64**(2): 161-166.
- Vrijssen, R., Everaert, L., Van Hoof, L. M., Vlietinck, A. J., Vanden Berghe, D. A., & Boeya, A. (1987). "The poliovirus-induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis." Antiviral Research **7**(1): 35-42.

W

- Walle, T. (2004). "Absorption and metabolism of flavonoids." Free Radical Biology and Medicine **36**(7): 829-837.
- Wang, D., Tang, W., Yang, G.M., et Cai, B.C. (2006). "Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge." Chinese Journal of Natural Medicines **8**(6): 461-465.
- Watts, K. T., Lee, et Schmidt-Dannert, C. (2004). "Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*." ChemBioChem **5**(4): 500-507.
- Williams, C. A. et Grayer R. J. (2004). "Anthocyanins and other flavonoids." Natural Product Reports **21**(4): 539-573.
- Williamson, G., Day, A. J., Plumb, W., et Couteau, D. (2000). "Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates." Biochemical Society Transactions **28**: 16-22.
- Winkel-Shirley, B. (2002). "Biosynthesis of flavonoids and effects of stress." Current Opinion in Plant Biology **5**(3): 218-223.
- Winterbourn, C. C. (1991). Factors that influence the deoxyribose oxidation assay for fenton reaction products. Free Radical Biology and Medicine, **11**(4), 353-360
- Witayakran, S. et Ragauskas A. J. (2009). "Synthetic Applications of Laccase in Green Chemistry." Advanced Synthesis & Catalysis **351**(9): 1187-1209.

X

- Xu, F. (1997). "Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases." Journal of Biological Chemistry **272**(2): 924-928.

Y

- Yang, J., Guo, J., et Yuan, J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. LWT - Food Science and Technology, **41**(6), 1060-1066
- Yeh, G. C., Henderson, J. P., Byun, J., Andada, A., D., et Heinecke, J. W. (2003). 8-Nitroxanthine, a product of myeloperoxidase, peroxynitrite, and activated human neutrophils, enhances generation of superoxide by xanthine oxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics, **418**(1), 1-12
- Yoshida, H. (1883). "Chemistry of Lacquer (Urushi)." Journal of chemical society **43**: 472-486.
- Yoshida, T., Lu, R., Shuqin, H., Kazuyuki, H., Takahiro, K., Kei-Ichi, T., Kazutoshi, S., & Masamitsu, F. (2009). "Laccase-catalyzed polymerization of lignocatechol and affinity on proteins of resulting polymers." Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry **47**(3): 824-832.
- Young, J. L., Boswell, R. B., & Nies, A. S. (1974). "Severe allopurinol hypersensitivity. association withThiazides and Prior Renal Compromise." Archives of internal medicine **134**: 553-559.
- Yu, J.H. et A. Klivanov (2006). "Co-lyophilization with D-proline Greatly Enhances Peroxidase's Stereoselectivity in a Non-aqueous Medium." Biotechnology Letters **28**(8): 555-558.

Yu, W., Liu, Z.Q., et Liu, Z.L. (1999). Antioxidant effect of coumarin derivatives on free radical initiated and photosensitized peroxidation of linoleic acid in micelles. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions **2**(5), 969-974.

Z

Zani, F., Cuzzoni, M. T., Daglia, M., Benvenuti, S., Vampa, G., et Mazza, P. (1993). Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* by *Glycyrrhiza glabra* extract, glycyrrhizinic acid, 18 α - and 18 β -glycyrrhetic acids. Planta Medica, **59**, 502-507

Zhang, H.Y. et Wang L.F. (2004). "Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical." Journal of Molecular Structure: THEOCHEM **673**(1-3): 199-202.

Zuo, Z., Zhang, L., Zhou, L., Chang, Q., et Chow, M.. (2006). "Intestinal absorption of hawthorn flavonoids - in vitro, in situ and in vivo correlations." Life Sciences **79**(26): 2455-2462.

ANNEXE

Annexes

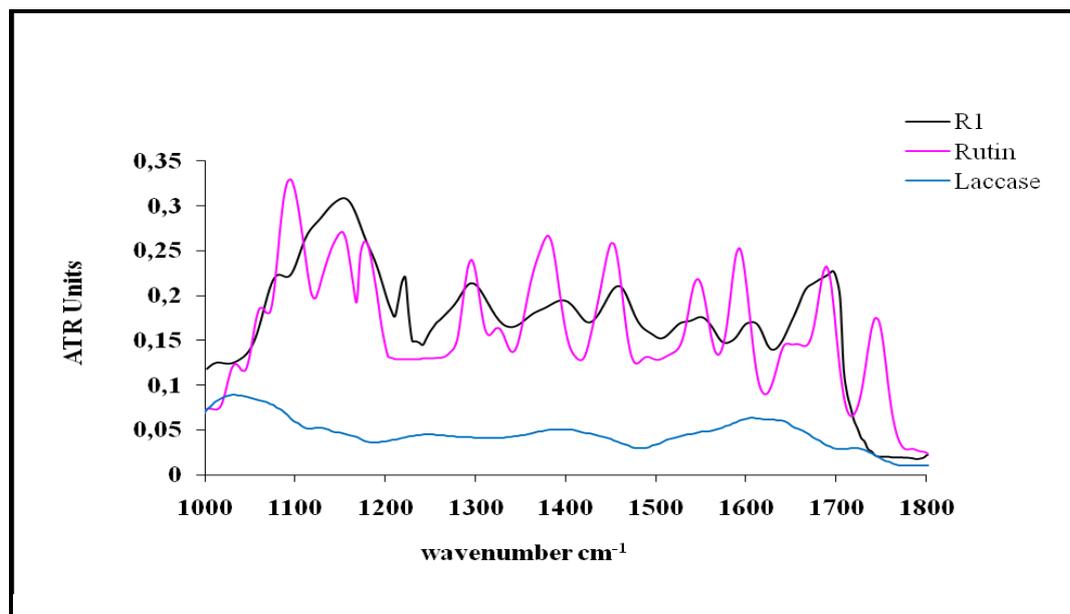


Figure 1. Spectre FTIR de la rutine, la fraction d'oligorutine R1 et la laccase.

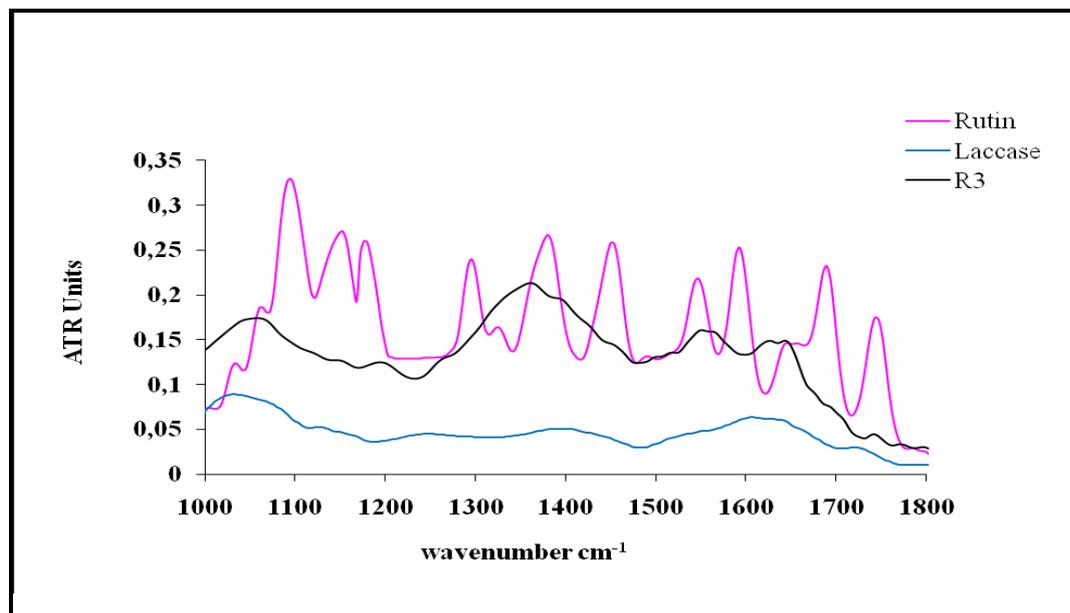


Figure 2. Spectre de la rutine, de la fraction d'oligorutine R3 et de la laccase.

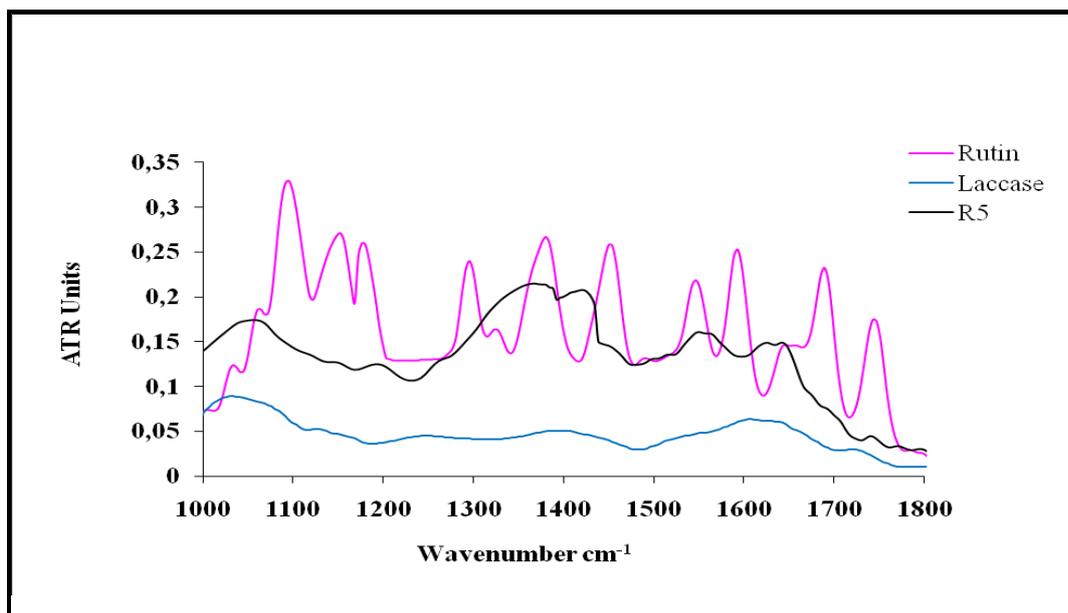


Figure 3. FTIR de la rutine, de la fraction d'oligorutine R5 et de la laccase.

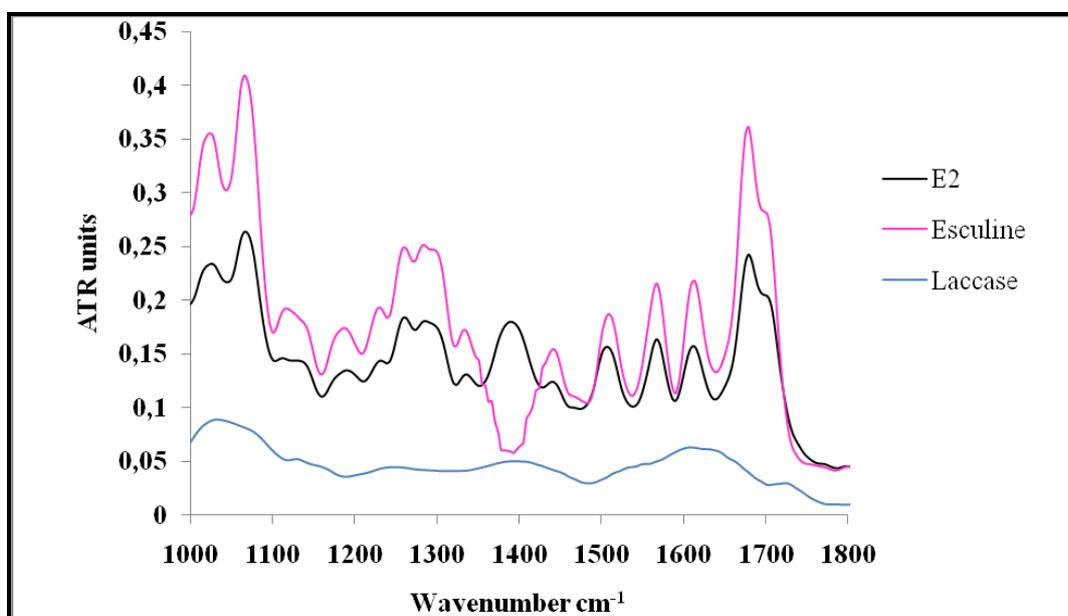


Figure 4. FTIR de l'esculine, de la fraction d'oligoesculine E2 et de la laccase.

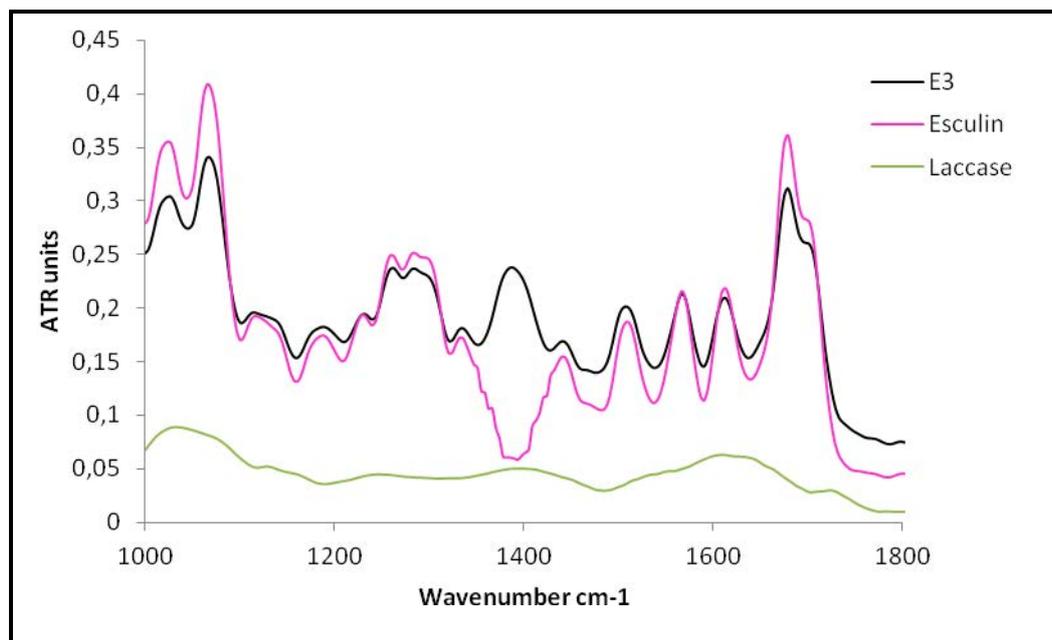


Figure 5. FTIR de l'esculine, de la fraction d'oligoesculine E3 et la laccase.

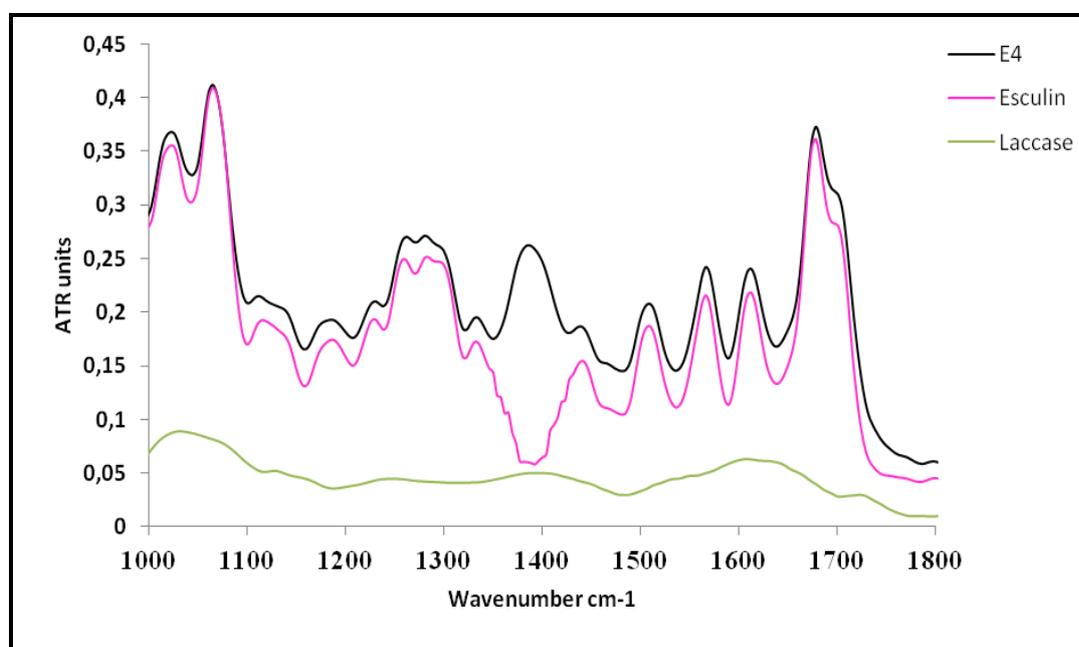


Figure 6. FTIR de l'esculine, de la fraction d'oligoesculine E4 et de la laccase.

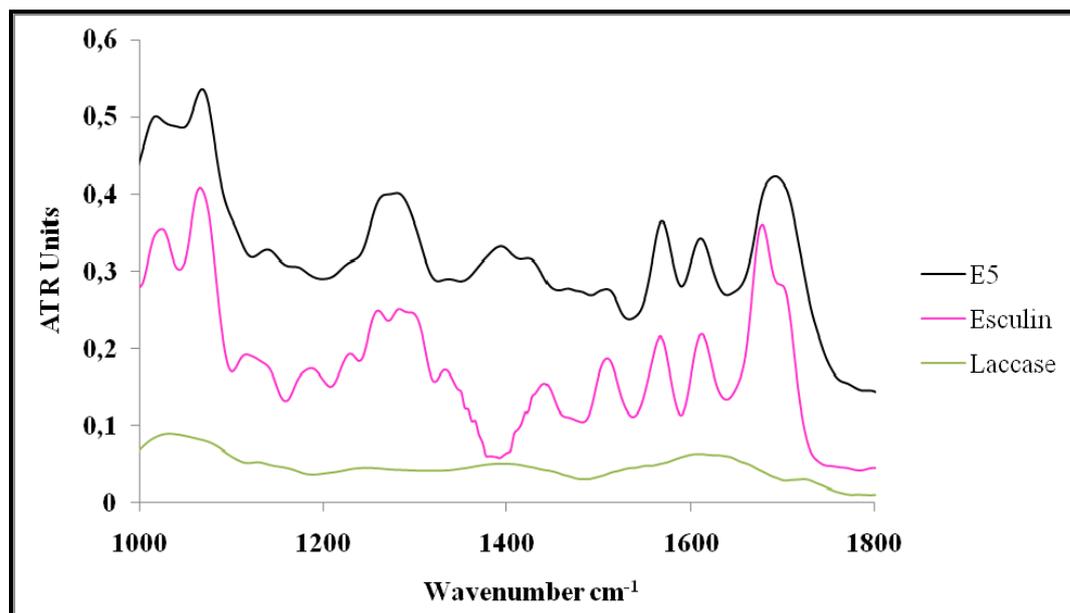


Figure 7. FTIR de l'esculine, de la fraction d'oligosculine E5 et de la laccase.

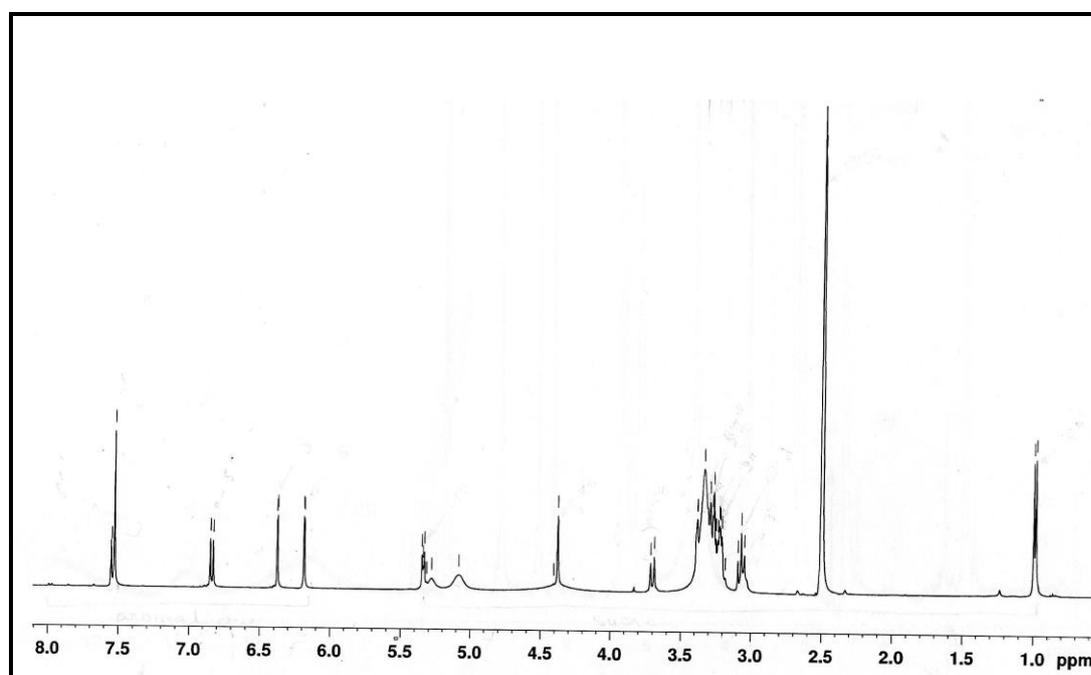


Figure 8. ^1H -RMN de la rutine

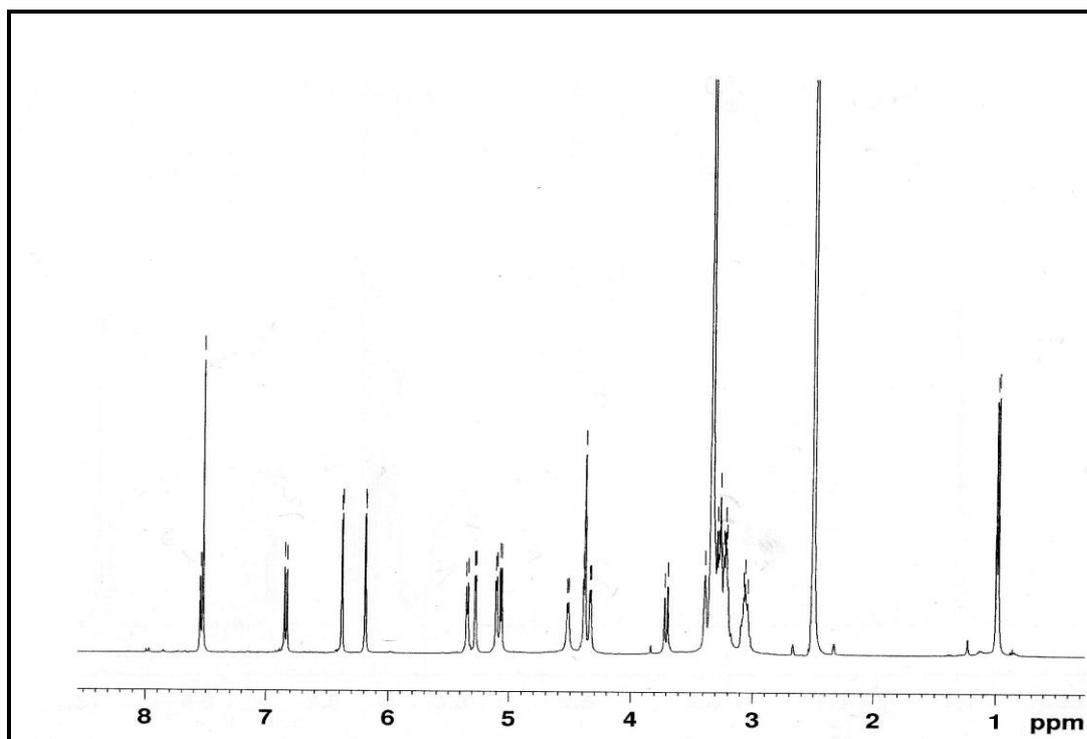


Figure 9. ^1H -RMN de la fraction d'oligorutin R2

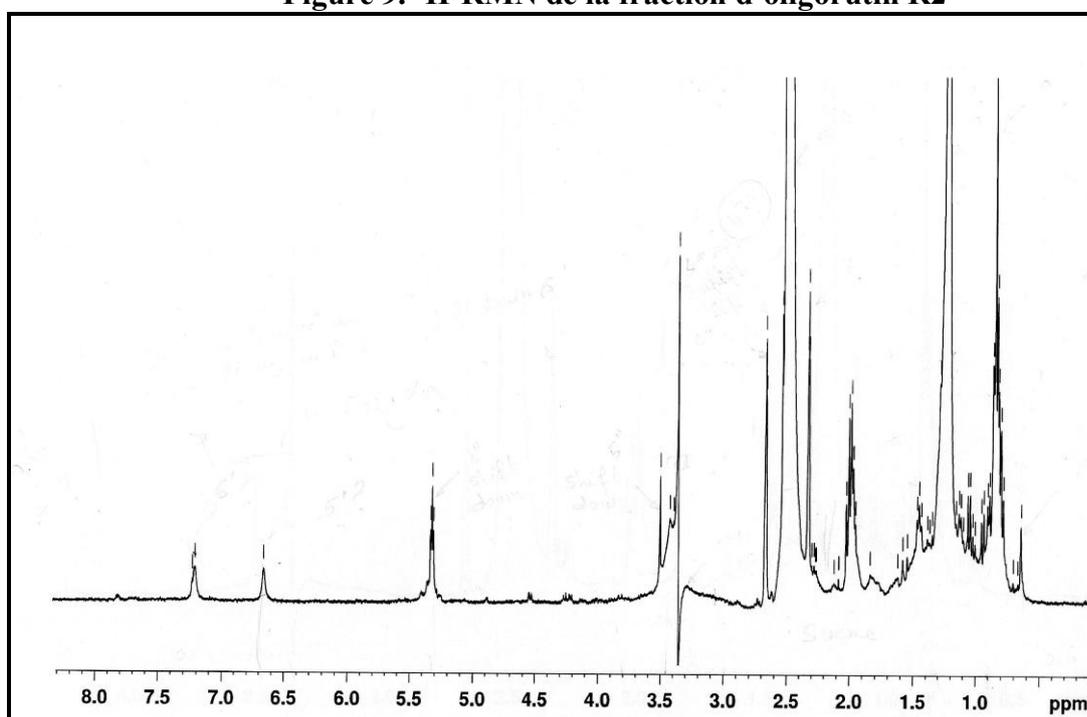


Figure 10. ^1H -RMN de la fraction d'oligorutine R3.

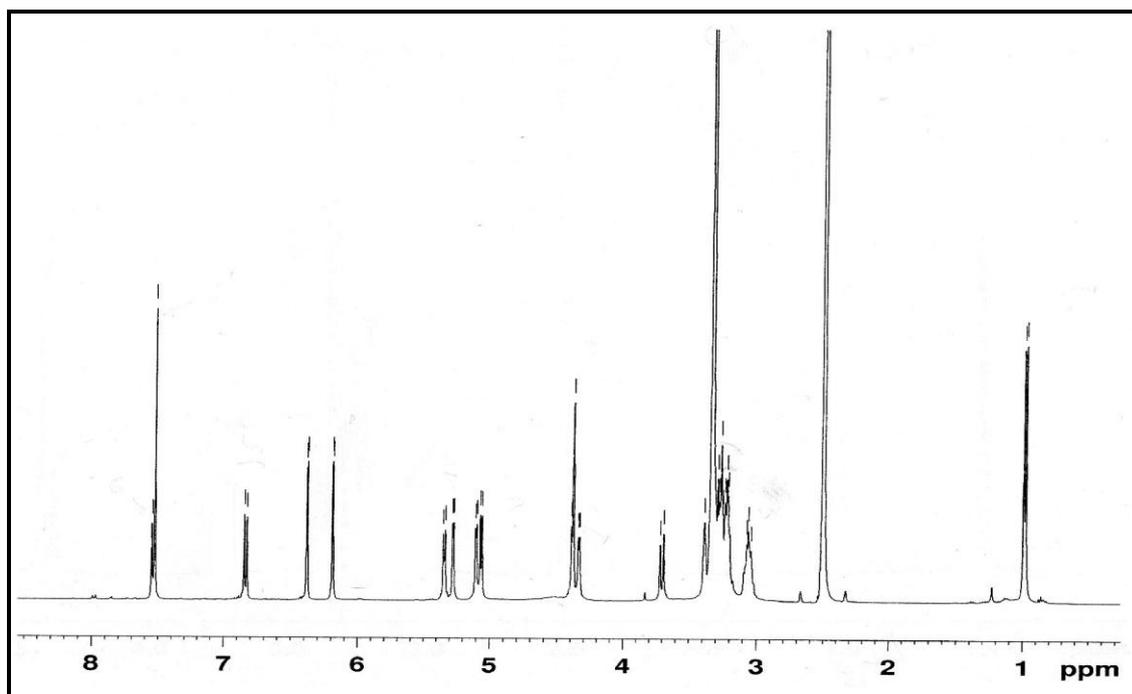


Figure 11. ^1H -RMN de la fraction d'oligorutine R5.

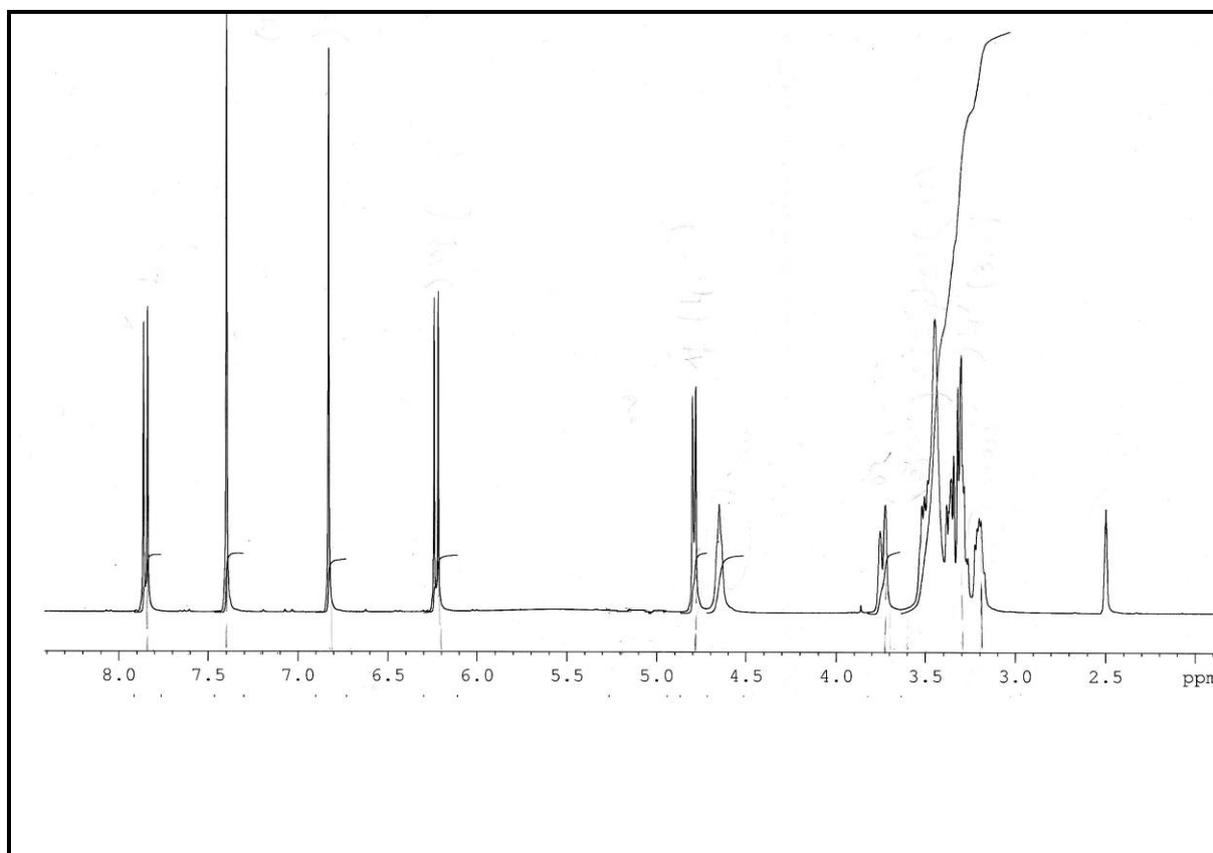


Figure 12. ^1H -RMN de l'esculine

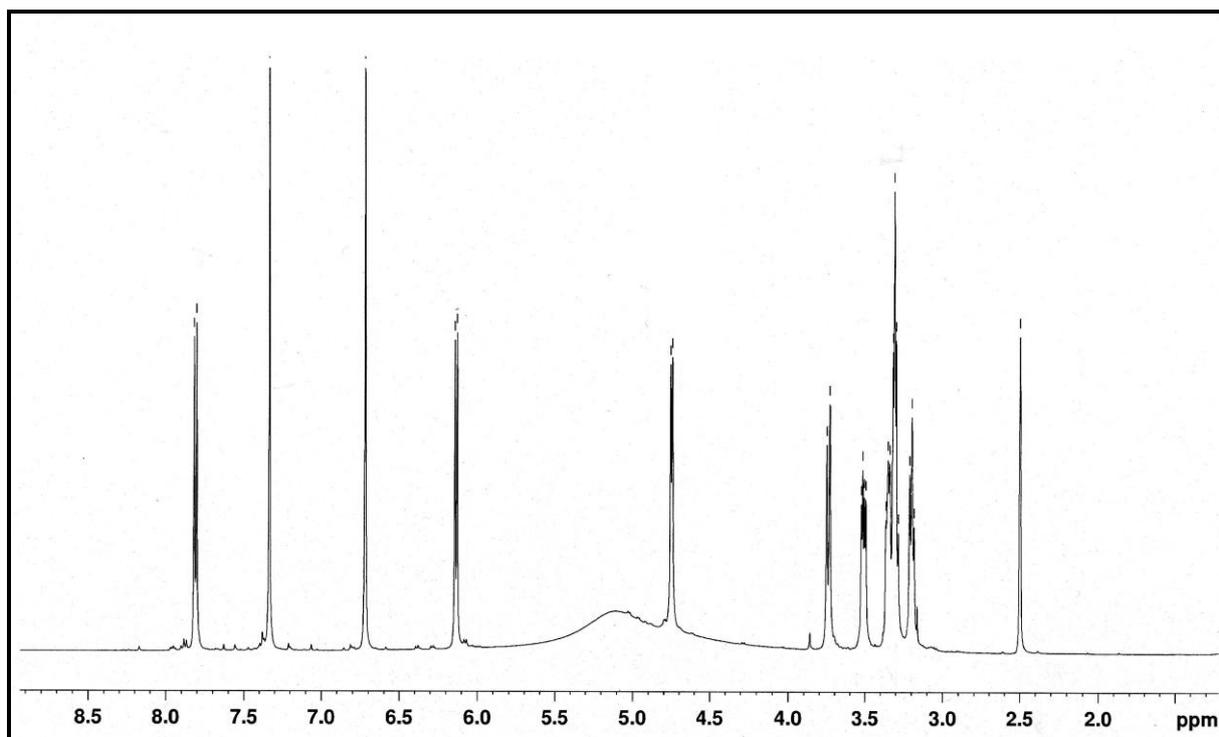


Figure 13. ^1H -RMN de la fraction d'oligosaccharine E2.

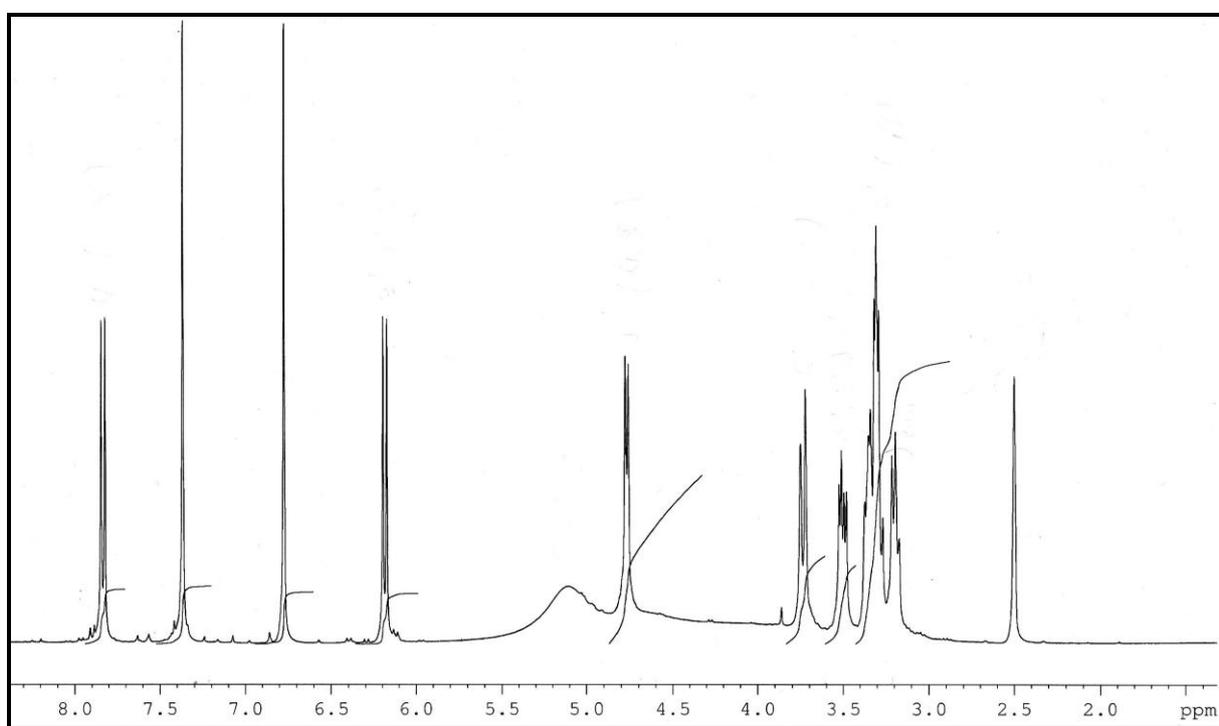


Figure 14. ^1H -RMN de la fraction d'oligosaccharine E3.

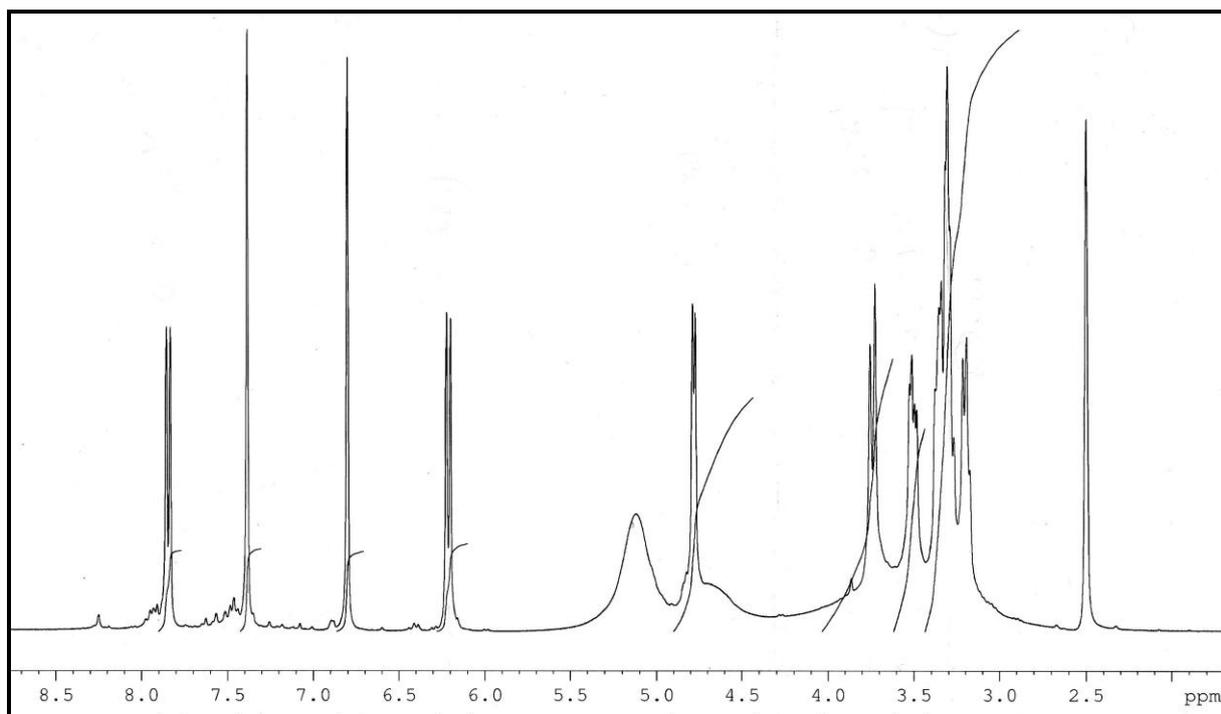


Figure 15. ^1H -RMN de la fraction d'oligosculine E4.

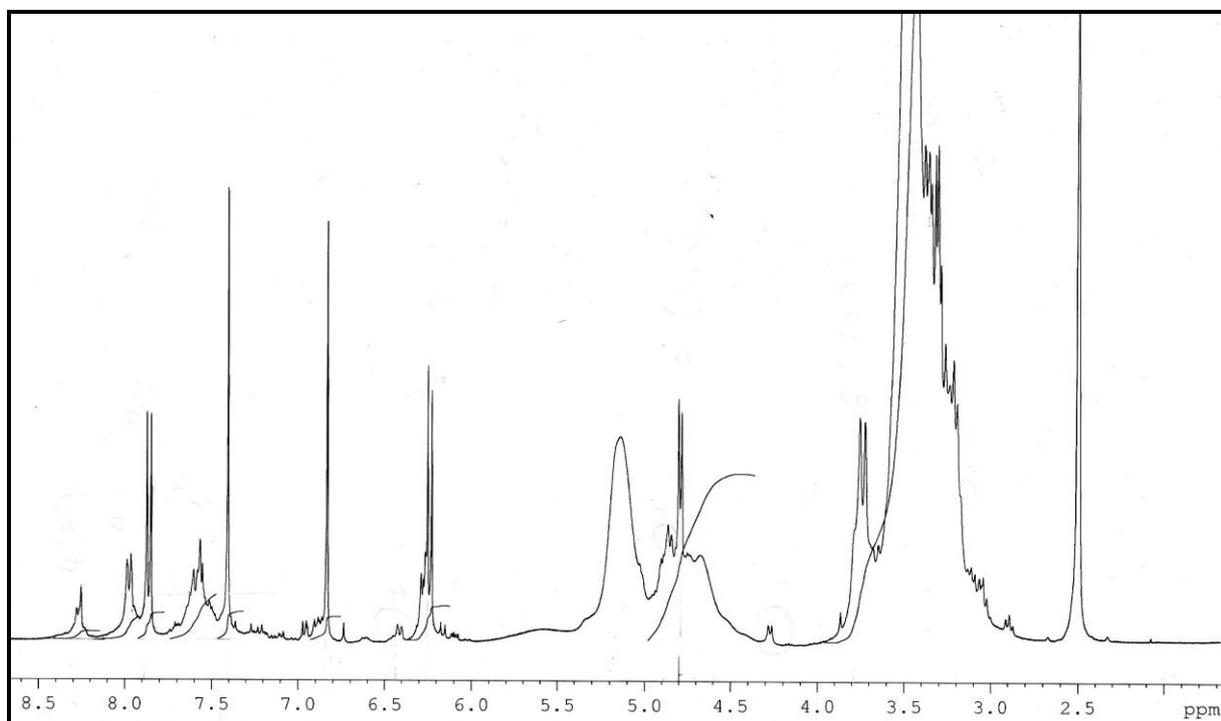


Figure 16. ^1H -RMN de la fraction d'oligosculine E5.

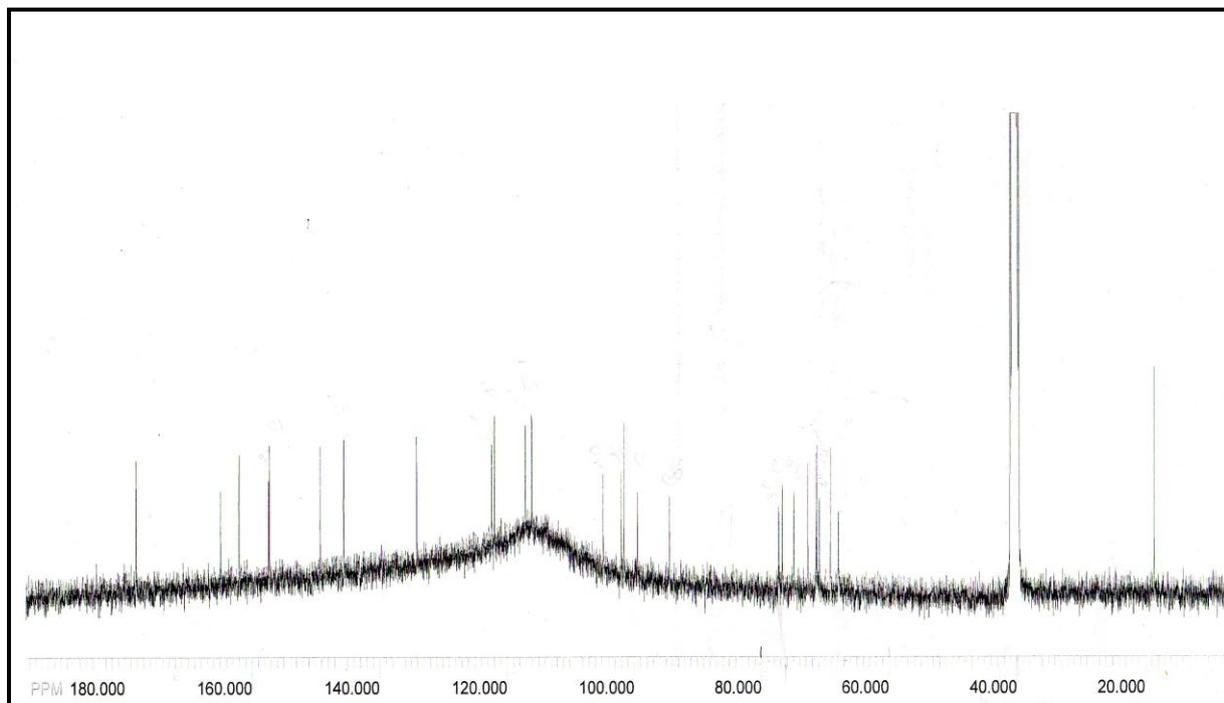


Figure 17. ^{13}C -RMN de la rutine

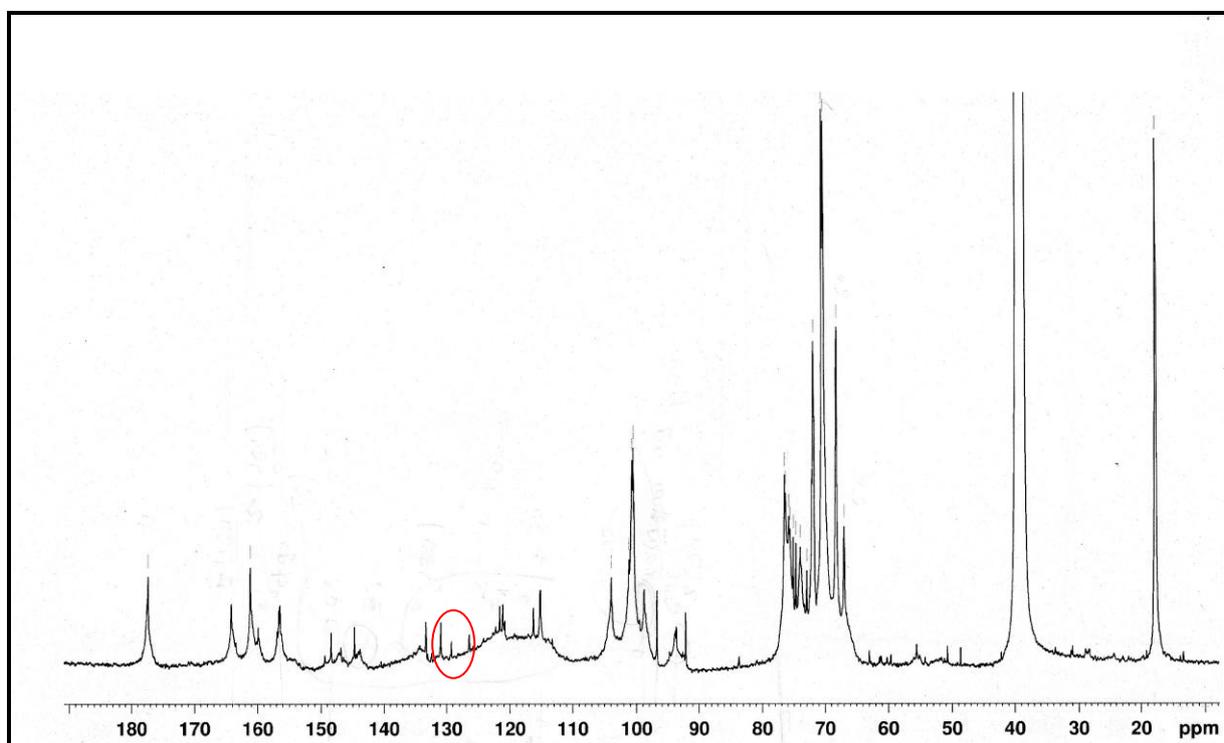


Figure 18. ^{13}C -RMN de la fraction d'oligorutine R2.

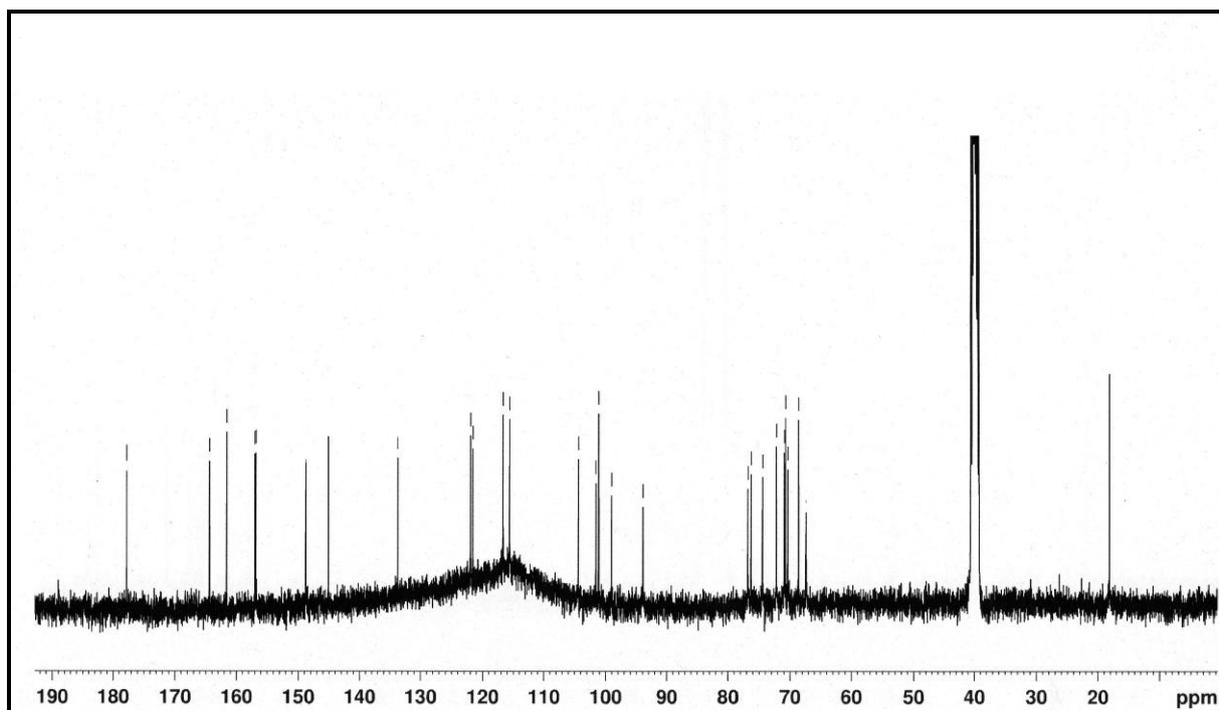


Figure 19. ^{13}C -RMN de la fraction d'oligorutine R3.

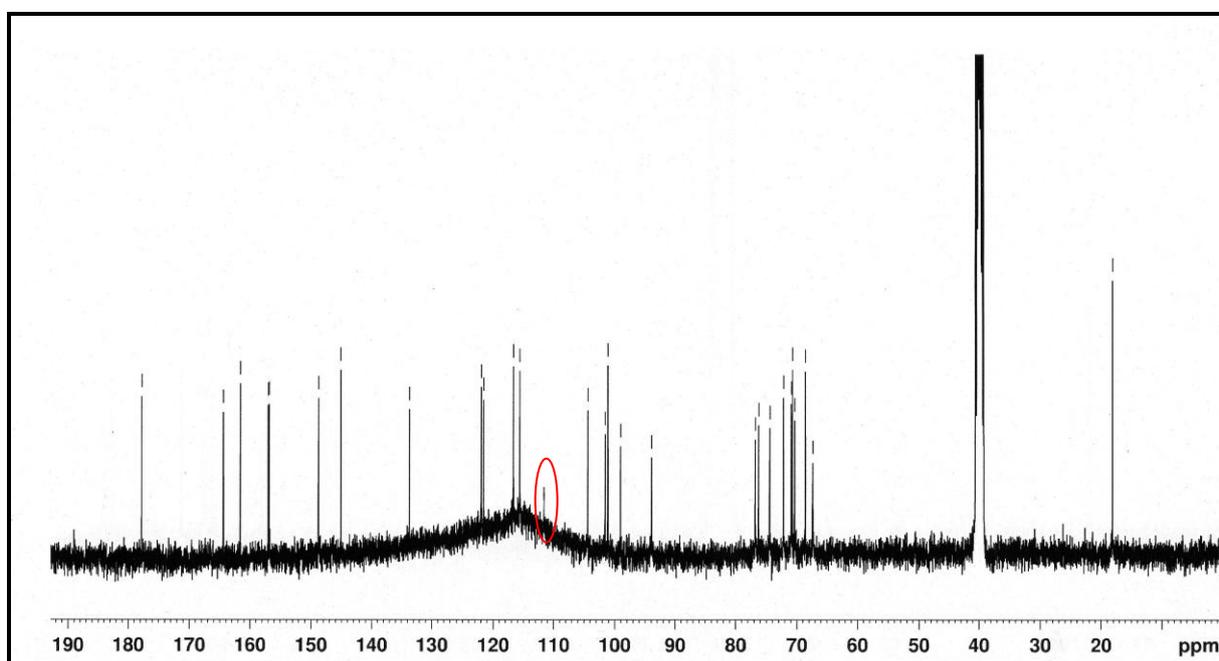
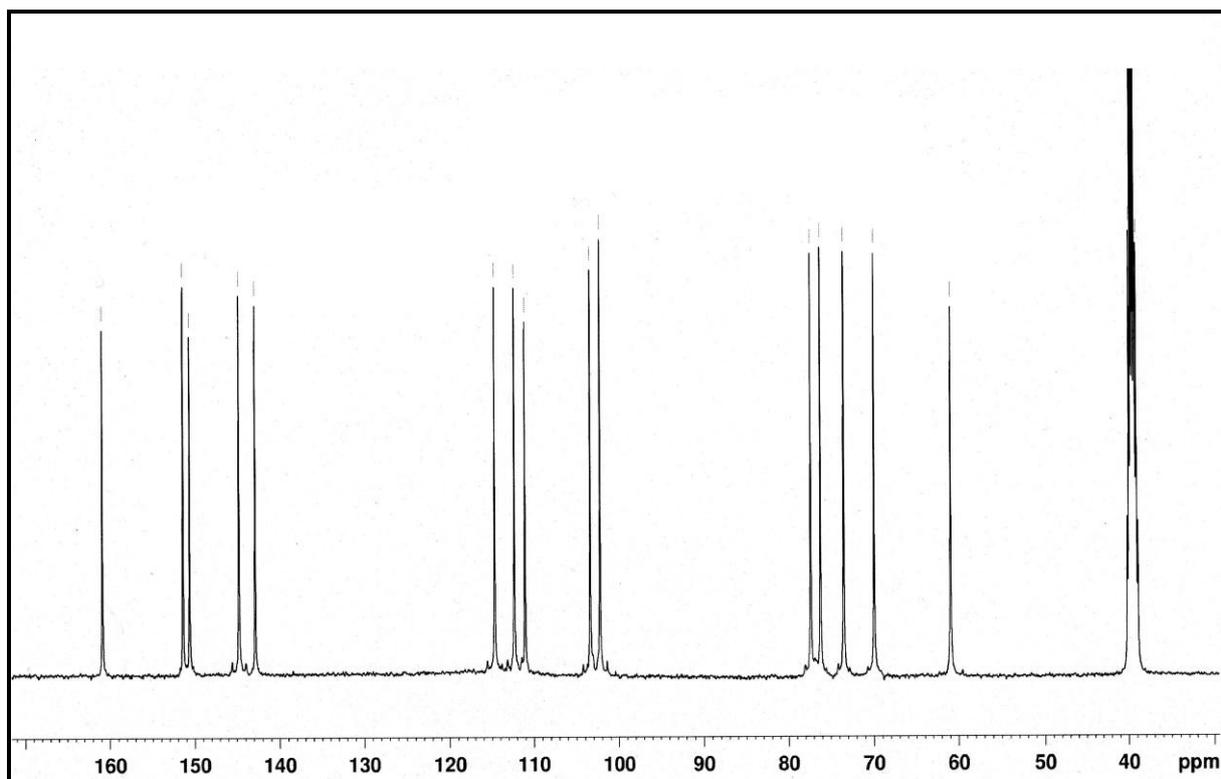
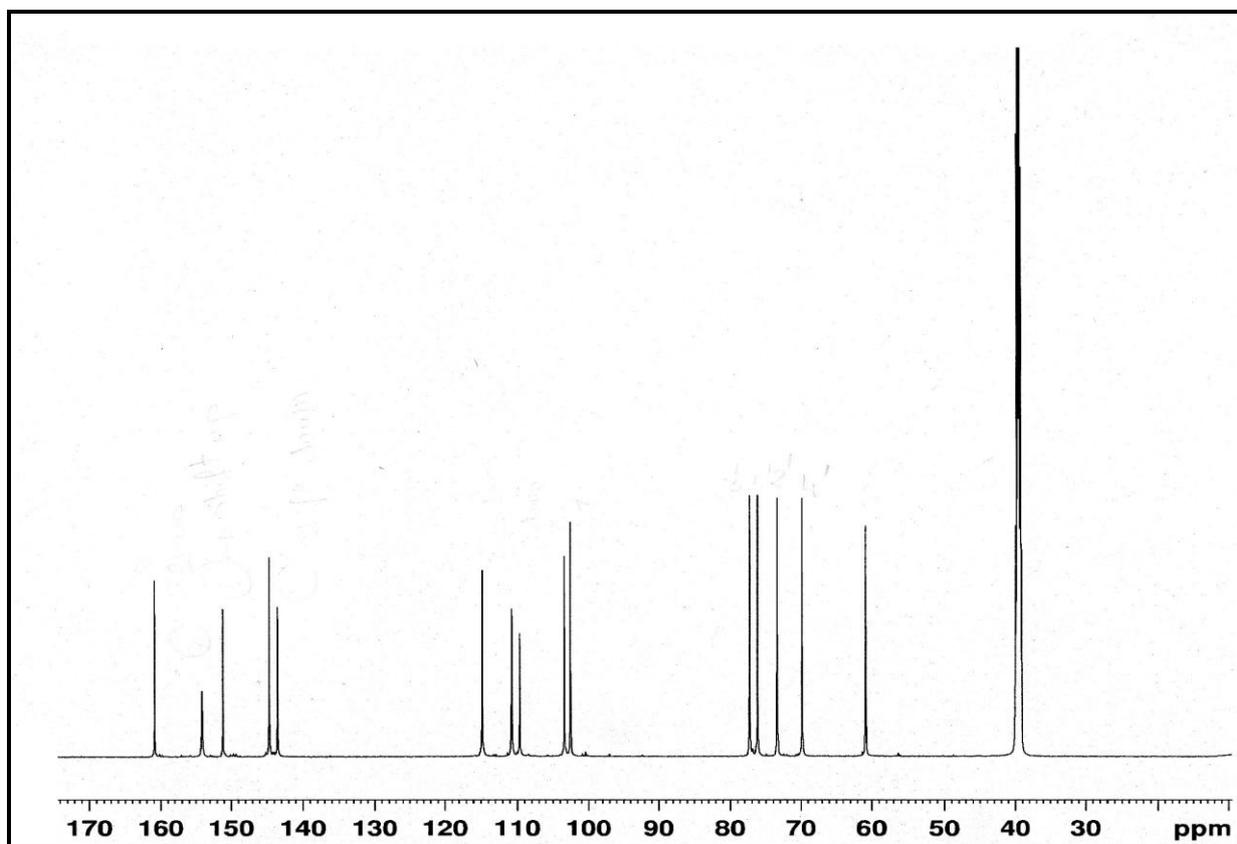


Figure 20. ^{13}C -RMN de la fraction d'oligorutine R5.

Figure 21. ^{13}C -RMN de l'esculineFigure 22. ^{13}C -RMN de la fraction d'oligoesculine E2.

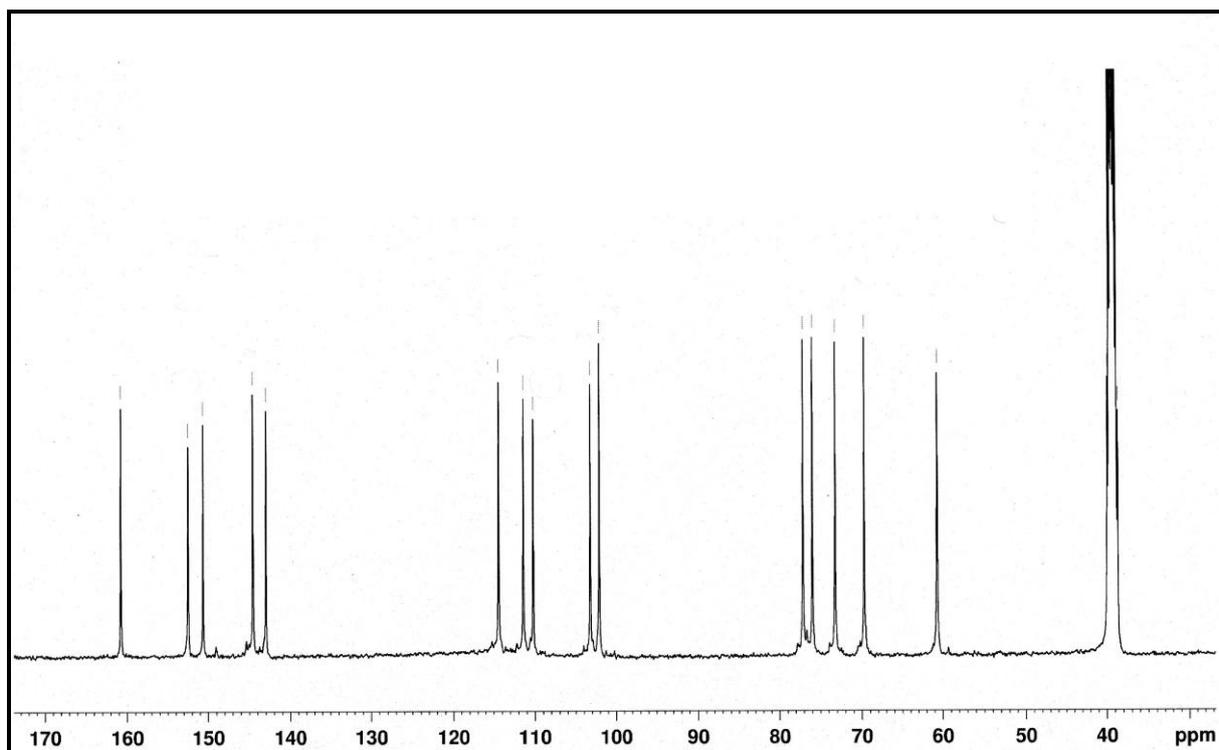


Figure 23. ^{13}C -RMN de la fraction d'oligosaculine E3.

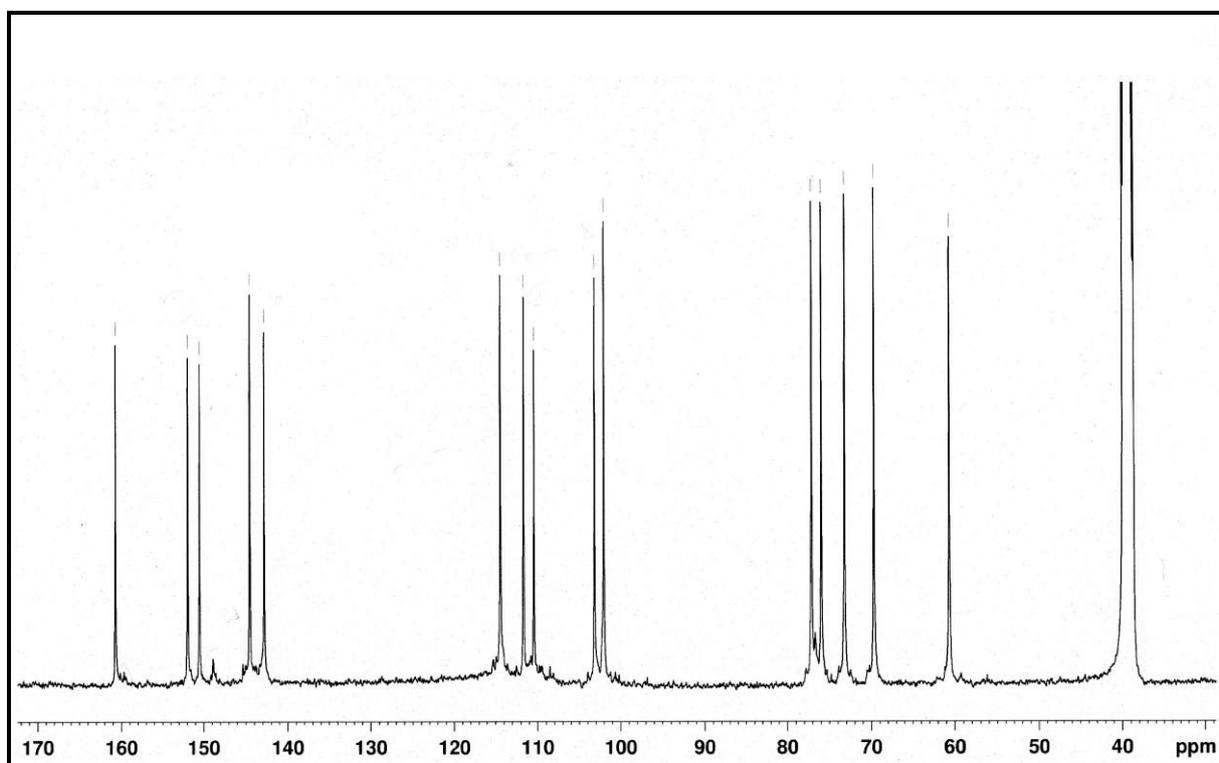


Figure 24. ^{13}C -RMN de la fraction d'oligosaculine E4.

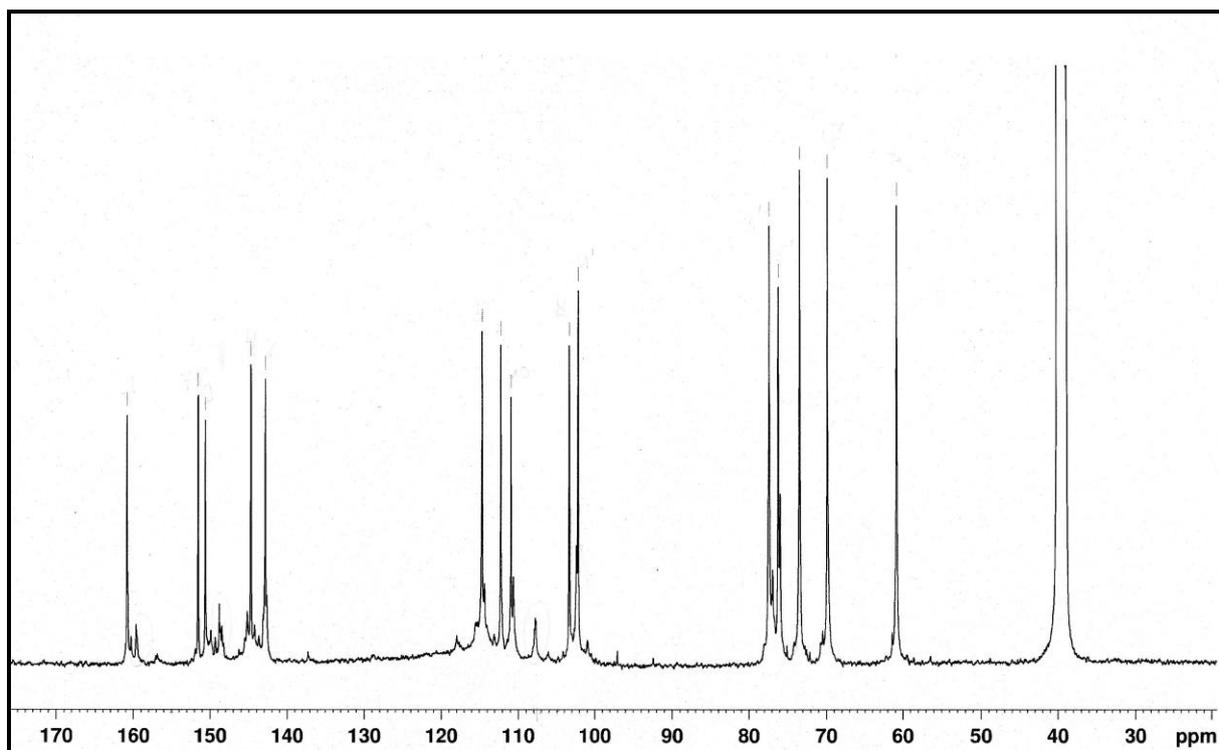


Figure 25. ^{13}C -RMN de la fraction d'oligosuciline E5.

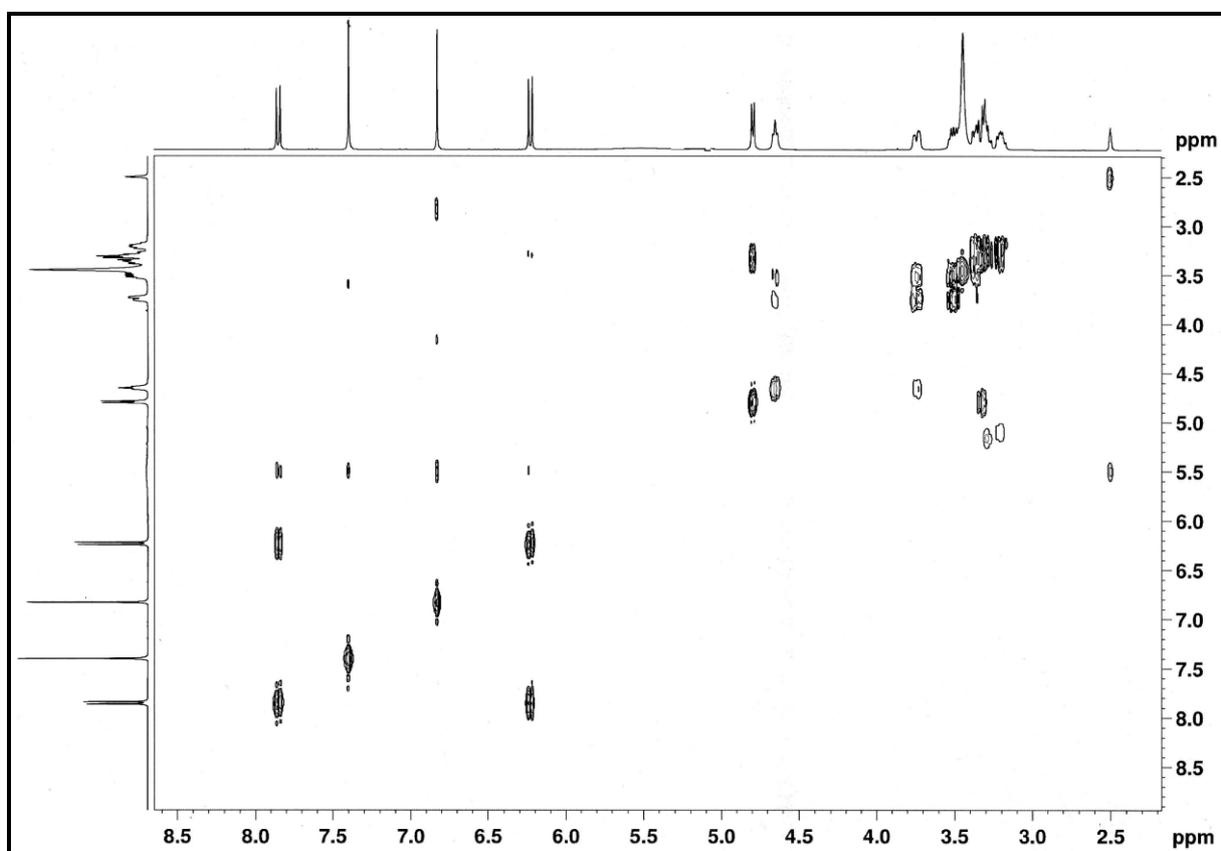


Figure 26. Le spectre Cosy proton-proton de l'esculine

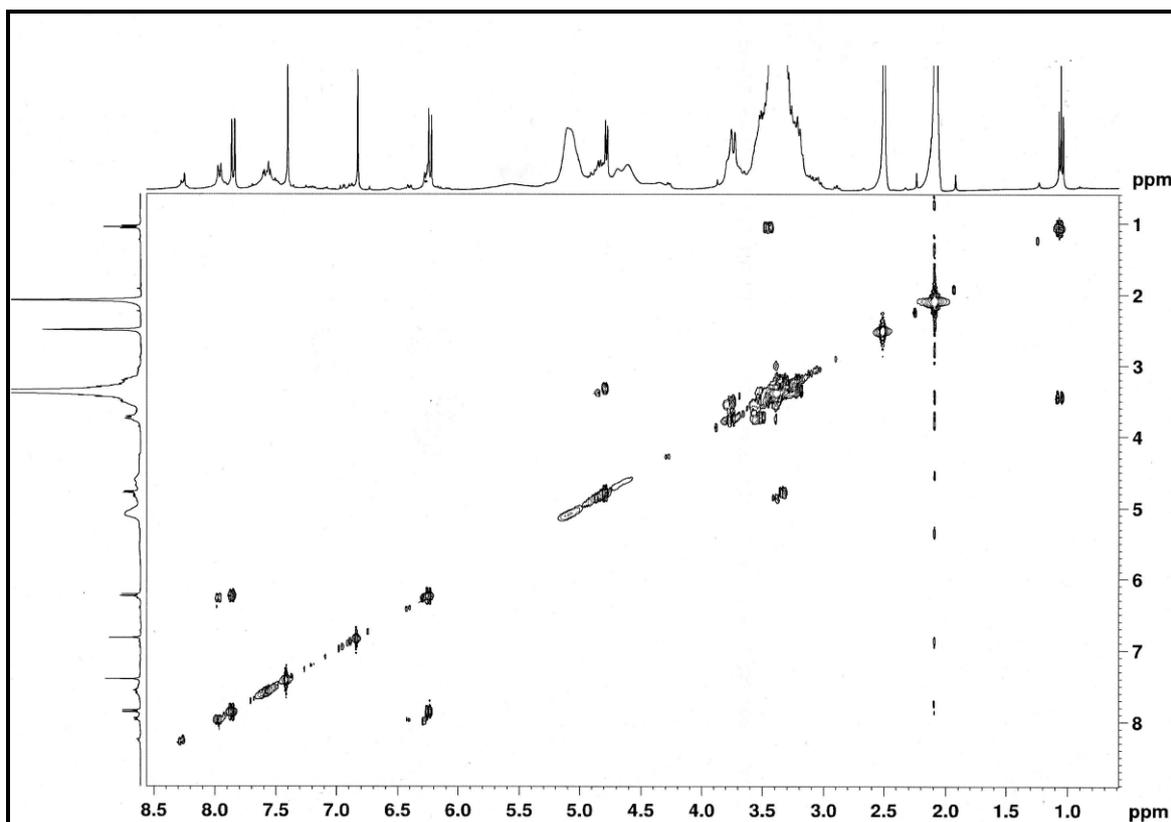


Figure 27. Le spectre Cosy proton-proton de la fraction d'oligosaculine E5

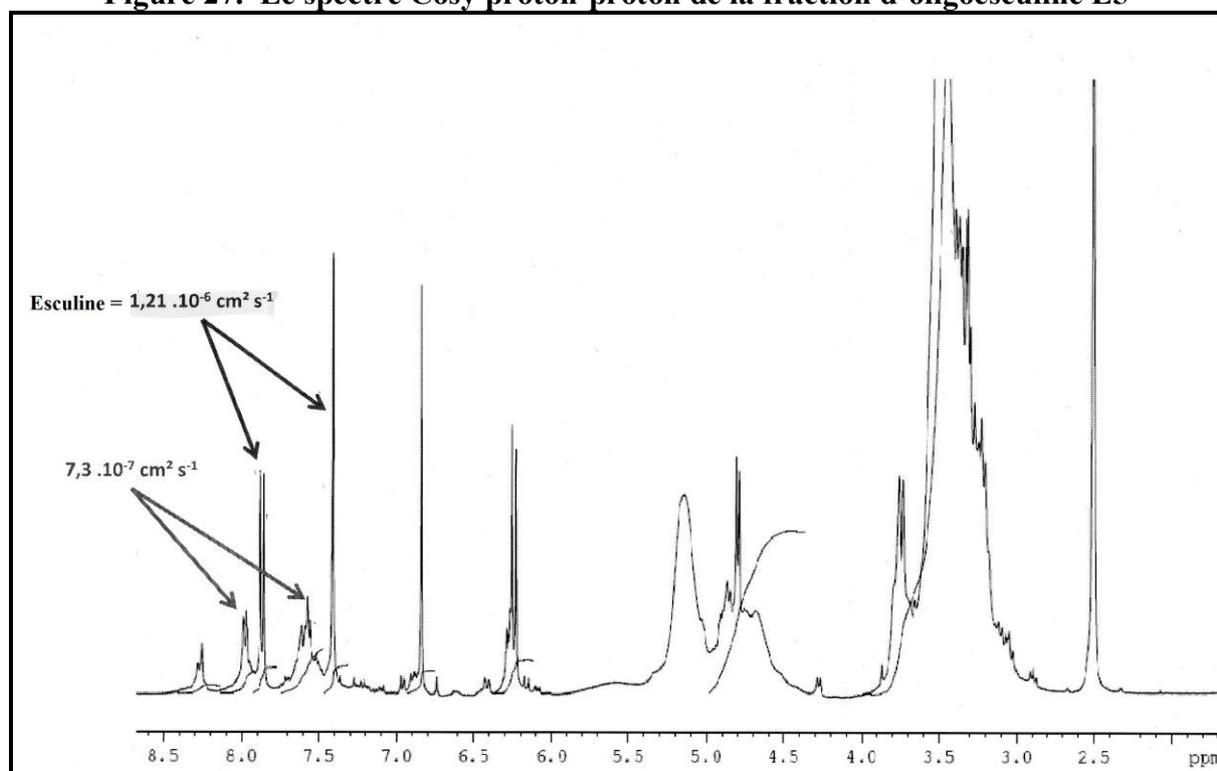


Figure 28. Spectre proton de la fraction d'oligosaculine E5, montrant les différentes vitesses de migration mis en évidence par les analyses Dosy spectroscopie RMN par ordre de diffusion.

Article N°1

Evaluation of mutagenic and
antimutagenic activities of oligorutin
and oligoesculin

Ghada Ben Rhouma, Latifa Chebil, Mounira Krifa , Mohamed
Ghoul, Leila Chekir-Ghedira

Food chemistry, 135 (2012), 1700–1707



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of oligorutin and oligoesculin

Ghada Ben Rhouma^{a,b}, Latifa Chebil^a, Mounira Krifa^b, Mohamed Ghoul^a, Leila Chekir-Ghedira^{b,c,*}^a Laboratory of Biomolecular Engineering, National School of Agronomy and Food Industries, National Polytechnic Institute of Lorraine ENSAIA-INPL, 54505 Vandoeuvre les Nancy, France^b Unity of Pharmacognosy/Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia^c Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Dental Medicine, University of Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2011

Received in revised form 31 May 2012

Accepted 19 June 2012

Available online 28 June 2012

Keywords:

Enzymatic polymerisation

Rutin

Esculin

Trametes versicolor

Ames assay

ABSTRACT

Rutin and esculin have been polymerised by laccase. Five fractions with M_w between 2127.42 and 8331.85 g/mol for oligorutins, and between 688.12 and 6973 g/mol for oligoesculins, were obtained. Fourier transformed infrared analysis showed that oligorutins were formed through C–C, C–O and C=O linkages, while oligoesculins were obtained through C–C linkages.

Monomers, their oligomers and their metabolites exhibited no mutagenic effect. Oligorutins and oligoesculins were more efficient in reducing the mutagenicity of methyl methanesulphonate, by, respectively, 69% and 64.8% in the presence of *Salmonella typhimurium* TA104, and 79.7% and 68.9% in the presence of *S. typhimurium* TA102, than were their monomers. The same oligomers revealed greater significant inhibitory effect of 2-aminoanthracene mutagenicity (respectively 82.4% and 79.3% in the presence of *S. typhimurium* TA104, and 89.2% and 82.9% in the presence of *S. typhimurium* TA102), than their monomers. Our results strongly suggest the enhancement of the tested monomer antimutagenicity after polymerisation.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past two decades, researchers, as well as food manufacturers and consumers, have increasingly been attracted by plant polyphenols, due to their antioxidant properties, and also due to their role in the prevention of various diseases, such as cancer and cardiovascular diseases (Caderni et al., 2000; Sun et al., 2009). Recently, attention has focussed on the identification of antimutagenic and/or anticarcinogenic effects of these polyphenols in animal systems (Lin et al., 2009). The mutagenic and antimutagenic activities of monomeric polyphenols were reported by some authors (Chulasiri, Bunyapraphatsara, & Moongkarndi, 1998). However, few studies have focussed on the antimutagenic activity of polyphenolic polymers. The antigenotoxic potential of monomeric tea polyflavonols (catechin, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin and epigallocatechin gallate) and their dimers using the comet assay have been studied by (Dhawan et al., 2002). These authors noticed that neither the monomeric nor dimeric flavonols prevented the lymphocyte DNA damage induced by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*] indole. By contrast, both theaflavins and theaflavins prevented the DNA damage, in a concentration-dependent manner (Dhawan et al., 2002).

Rutin, one of the major representative flavonoids, has been shown to have an anticancer effect. In fact, it has been demonstrated that rutin causes cell cycle arrest and induces apoptosis in many types of human cancer cell lines (La Casa, Villegas, Alarcon de la Lastra, Motilva, & Martin Calero, 2000; Lin et al., 2009). On the other hand, some works have indicated that the enzymatic polymerisation of rutin might improve its biological activities (Anthoni et al., 2008; Kurisawa, Chung, Uyama, & Kobayashi, 2003). In fact, rutin polymerisation by laccase from *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* engendered polymers with improved superoxide radical activity. Moreover, polyrutin, obtained by laccase from *Myceliophthora*, presented a better inhibition of 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) radical, responsible for cell damage, than did its monomer (Kurisawa et al., 2003).

Esculins, the other polyphenols studied in this paper, have been reported to inhibit the mutagenicity induced by nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NKK) on *Salmonella typhimurium* TA1537 (Tee & Castonguay, 1992). Moreover, Kaneko, Tahara, and Takabayashi (2007) have indicated that the intake of esculin had an inhibitory effect on oxidative DNA damage and carcinogenesis in rat colons. Previous data, have shown the antioxidant and anticarcinogenic effects of rutin and esculin, others have shown the beneficial effects of enzymatic polymerisation of these monomers on many biological activities (Anthoni et al., 2010). This has encouraged us to investigate the mutagenic and antimutagenic activities of the oligorutin and oligoesculin

* Corresponding author at: Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Dental Medicine, University of Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia. Tel./fax: +216 73461150.

E-mail address: Leila.chekir@laposte.net (L. Chekir-Ghedira).

fractions, obtained by enzymatic polymerisation, on two *S. typhimurium* strains, TA104 and TA102.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Laccase from *Trametes versicolor* (E.C. 1.10.3.2., 21.4 U mg⁻¹), rutin hydrate (98%), esculin hydrate (98%), methyl methanesulphonate (MMS), glucose-6-phosphate (G-6-P), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP), dimethylsulfoxide (DMSO) and ampicillin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 2-Aminoanthracene (2-AA) was purchased from Acros Organics (New Jersey, USA), and histidine, biotin and Agar-Agar from Difco (Paris, France). Aroclor 1254 was purchased from Supelco (USA), and the Oxoid Nutrient Broth No. 2, the polystyrenes and polystyrene sulphonate standards from Fluka Biochemika (Buchs, Switzerland). All solvents were of HPLC grade from VWR (Paris, France).

2.2. Methods

2.2.1. Polymerisation reaction

Polymerisation reaction was carried out under the same operating conditions as previously described by Anthoni et al., 2008, 2010). Rutin or esculin (50 g/l) was suspended in 1 l of a methanol/water (30:70 v/v) reaction medium. Laccase solution (3 U/ml) was added to the mixture. The reaction was stirred at 600 rpm, for 24 h for rutin and 72 h for esculin, at 20 °C. We have noticed that the rutin polymerisation reaction did not occur beyond 24 h, whereas the esculin polymerisation reaction kept going for 72 h. The kinetics of polymerisation reaction were followed by size exclusion chromatography (SEC).

2.2.2. Oligomers separation

The final reaction media, enriched with rutin and esculin polymers, was separated, by successive filtration processes, on a 15 kDa membrane, to remove the enzyme, and then successively on 5, 3 and 1 kDa membranes by a diafiltration process (INSIDE CeRAM™), using a mixture of water/methanol (70:30 v/v) (5 l) as eluent, at 50 °C. The transmembrane pressure (ΔP) was fixed at 2 bars. The permeate flux (F) was about 35 l/h/m². Then, the fractions were lyophilised (Bioblock lyophilizer). Five fractions were thus obtained and characterised (Table 1).

Table 1

Weight-average molecular mass index, polydispersity and weight-average molecular mass of obtained oligorutin and oligoesculin fractions.

Fractions	\overline{M}_w (g/mol)	PDI	I_M
Rutin (R)	611.21	1.00	1.00
R1 (permeate on Mb 1KD)	2127.42	1.17	3.48
R2 (permeate on Mb 3 KD)	4301.80	1.37	7.05
R3 (permeate on Mb 5 KD)	5069.93	1.36	8.30
R4 (retentate on Mb 5 KD)	7106.54	1.35	11.64
R5 (retentate on Mb 15 KD)	8331.85	1.42	13.65
Esculin (E)	339.36	1.00	1.00
E1 (permeate on Mb 1KD)	688.12	1.31	1.31
E2 (retentate on Mb 1KD)	1021.33	1.48	1.48
E3 (retentate on Mb 3 KD)	3042.10	1.39	1.39
E4 (retentate on Mb 5 KD)	5080.43	1.41	1.41
E5 (retentate on Mb 15 KD)	6973.00	1.54	1.54

Where Mb15 KD = membrane 15 KDa; Mb 1KD = membrane 1 KDa; Mb 3 KD = membrane 3 KDa; Mb 5 KD = membrane 5KDa; I_M = weight-average molecular mass index; PDI = polydispersity; \overline{M}_w = weight-average molecular mass.

2.2.3. Size exclusion chromatography analysis (SEC)

Relative masses of polymers were evaluated by size exclusion chromatography (SEC) (HPLC LaChrom, UV 280 nm LaChrom L-7400, Tosoh TSKgel α 3000 column, 60 °C). Dimethylformamide (DMF), with 1% LiBr, was used as the mobile phase (0, 5 ml/min). Molecular mass calibration was obtained by using standards of polystyrene (with peak molecular weight (Mp) from 500 to 10000 Da) and polystyrene sulphonate (with peak molecular weight (Mp) from 1100 to 31000 Da). The obtained data allowed the determination of number-average molecular mass (\overline{M}_n), weight-average molecular mass (\overline{M}_w), weight-average molecular mass index (I_M) and polydispersity (PDI), as described by Faix, Lange, and Salud (1981).

2.2.4. Ultraviolet analysis

The ultraviolet analysis (UV) spectra of rutin, esculin and their polymer fractions were determined via a UV6000LP spectrometer (Spectra System, Thermofinnigan).

2.2.5. Fourier transformed infraRed analysis (FTIR)

The infrared analyses were conducted by attenuated total reflectance–Fourier transformed infraRed (ATR-FTIR) spectroscopy, using a Fourier transformed infraRed (FTIR) spectrometer Tensor 27 (Bruker). The analysis was carried out on monomer and oligomer lyophilised powders.

2.2.6. Ames fluctuation assay

The Ames fluctuation assay was based on the most widely used and validated bacterial reverse-mutation test, known as the Ames test (Maron & Ames, 1983). The test uses mutant strains of *S. typhimurium*, carrying mutations in the operon coding for histidine biosynthesis.

2.2.7. Bacterial strains

S. typhimurium strains TA102 and TA104, which were histidine-requiring mutants, were kindly provided by Prof. Felzenswab, (University of Rio de Janeiro, Brazil), and maintained as described by Maron and Ames (Maron & Ames, 1983). The genotypes of the test strains were checked routinely for their histidine requirement, deep rough (*rfa*) character and for the presence of the R factor. They were stored at –80 °C. *S. typhimurium* TA102 and TA104 strains carried the nonsense mutation *hisG428*, either as a single copy on the chromosome (TA104) or as multicopy (30 copies) on plasmid pAQJ, over a chromosomal *his* deletion (TA102). *S. typhimurium* TA104 and TA102 were *hisG428* mutant. They contained an A:T base pair (bp) at the mutant site. Strains carrying this mutation could be reverted by damages at A:T or at G:C base pairs, as well as by 3, 6 or 9 bp deletions at the mutant site (Levin, Hollstein, & Christman, 1982). A study showed that the majority of spontaneous revertants of the TA104 strain were obtained by extragenic suppressor mutations; the majority were transversions from G:C to T:A. Most of the intragenic base substitutions were A:T–T:A transversions (Koch, Henrikson, & Cebula, 1996). These two strains have been reported to detect a variety of oxidative mutagens; however, the TA102 strain, unlike TA104, had the specificity to contain an intact excision repair (*uvrB+*) capacity, which facilitated the detection of cross-linking agents (Levin et al., 1982).

2.2.8. S9 fraction

The S9 microsome fraction was prepared from livers of rats treated with Aroclor 1254 (Maron & Ames, 1983). The components of the S9 mix were 8 mM MgCl₂, 32.5 mM KCl, 5 mM G6P, 4 mM NADP, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), and S9 fraction at a concentration of 0.68 mg/ml of mix. The S9 mix was prepared freshly for each assay.

2.2.9. *Salmonella*-microsome assay

The mutagenicity assay with *S. typhimurium* was performed as described by Maron and Ames (1983). The test is based on the plate incorporation method, using *S. typhimurium* test strains TA104 and TA102, with and without an exogenous metabolic system: S9 fraction in S9 mix. The test strains from frozen cultures were grown overnight for 12–14 h at 37 °C in the Oxoid Nutrient Broth No. 2. Various concentrations of each extract were added to 2 ml of top agar, supplemented with 0.5 mM L-histidine and 0.5 mM D-biotin, mixed with 100 µl of bacterial culture (approximate cell density 2×10^8 – 5×10^8 cells/ml), then poured onto a plate containing minimum agar. The plates were incubated at 37 °C for 48 h and his⁺ revertant colonies were counted. The influence of metabolic activation was tested by adding 500 µl of S9 mixture. Negative and positive control cultures gave numbers of revertants per plate that were within the normal limits found in the laboratory. An extract was considered mutagenic if the number of revertants per plate was at least doubled for *S. typhimurium* TA104 and TA102, over the spontaneous revertant frequency.

2.2.10. Antimutagenic assay

A modified plate incorporation procedure (Ferrer, Sanchez-Lamar, Luis Fuentes, Barbé, & Liagostera, 2002) was employed to determine the effect of all flavonoids on methyl methanesulphonate (MMS)-induced mutagenicity. In brief, 0.5 ml of phosphate buffer, for direct mutagen MMS, was distributed in sterilized capped tubes in an ice bath; then 0.1 ml of test compounds (50 µl of mutagen and/or 50 µl of test compound) and 0.1 ml of bacterial culture (prepared as described in mutagenicity test) were added. After vortexing gently and preincubating at 45 °C for 30 min, 2 ml of top agar, supplemented with 0.5 mM L-histidine and D-biotin, were added to each tube and vortexed for 3 s. The resulting entire mixture was overlaid on the minimal agar plate. The plates were incubated at 37 °C for 48 h and the revertant bacterial colonies on each plate were counted. The inhibition rate of mutagenicity (%) was calculated relative to those in the control group with the mutagen by the following formula:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left[1 - \frac{(\text{Nb R.} - \text{Nb S.R.})}{(\text{Nb mutagen} - \text{Nb S.R.})} \right] \times 100$$

where Nb R. is the number of revertants on test plates, Nb S.R. the number of spontaneous revertants and Nb mutagen is the number of revertants on mutagen control plates.

Each dose was tested in triplicate.

2.3. Statistical analysis

The results were presented as means \pm standard deviation. The data were tested for statistical differences by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple comparison tests, using STATISTICA (Version 6.0, Statsoft Inc.). Statistical differences were determined at the $P < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Enzymatic polymerisation of rutin and esculin and separation of oligomers by diafiltration

The changes of signal of SEC-UV during the rutin and esculin polymerisation were followed by SEC-UV at 280 nm, at 60 °C using dimethylformamide (DMF) with 1% LiBr as mobile phase (0.5 ml/min) (Fig. 1a and c). Once the polymerisation was achieved, oligomers were separated, by successive filtration processes at 50 °C (Table 1).

After diafiltration, weight-average molecular mass \overline{M}_w , polydispersity (PDI) and weight average molecular mass index (I_M), parameters of oligomer fractions obtained, by size exclusion chromatography analysis (SEC), were determined. Results are summarised in Table 1. The UV-SEC signal in the presence of monomers and some oligomer fractions is illustrated in Fig. 1b and d. These results clearly indicate that the polymerisation and the separation allow the obtaining of oligomers of esculin and rutin.

3.2. Fourier transformed infraRed and UV investigations

The UV-visible spectrum of rutin, in methanol/water (30/70 v/v), presented two maxima of absorption at 282 and 359 nm, due to the π - π^* transition of the aromatic electrons. For oligorutin fractions (R1, R3 and R5), the 359 nm bonds were larger and presented a hypsochromic shift of 5 nm.

The UV spectra of esculin and oligoesculin fractions (E2, E3, E4 and E5) presented the same peaks with a maximum of absorption at 345 nm, while the peak corresponding to E5 was broader than that for the esculin bond.

FTIR spectra of oligorutin fraction, R1, showed a new peak at 1220 cm^{-1} . This peak indicated the formation of new ether bonds C-O. The absence of a peak at 1747 cm^{-1} on the R1 fraction spectra, compared to rutin, spectra was noted. This could be explained by the disappearance of a C-H bond. Another new peak was detected in the spectra of R5 at 1465 cm^{-1} , which could be attributed to the appearance of a C-C bond. A new peak was detected at 1674 cm^{-1} in the spectra of R3 and R5 fractions, which could be attributed to the presence of a C=O bond. No other new peaks were noticed in the spectra of other oligorutin fractions.

The FTIR spectra of oligoesculin fractions (E2, E3, E4 and E5) showed a new peak at 1400 cm^{-1} compared to the spectra of esculin. This new peak could be due to formation of C-C bonds.

The obtained and reported UV and FTIR data, suggested that different linkages (C-C, C-O, C=O) could be achieved, depending on monomer, enzyme and operating conditions (pH, temperature, medium).

3.3. Mutagenic and antimutagenic properties of oligorutin

3.3.1. Mutagenic activities of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5)

Mutations have been described as important early steps in carcinogenesis; therefore a short term genetic test, such as *salmonella* reversion assay, has been successfully used for the detection of mutagens/carcinogens, as well as for the detection of antimutagens/anticarcinogens.

Results in Table 2 indicate that none of the tested flavonoids induced significant increase in the number of *S. typhimurium* TA 102 and *S. typhimurium* TA104 revertants, with or without the metabolic activation system (S9). It was inferred that neither rutin, nor oligorutin fractions (R2, R3 and R5), or their metabolites, exhibited a mutagenic effect.

3.3.2. Antimutagenicity of rutin and its oligomer fractions (R2, R3 and R5)

3.3.2.1. General. Doses of 5 and 10 µg/plate of 2-AA, 325 and 130 µg/plate of MMS were chosen for antimutagenicity studies with, respectively, *S. typhimurium* TA104 and *S. typhimurium* TA102 strains, since these doses were not toxic and induced 1314 ± 21 (5 µg/plate of 2-AA) and 1234 ± 12 (325 µg/plate of MMS) revertants in *S. typhimurium* TA104. 2-AA, at the concentration of 10 µg/plate induced 803 ± 22 and MMS, at the concentration of 130 µg/plate, induced 713 ± 06 revertants in the *S. typhimurium* TA102 strain.

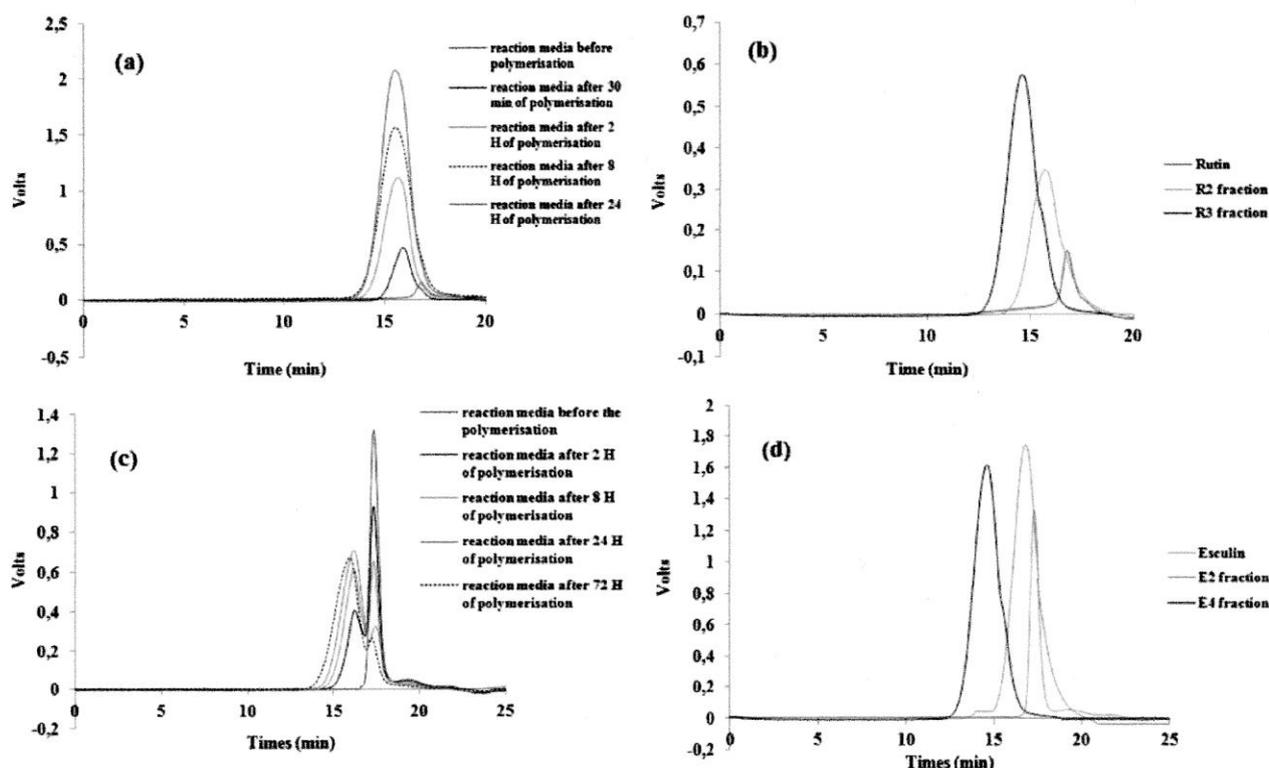


Fig. 1. (a) The change of signal of SEC-UV during the rutin polymerisation in presence of laccase from *Trametes versicolor*, using dimethylformamide (DMF) with 1% LiBr as a mobile phase (0.5 ml/min). (b) SEC-UV analyses of rutin and polyrutin fractions R2 and R3 using dimethylformamide (DMF) with 1% LiBr as a mobile phase (0.5 ml/min). (c) The change of signal of SEC-UV during the esculin polymerisation in the presence of laccase from *T. versicolor*, using dimethylformamide (DMF) with 1% LiBr as a mobile phase (0.5 ml/min). (d) SEC-UV analyses of esculin and polyesculin fractions E2 and E4 using dimethylformamide (DMF) with 1% LiBr as a mobile phase (0.5 ml/min). Where R2 fraction = permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 3 kDa membrane, R3 fraction = permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 5 kDa membrane, E2 fraction = retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 1 kDa membrane, E4 fraction = retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on 5 kDa membrane.

3.3.2.2. Antimutagenicity of rutin and its oligomer fractions (R2, R3 and R5) against the mutagenic effect induced by methyl methanesulphonate. The antimutagenic activity was evaluated for the first time against the direct mutagen, methyl methanesulphonate (MMS).

The results, summarised in Table 3, show that oligorutin fractions were more effective in reducing the mutagenicity caused by the direct mutagen MMS, in the presence of *S. typhimurium* TA102 and *S. typhimurium* TA104, compared to monomeric rutin. All fractions showed an antimutagenic activity in a dose-dependent manner. Oligorutin fraction R5 showed the most important inhibition effect of mutagenicity induced by MMS in both *S. typhimurium* TA104 and *S. typhimurium* TA102 at the highest tested dose (120 $\mu\text{mol}/\text{plate}$), with inhibition percentages of 69.0% and 79.7% respectively. These percentages were higher than those obtained in the presence of the monomer (51.1% and 58.0% respectively) at the same dose.

3.3.2.3. Antimutagenicity of rutin and its oligomer fractions R2, R3 and R5 against mutagenicity induced by the 2-aminoanthracene. The 2 aminoanthracene (2-AA), which required to be metabolised in the presence of S9 to express its mutagenicity, was used to evaluate the antimutagenic activity of metabolites from rutin and oligorutin fractions. The results, summarised in Table 4, indicated that oligorutin fractions were strong inhibitors of the mutagenicity induced by 2-AA in a dose-dependent manner. The oligorutin fraction R5 was the most effective in reducing the mutagenicity induced by 2-AA in both *S. typhimurium* TA104 and *S. typhimurium* TA102 assay systems. Its inhibition percentages were 82.4% and 89.2%, respectively, in the presence of *S. typhimurium* TA104 and *S. typhimurium* TA102 strains at 120 $\mu\text{mol}/\text{plate}$, while rutin

inhibited 2-AA-induced mutagenicity by, respectively, 60.1% and 70.1% at the same dose.

3.3.3. Mutagenic and antimutagenic properties of oligoesculin

3.3.3.1. Mutagenic activities of esculin and oligoesculin fractions (E2, E3, E4 and E5). The results of the esculin (and its oligomers) mutagenic study, in the presence or in the absence of the metabolic activation system (S9), were shown in Table 2. Experiments showed no mutagenicity of oligoesculin fractions at the tested doses, of using either the *S. typhimurium* TA102 or the *S. typhimurium* TA104 assay system, as well as with or without the S9 metabolic system. In fact, none of the tested fractions induced significant increase of the revertant number compared to the spontaneous revertant number in the mentioned strains.

3.3.3.2. Antimutagenicity study of esculin and its oligomer fractions (E2, E3, E4 and E5).

3.3.3.2.1. Inhibitory effects of esculin and oligoesculin fractions (E2, E3, E4 and E5) against the mutagenicity induced by the direct mutagen methyl methanesulphonate. Results shown in Table 3 showed that oligoesculin fractions exhibited higher antimutagenic activities against methyl methanesulphonate (MMS) than did monomeric esculin. The fraction E5 was the most effective in reducing the mutagenicity caused by the MMS in both *S. typhimurium* TA102 and TA104 assay systems, with respective inhibition percentages of 68.9% and 64.8% at the highest tested dose (1000 $\mu\text{mol}/\text{plate}$). Antimutagenic activities revealed by esculin and oligoesculin fractions against MMS were dose-dependent.

3.3.3.2.2. Antimutagenic activities of esculin and oligoesculin fractions (E2, E3, E4 and E5) against mutagenicity induced by the indirect

Table 2
Mutagenicity of rutin, esculin and their oligomer fractions using *S. typhimurium* TA104 and TA102 assay systems in the presence and absence of exogenous metabolic activation system (S9).

Fractions	Dose ($\mu\text{mol}/\text{plate}$)	Number of revertants on TA104		Number of revertants on TA102	
		–S9	+S9	–S9	+S9
Rutin	30	650 \pm 15	475 \pm 18	310 \pm 17	319 \pm 18
	60	606 \pm 21	491 \pm 02	337 \pm 24	313 \pm 12
	120	561 \pm 08	514 \pm 14	339 \pm 12	315 \pm 05
R2	30	507 \pm 15	497 \pm 10	262 \pm 13	338 \pm 09
	60	616 \pm 12	526 \pm 14	347 \pm 7	366 \pm 10
	120	702 \pm 04	520 \pm 04	322 \pm 8	370 \pm 04
R3	30	424 \pm 18	484 \pm 08	308 \pm 1	302 \pm 07
	60	430 \pm 23	570 \pm 13	320 \pm 23	366 \pm 08
	120	522 \pm 7	562 \pm 07	354 \pm 10	396 \pm 13
R5	30	492 \pm 14	462 \pm 04	288 \pm 3	322 \pm 04
	60	550 \pm 11	459 \pm 09	394 \pm 5	349 \pm 09
	120	675 \pm 11	479 \pm 11	421 \pm 16	379 \pm 12
Esculin	250	423 \pm 07	463 \pm 07	263 \pm 07	266 \pm 18
	500	417 \pm 02	467 \pm 06	267 \pm 02	274 \pm 12
	1000	412 \pm 03	472 \pm 13	272 \pm 03	283 \pm 05
E2	250	393 \pm 10	493 \pm 12	293 \pm 10	300 \pm 09
	500	416 \pm 04	466 \pm 04	316 \pm 04	310 \pm 10
	1000	429 \pm 03	492 \pm 13	293 \pm 03	331 \pm 04
E3	250	402 \pm 09	472 \pm 09	272 \pm 09	298 \pm 07
	500	396 \pm 03	496 \pm 03	296 \pm 03	306 \pm 08
	1000	413 \pm 12	483 \pm 04	313 \pm 12	319 \pm 13
E4	250	418 \pm 10	488 \pm 11	308 \pm 10	301 \pm 04
	500	422 \pm 02	502 \pm 02	302 \pm 02	299 \pm 09
	1000	430 \pm 07	483 \pm 17	283 \pm 07	292 \pm 12
E5	250	421 \pm 02	481 \pm 02	291 \pm 02	303 \pm 13
	500	425 \pm 06	495 \pm 16	305 \pm 06	316 \pm 15
	1000	432 \pm 05	481 \pm 02	320 \pm 05	332 \pm 04
Spontaneous revertants		411 \pm 17	446 \pm 08	254 \pm 10	295 \pm 05
PC		1264 \pm 09 ^a	1257 \pm 05 ^a	267 \pm 06	708 \pm 26 ^a

Positive control (PC): *S. typhimurium* TA104/–S9, MMS (325 $\mu\text{g}/\text{plate}$); *S. typhimurium* TA104/+S9, 2-AA (5 $\mu\text{g}/\text{plate}$); *S. typhimurium* TA102/–S9, MMS (130 $\mu\text{g}/\text{plate}$); TA102/+S9, 2-AA (10 $\mu\text{g}/\text{plate}$).

MMS: Methyl methanesulphonate, 2-AA: 2-aminoanthracene, NC: negative control treated with Vehicul solvent.

R2: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 3 kDa membrane, R3 fraction: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 5 kDa membrane, R5: retentate obtained after diafiltration of oligorutin on a 15 kDa membrane, E2: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 1 kDa membrane, E3: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 3 kDa membrane, E4: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 5 kDa membrane, E5: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 15 kDa membrane.

Values are expressed as means \pm standard deviation of three experiments.

^a $P < 0.05$ as compared with the control group using ANOVA, followed by Student test.

mutagen 2-aminoanthracene. Our results, in Table 4, indicated that oligoesculin fraction metabolites were more effective in inhibiting the mutagenicity induced by the 2-aminoanthracene (2-AA) than was esculin. Oligoesculin fraction E5 shows the highest antimutagenic effect against 2-AA in *S. typhimurium*, the TA104 and *S. typhimurium* TA102 assay systems, at the highest tested dose (1000 $\mu\text{mol}/\text{plate}$) with respective inhibiting percentages of 79.3% and 82.9%, whereas these percentages were, respectively, 61.9% and 67.4% in the presence of esculin. The antimutagenic activities of esculin and oligoesculin fractions were dose-dependent.

4. Discussion

The polymerisation of rutin led to five fractions after diafiltration. The UV analysis of oligorutin fractions showed a hypsochromic shift. Such results could be due to the implication of the B ring of rutin in the formation of oligomers. In fact, Anthoni et al. (2008) and Markham (1982) have observed similar behaviour. The latter concluded that the presence of a substitution on the 5, 7 and 4' positions of the phenolic rings led to a hypsochromic shift. UV spectra of oligoesculin fractions, however, presented broader bands than esculin, which could be attributed to conjugated a

oligomeric structure (Kurisawa et al., 2003) The same behaviour was observed by Anthoni et al., (2010) after the esculin polymerisation.

Oligorutin fractions were obtained through C–C, C–O and C=O linkages. In fact many authors have reported that flavonoid polymers were composed of phenylene units and/or oxyphenylene units (Anthoni et al., 2008; Kobayashi et al., 2001; Uyama & Kobayashi, 2002). Moreover, Uzan et al. (2011) have suggested that polymerisation of rutin by *Pycnococcus* laccases led to the formation of polymers through C–C and C–O bonds and precisely through C8–C8, C6–O4' and C8–C5' linkages. Rutin was also polymerised by laccase from *T. versicolor* by Anthoni et al. (2008), and results showed the presence of C–C or C–O linkages, while oligoesculin fractions were obtained through C–C bonds. In fact, Anthoni et al., (2008) have reported the formation of C–C and C–O linkages, in the phenolic and the glucosidic parts of the coumarins, during the esculin polymerisation. Moreover, an *in silico* structure investigation of oligoesculin, by the same authors, suggested the preferential formation of C8–C8 linkage between esculin units during the polymerisation reaction.

Mutations are important early steps in carcinogenesis; therefore, a short term genetic test, such as the *Salmonella*/reversion assay, has been successfully used for the detection of mutagens/carcinogens, as well as of antimutagens / anticarcinogens. Rutin

Table 3
Effect of rutin, esculin and their oligomer fractions on the mutagenicity induced by MMS in *Salmonella typhimurium* TA104 and TA102 assay systems without S9.

Fractions	Dose ($\mu\text{mol}/\text{plate}$)	TA104		TA102	
		Number of revertants	Inhibition % of mutagenicity	Number of revertants	Inhibition % of mutagenicity
Rutin	30	1151 \pm 16	10.2 ^a	631 \pm 18	17.0 ^a
	60	970 \pm 18	32.4 ^a	521 \pm 11	39.8 ^a
	120	817 \pm 09	51.1 ^a	433 \pm 13	58.0 ^a
R2	30	992 \pm 21	29.7 ^a	541 \pm 16	35.6 ^a
	60	873 \pm 06	44.2 ^a	472 \pm 03	49.9 ^a
	120	762 \pm 11	57.8 ^a	400 \pm 12	64.8 ^a
R3	30	910 \pm 23	36.7 ^a	506 \pm 19	42.9 ^a
	60	807 \pm 16	52.3 ^a	423 \pm 22	60.0 ^a
	120	706 \pm 19	64.7 ^a	364 \pm 11	71.1 ^a
R5	30	897 \pm 07	41.3 ^a	470 \pm 05	50.3 ^a
	60	764 \pm 14	57.6 ^a	381 \pm 15	68.9 ^a
	120	671 \pm 19	69.0 ^a	328 \pm 18	79.7 ^a
Esculin	250	1097 \pm 03	16.8 ^a	621 \pm 09	19.0 ^a
	500	992 \pm 10	29.7 ^a	557 \pm 02	32.3 ^a
	1000	896 \pm 07	41.4 ^a	499 \pm 12	44.3 ^a
E2	250	1017 \pm 12	26.6 ^a	572 \pm 08	29.2 ^a
	500	948 \pm 06	35.0 ^a	533 \pm 10	37.3 ^a
	1000	834 \pm 05	49.0 ^a	465 \pm 06	51.3 ^a
E3	250	962 \pm 09	33.3 ^a	543 \pm 09	35.2 ^a
	500	855 \pm 05	46.4 ^a	476 \pm 06	49.1 ^a
	1000	788 \pm 06	54.7 ^a	443 \pm 12	55.9 ^a
E4	250	930 \pm 04	37.3 ^a	523 \pm 03	39.3 ^a
	500	827 \pm 02	49.9 ^a	463 \pm 05	51.8 ^a
	1000	753 \pm 08	58.94 ^a	417 \pm 07	61.3 ^a
E5	250	909 \pm 08	39.8 ^a	497 \pm 05	44.7 ^a
	500	786 \pm 02	54.9 ^a	436 \pm 06	57.3 ^a
	1000	705 \pm 05	64.8 ^a	380 \pm 02	68.9 ^a
Spontaneous revertants		418 \pm 10	–	230 \pm 12	–
MMS		1234 \pm 12	–	713 \pm 06	–

MMS: Methyl methanesulphonate (325 $\mu\text{g}/\text{plate}$) was used as positive control on *S. typhimurium* TA104 and (130 $\mu\text{g}/\text{plate}$) on *S. typhimurium* TA102, R2: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 3 kDa membrane, R3 fraction: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 5 kDa membrane, R5: retentate obtained after diafiltration of oligorutin on a 15 kDa membrane, E2: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 1 kDa membrane, E3: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 3 kDa membrane, E4: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 5 kDa membrane, E5: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 15 kDa membrane.

Values are expressed as means \pm standard deviation of three experiments.

^a $P < 0.05$ as compared with the control group using ANOVA, followed by Student test.

and oligorutin fractions did not illustrate any mutagenicity. Many authors have reported that flavonol glycosides, such as rutin, are usually non-mutagenic, unless activated by a mixture of hydrolysing glycosidases (Brown & Dietrich, 1979; Nagao, Morita, & Yahagi, 1981). However, rutin showed a weak mutagenic activity in *S. typhimurium* BA13 strain and its minimum mutagenic dose was estimated to be 323 $\mu\text{mol}/\text{plate}$ (Jurado, Alejandro-Duran, Alonso-Moraga, & Pueyo, 1991). Similarly, esculin did not show any mutagenicity in the strains *S. typhimurium* TA104 and *S. typhimurium* TA102. The absence of mutagenicity in the presence of rutin, oligorutin fractions, esculin and oligoesculin fractions, in the two *S. typhimurium* strains TA102 and TA104, with and without (S9) activation system at any tested dose of the different fractions, indicated that DNA did not seem to be a relevant target for these molecules (Ben Ammar et al., 2007).

In the present experiments, we have also investigated the ability of rutin and oligorutin fractions to inhibit mutagenicity induced by the two mutagens (MMS and 2-AA). The oligorutin fraction R5, which had the highest \overline{M}_w , was the most effective in inhibiting both direct and indirect mutagens. Different flavonoids showed similar relative inhibitions in the Ames/*Salmonella* assay with *S. typhimurium* TA98 and TA100 strains (Koda, Kuroda, & Imai, 2008). The structure–activity relationship of different flavonoids has been reported by many authors. In fact, Hatch, Lightstone, and Colvin (2000) have indicated that the 4-keto substituent at C4 of the C ring was required for antimutagenic activity of

flavonoids against heterocyclic amines (such as 2-AA). Moreover, these same authors have reported that planarity of the C ring might be important for the antimutagenic activity. Indeed, a C2–C3 double bond increased the π -conjugation of the bond linking the B and the C rings, which favoured near-planarity of the two rings, increasing the antimutagenic capacity (Hatch et al., 2000). Edenharder, Rauscher, and Platt (1997) investigated the antimutagenic effect of 56 flavonoids against the mutagenicity induced by 2-nitrofluorene, 2-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene in *S. typhimurium* TA98 and confirmed the structure–activity relationship advanced by Hatch et al. (2000). So, the high antimutagenic activity of oligorutin fractions against MMS and 2-AA indicated that these groups were not affected during the rutin polymerisation.

Our study showed that oligoesculin fractions presented better antimutagenic powers than did the monomeric esculin. The oligoesculin fraction E5 induced the greatest antimutagenic capacity against direct and indirect mutagens, MMS and 2-AA, respectively. Edenharder and Tang (1997) have studied the antimutagenic activity of 32 coumarins against different mutagens and showed that antimutagenic activity depended on the presence of polar hydroxyl groups at carbons 3, 4 or 7 in the coumarin structure. Esculin had just one hydroxyl group, in position 7. So, a strong inhibition effect against mutagenicity induced by MMS and 2-AA, in the presence of polyesculin fractions, means that the hydroxyl group in position 7 should not be affected during the esculin polymerisation reaction.

Table 4
Effect of rutin, esculin and their oligomers fractions on the mutagenicity induced by 2-AA in *Salmonella typhimurium* TA104 and TA102 assay systems in the presence of S9.

Fractions	Dose ($\mu\text{mol}/\text{plate}$)	Number of revertants on TA104		Number of revertants on TA102	
		Nb revertants	%	Nb revertants	%
Rutin	30	1126 \pm 16	21.3 ^a	635 \pm 08	30.3 ^a
	60	991 \pm 24	36.5 ^a	481 \pm 11	58.0 ^a
	120	783 \pm 12	60.1 ^a	414 \pm 14	70.1 ^a
R2	30	1012 \pm 11	34.2 ^a	579 \pm 10	40.4 ^a
	60	883 \pm 17	48.8 ^a	436 \pm 13	66.1 ^a
	120	721 \pm 15	67.1 ^a	360 \pm 06	79.8 ^a
R3	30	910 \pm 20	36.7 ^a	547 \pm 19	46.1 ^a
	60	807 \pm 15	52.3 ^a	408 \pm 22	71.2 ^a
	120	678 \pm 09	71.9 ^a	347 \pm 11	82.2 ^a
R5	30	862 \pm 07	51.1 ^a	470 \pm 12	60.31 ^a
	60	754 \pm 14	63.3 ^a	381 \pm 15	68.9 ^a
	120	586 \pm 16	82.4 ^a	308 \pm 19	89.2 ^a
	250	1045 \pm 08	30.4 ^a	604 \pm 09	35.9 ^a
Esculin	500	929 \pm 10	43.6 ^a	540 \pm 02	47.4 ^a
	1000	767 \pm 07	61.9 ^a	429 \pm 12	67.4 ^a
E2	250	1019 \pm 12	33.4 ^a	593 \pm 08	37.8 ^a
	500	869 \pm 06	50.33 ^a	491 \pm 10	56.2 ^a
	1000	720 \pm 05	67.2 ^a	399 \pm 06	72.8 ^a
E3	250	977 \pm 09	38.1 ^a	572 \pm 09	41.6 ^a
	500	826 \pm 05	54.9 ^a	457 \pm 06	62.3 ^a
	1000	691 \pm 06	70.5 ^a	375 \pm 12	77.1 ^a
E4	250	939 \pm 04	42.4 ^a	534 \pm 03	48.5 ^a
	500	786 \pm 02	59.7 ^a	439 \pm 05	65.6 ^a
	1000	639 \pm 08	76.4 ^a	352 \pm 07	81.3 ^a
E5	250	910 \pm 08	45.7 ^a	521 \pm 05	50.8 ^a
	500	734 \pm 02	65.6 ^a	417 \pm 06	69.5 ^a
	1000	613 \pm 05	79.3 ^a	343 \pm 02	82.9 ^a
Spontaneous revertants		430 \pm 15	–	248 \pm 12	–
2-AA		1314 \pm 21	–	803 \pm 22	–

2-AA: 2-aminoanthracene (5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) was used as positive on *S. typhimurium* TA104 and (10 $\mu\text{g}/\text{plate}$) on *S. typhimurium* TA 102, R2: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 3 kDa membrane, R3 fraction: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 5 kDa membrane, R5: retentate obtained after diafiltration of oligorutin on a 15 kDa membrane, E2: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 1 kDa membrane, E3: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 3 kDa membrane, E4: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 5 kDa membrane, E5: retentate obtained after diafiltration of oligoesculin on a 15 kDa membrane. Values are expressed as means \pm standard deviation of three experiments.

^a $P < 0.05$ as compared with the control group using ANOVA, followed by Student test.

Oligorutin and oligoesculin fractions were depicted as effective antimutagens against direct and indirect acting toxicants, suggesting that these fractions could act through various mechanisms. They could probably reduce frameshift mutagenicity induced by 2-AA, by functioning as blocking agents (Ferguson, Philpott, & Karunasinghe, 2004). The P-450 enzyme system catalysed the formation of *N*-hydroxy derivatives, such as *N*-hydroxy-2-aminoanthracene (a metabolite that interacted with DNA). Thus, an alteration in the function of the enzyme might result in altered reaction rates and differential pathways of the metabolism of mutagens and carcinogens. In some cases, this modification provided protection against chemically induced mutagenesis, and we believe that this was one mechanism of oligorutin and oligoesculin.

Results of antimutagenic activity showed a lower antimutagenic activity toward the tested mutagens in the TA102 strain compared to the TA104 assay system. In fact, strain TA102 generally has a greater sensitivity to mutagenic insult as compared to strain TA104, due to the presence of an intact excision repair (uvrB+) sequence in its genome. Therefore, we can suppose, in our case, that strain TA102 is more sensitive than strain TA104 to the antimutagenic effect of the tested oligomers.

The protective effect of oligorutin and oligoesculin against the tested mutagens might be exerted in three ways: first, polymer fractions might adsorb the mutagen in a way similar to the carcinogen adsorption (Ferguson et al., 2004); second, polymer fractions could induce DNA glycosylase enzymes, capable of repairing

alkylating DNA bases (Steele & Kello, 2005); third, the reductive ability of the samples, assessed in this study, suggests that oligorutin and oligoesculin fractions were able to donate electrons to free radicals, transforming them to non-radical species (Anthoni et al., 2010; Kurisawa, Chung, Uyama, & Kobayashi, 2003).

5. Conclusion

In this study, the mutagenic and antimutagenic potentials of rutin, esculin and their oligomer fractions were evaluated using the Ames assay. Oligorutin and oligoesculin fractions were shown to be potent inhibitors of the mutagenicity induced by carcinogens such as the 2 aminoanthracene and the methyl methanesulphonate. Since the 4-keto substituent at C4, C2–C3 double bond, and hydroxyl in position 7 were reported by other authors to be involved in the antimutagenic activity of, respectively, flavonoids (i.e. rutin) and coumarins (i.e. esculin) (Edenharder & Tang, 1997; Edenharder et al., 1997; Hatch et al., 2000), we suggest that polymerisation of both rutin and esculin did not affect these structures. The investigation of such a structure–activity relationship could yield important information, with regard to developing superior protocols for cancer-preventing therapy. Our study provides evidence that the polymerisation of rutin and esculin improved their antimutagenic activity. Finally, the information presented here could be used as preliminary data, and biologically more relevant experiments that will examine the therapeutic potential of obtained oligorutin and oligoesculin fractions will be designed.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Lorraine region in France, the Ministère Français des Affaires Etrangères (Institut Français de Coopération (IFC), and to the Ministry of Higher Education and Scientific Research in Tunisia for the financial assistance of this study.

References

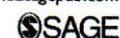
- Anthoni, J., Humeau, C., Maia, E., Chebil, L., Engasser, J.-M., & Ghoul, M. (2010). Enzymatic synthesis of oligoesculin: Structure and biological activities characterizations. *European Food Research and Technology*, 231(4), 571–579.
- Anthoni, J., Lionneton, F., Wieruszski, J.-M., Magdalou, J., Engasser, J.-M., Chebil, L., et al. (2008). Investigation of enzymatic oligomerization of rutin. *Rasayan Journal of Chemistry*, 1(4), 718–731.
- Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhiet, I., Skandrani, I., Naffeti, A., Boubaker, J., et al. (2007). Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Annals of Microbiology*, 57(3), 453–460.
- Brown, J. P., & Dietrich, P. S. (1979). Mutagenicity of plant flavonols in the *Salmonella*/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. *Mutation Research*, 66(3), 223–240.
- Caderni, G., De Filippo, C., Luceri, C., Salvadori, M., Giannini, A., Biggeri, A., et al. (2000). Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis*, 21(11), 1965–1969.
- Chulasiri, M., Bunyapraphatsara, N., & Moongkarndi, P. (1998). Mutagenicity and antimutagenicity of flavonoids extracted from *Millingtonia hortensis* L. *Journal of Toxicological Sciences*, 23(2), 224–228.
- Dhawan, A., Anderson, D., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Clifford, M. N., & Ioannides, C. (2002). Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced DNA damage in human lymphocytes using the Comet assay. *Mutation Research*, 515(1–2), 39–56.
- Edenharder, R., Rauscher, R., & Platt, K. L. (1997). The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: A structure-activity relationship study. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 379(1), 21–32.
- Edenharder, R., & Tang, X. (1997). Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 35(3–4), 357–372.
- Faix, O., Lange, W., & Salud, E. C. (1981). The use of HPLC for the determination of average molecular weights and molecular weight distributions of milled wood lignins from *Shorea polysperma* (Blco.). *Holzforschung*, 35(1), 3–9.
- Ferguson, R. L., Philpott, M., & Karunasinghe, N. (2004). Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198(1–3), 147–159.
- Ferrer, M., Sanchez-Lamar, A., Luis Fuentes, J., Barbé, J., & Liagostera, M. (2002). Antimutagenic mechanisms of *Phyllanthus orbicularis* when hydrogen peroxide is tested using *Salmonella* assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 517(1–2), 251–254.
- Hatch, F. T., Lightstone, F. C., & Colvin, M. E. (2000). Quantitative structure-activity relationship of flavonoids for inhibition of heterocyclic amine mutagenicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(4), 279–299.
- Jurado, J., Alejandro-Duran, E., Alonso-Moraga, A., & Pueyo, C. (1991). Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the *Salmonella* Ara test. *Mutagenesis*, 6(4), 289–295.
- Kaneko, T., Tahara, S., & Takabayashi, F. (2007). Inhibitory effect of natural coumarin compounds, esculetin and esculin, on oxidative DNA damage and formation of aberrant crypt foci and tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colons. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(11), 2052–2057.
- Kobayashi, S., Uyama, H., Tonami, H., Oguchi, T., Higashimura, H., Ikeda, R., et al. (2001). Regio and chemo selective polymerization of phenols catalyzed by oxidoreductase enzyme and its model complexes. *Macromolecular Symposia*, 175, 1–10.
- Koch, W. H., Henrikson, E. N., & Cebula, T. A. (1996). Molecular analyses of *Salmonella* hisG428 ochre revertants for rapid characterization of mutational specificity. *Mutagenesis*, 11(4), 341–348.
- Koda, T., Kuroda, Y., & Imai, H. (2008). Protective effect of rutin against spatial memory impairment induced by trimethyltin in rats. *Nutrition Research*, 28(9), 629–634.
- Kurisawa, M., Chung, J. E., Uyama, H., & Kobayashi, S. (2003). Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules*, 4(5), 1394–1399.
- La Casa, C., Villegas, I., Alarcon de la Lastra, C., Motilva, V., & Martin Calero, M. J. (2000). Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(1–2), 45–53.
- Levin, D. E., Hollstein, M., & Christman, M. F. (1982). A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A.T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(23), 7445–7449.
- Lin, J. P., Yang, J. S., Lu, C. C., Chiang, J. H., Wu, C. L., Lin, J. J., et al. (2009). Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environmental Toxicology*, 33(6), 823–828.
- Markham, K. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press, pp. 36–93.
- Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113(3–4), 173–215.
- Nagao, M., Morita, N., & Yahagi, T. (1981). Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environmental Mutagenesis*, 3(4), 401–419.
- Steele, V. E., & Kello, V. G. J. (2005). Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591(1–2), 16–23.
- Sun, J., Yao, J. Y., Huang, S., Long, X., Wang, J., & Garcia-Garcia, E. (2009). Antioxidant activity of phenol and anthracynin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith. *Food Chemistry*, 117(2), 276–281.
- Tee, R. W., & Castonguay, A. (1992). Antimutagenic effects of polyphenolic compounds. *Cancer Letters*, 66(2), 107–113.
- Uyama, H., & Kobayashi, S. (2002). Enzyme-catalyzed polymerisation to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19–20, 117–127.
- Uzan, E., Portet, B., Lubrano, C., Milesi, S., Favel, A., Lesage-Meessen, L., et al. (2011). *Pycnoporus* laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(1), 97–105.

Article N°2

***Cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic
potencies of oligorutins***

Ghada Ben Rhouma, Latifa Chebil, Nadia Mustapha, Mounira Krifa,
Kamel Ghedira, Mohamed Ghoul, Leila Chekir-Ghedira

Human & Experimental Toxicology (article in press)



Cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potencies of oligorutins

GB Rhouma^{1,2}, L Chebil¹, N Mustapha², M Krifa²,
K Ghedira¹, M Ghouli¹ and L Chékir-Ghédira^{2,3}

Abstract

Rutin has been enzymatically oligomerized by laccase from *Trametes versicolor*. Five fractions of oligomers were obtained from the monomers having high solubility in water, which can reach 351-times that of rutin. Cytotoxicity of rutin and oligorutin fractions was evaluated towards K562 cells. Oligorutin fractions showed a lower antiproliferative effect compared with its monomer. The genotoxic potential of rutin and oligorutin fractions was assessed, at the limit of the solubility of each molecule, using the comet test. None of the tested concentrations of either rutin or oligorutin fractions has showed a genotoxic effect. Similarly, the antigenotoxic effect of these flavonoids was tested using the same assay. The obtained results showed a higher ability of oligorutin fractions to reduce the genotoxicity induced by hydrogen peroxide compared with monomeric rutin.

Keywords

Oligorutin; comet assay; solubility; cytotoxicity

Introduction

Flavonoids attracted researchers, food manufacturers and consumers due to their antioxidant properties as well as their role in the prevention of various diseases such as cancer and cardiovascular diseases.^{1,2} Recently, attention has been focused on the identification of natural products exhibiting antigenotoxic and/or anticarcinogenic effects.³⁻⁷ The genotoxic and antigenotoxic activities of monomeric flavonoids were reported by some authors.⁷⁻¹⁰ However, few studies have focused on flavonoid oligomer antigenotoxicity. Dhawan et al.¹¹ studied the antigenotoxic effects of monomeric tea polyflavonols (catechin, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin and epigallocatechin gallate) and their dimers using the comet assay. These authors have reported that neither the monomeric nor the dimeric flavonols can reduce the lymphocyte DNA damage induced by the 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole. In the case of rutin, one of the major representatives of flavonoids, it has been demonstrated that it caused cell cycle arrest and induced apoptosis in many types of human cancer cell lines.⁵⁻¹² The oligorutins, synthesized enzymatically via oligomerization reactions of rutin, have high biological activities than rutins.¹³⁻¹⁵ In fact, rutin oligomerization by laccases from

Pycnoporus coccineus and *Pycnoporus sanguineus* led to oligomers with improved superoxide radical activity.¹⁵ Moreover, oligorutins obtained by laccase from *Myceliophthora*, compared with its monomer, present a better inhibition of 2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride radical that is responsible for cell damage.¹⁴ In a recent work, we have shown a high inhibitory effect of oligorutin fractions against the mutagenicity induced by methylmethanesulfonate and 2-aminoanthracene, using the 'Ames' assay' with two *Salmonella typhimurium* strains TA 104 and TA102.¹⁶

¹ Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, ENSAIA-INPL, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

² Unité de recherche pharmacognosie/Biologie moléculaire et cellulaire, Faculté de Pharmacie, University of Monastir, Rue Avicenne, Monastir, Tunisie

³ Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, Faculté de Médecine Dentaire, Université de Monastir, Rue Avicenne, Monastir, Tunisie

Corresponding author:

Leila Chekir-Ghedira, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Dental Medicine, University of Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia.

Email: Leila.chekir@laposte.net

Previous data have shown that rutin and its oligomers have an interesting activity like antioxidant and anticarcinogenic effects. To complete these data, we have investigated, in this article, the cytotoxicity of oligorutins against K562 cells on the one hand and their genotoxic and the antigenotoxic activities in a eukaryotic system using the comet test on the other hand. The obtained results were also compared with those obtained with rutin.

Methods

Obtention of oligorutin fractions

Oligorutin fractions were obtained and characterized as described by Anthoni et al.^{13,17} and by Ben Rhouma et al.¹⁶

Solubility study

The maximum solubility of rutin and oligorutin fractions was evaluated at 20°C in water. Monomer and oligomers (in excess) were added to 50 ml of water, and the reaction media were stirred in agitated reactor at 600 r/min at a constant temperature.

Samples of the solution were withdrawn at several intervals and placed in vials at the same temperature as the solution temperature in order to avoid any precipitation. The samples were then filtered (0.22 µm) and analyzed by SEC-UV (HPLC LaChrom, UV 280 nm LaChrom L-7400, Tosoh TSKgel α 3000 column, 60°C). In all cases, it was found that after 9 h of stirring, the equilibrium of dissolution was reached.

Cell culture

The human chronic myelogenous leukaemia (CML) cell line (K562) was maintained in RPMI 1640 (Invitrogen Life Technology, Cergy Pontoise, France) medium supplemented with 10% foetal bovine serum, L-glutamine (4%) and gentamycine (1%) (all from Sigma Cell Culture, Courtaboeuf, France), in humidified incubator at 37°C and an atmosphere enriched with 5% CO₂. The culture medium was renewed every 2–3 days.

Assay for cytotoxic activity

To control whether the tested concentrations of rutin and its oligomer fractions impacted cell viability, we estimated the viability of K562 cells by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma Aldrich, Courtaboeuf, France)

assay, which is based on the cleavage of a tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenase in viable cells. The *in vitro* test against the human CML cell line K562 was performed essentially according to the method described previously.¹⁸ Cells were seeded in 96-well microtitration plates and incubated overnight. The test samples were dissolved and diluted in RMPI. Twenty four hours after seeding, 100 µl of 1% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, Courtaboeuf, France) in new media or test compounds were added before incubating the plates for a supplementary 48 h. Cells were washed once before adding 50 µl foetal bovine serum-free medium containing 5 mg/ml MTT. After 4 h of incubation at 37°C, the medium was discarded and the formazan blue formed in the cells was solubilized in 50 µl DMSO. Negative control without the tested compound but with DMSO was treated in the same manner. Optical density was measured at 540 nm. The cytotoxicity index (%) was calculated according to the following equation¹⁹

AQ1

$$\% \text{ of cell viability} = \left[1 - \left(\frac{\text{OD of treated cells}}{\text{OD of negative control}} \right) \right] \times 100$$

Comet assay

The comet assay with human lymphocytes was used to detect DNA damage. Before each experiment, frosted microscope slides were precoated with two layers (100 µl) of normal agarose (1% in milli-Q water) and left at room temperature to allow agarose to dry. In order to evaluate whether rutin and its oligomer fractions exhibited or not a genotoxic effect on human lymphocytes, cells were treated during 24 h with different concentrations of the tested substances (100, 200 and 400 µg/ml). They were harvested in phosphate-buffered saline (PBS). The cell dilution (5×10^5 cells in 60 µl) was mixed with an equal volume of low-melting-point agarose (1.2% in PBS). This agarose cell suspension (120 µl) was spread onto each precoated slide and covered with a cover slip. After 10 min on ice, the cover slip was gently removed and the slides were placed in a tank filled with the lysate buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% sodium sarcosinate pH 10, 1% of Triton X-100 and 10% DMSO). They were immersed in this buffer for 1 h (at 4°C, in the dark). The slides were then transferred into the electrophoresis buffer (NaOH 10 N, EDTA 200 mmol/l, pH 13 in deionized water) during 20 min at room temperature

Table 1. \bar{M}_w , IM and PDI of obtained polyrutin fractions.^a

Fractions	\bar{M}_w (g/mol)	PDI	I_M
Rutin (R)	611.21 ± 80.54	1.00 ± 0.012	1 ± 0.0
R1 (permeate on membrane 1 KDa)	2127.42 ± 67.12	1.17 ± 0.03	3.48 ± 0.14
R2 (retentate on membrane 1 KDa)	4301.8 ± 102.72	1.37 ± 0.07	7.05 ± 0.16
R3(permeate on membrane 3 KDa)	5069.93 ± 116.2	1.36 ± 0.04	8.30 ± 0.18
R4 (retentate on membrane 5 KDa)	7106.54 ± 96.62	1.35 ± 0.08	11.64 ± 0.14
R5 (retentate on membrane 15 KDa)	8331.85 ± 146.24	1.42 ± 0.12	13.65 ± 0.22

\bar{M}_w : weight-average molecular mass; PDI: polydispersity; I_M : weight-average molecular mass index; R1, R2, R3, R4, and R5: the polyrutin fractions

^aResults are represented by the means ± SD of three experiments.

in the dark. Electrophoresis was carried out for 15 min at 25 V and 300 mA. Finally, the slides were gently rinsed with neutralization solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for three times of 5 min each. Staining of DNA was accomplished using 50 µl of ethidium bromide (Sigma Aldrich, Courtaboeuf, France) solution at 20 µg/ml in PBS per slide.²⁰ The slides were examined using an epifluorescence microscope (Zeiss Axioskop 20; Carl Zeiss, Microscope Division, Oberkochen, Germany).

In order to study the antigenotoxic effect of rutin and its oligomer fractions, cells were treated in the same manner as for genotoxic study and with the same concentrations, except an additional step with the tested samples after 24 h of incubation, which consists of stressing the treated cells with 75 µM hydrogen peroxide (H₂O₂) during 5 min in ice.

Quantification of the comet assay

A total of 100 comets on each scored slide for each concentration of each molecule were visually scored according to the relative intensity of fluorescence in the tail and classified as belonging to one of the five classes. We utilize three slides for each concentration of each sample, and the experiments were repeated three times. Each comet class was given a value of 0, 1, 2, 3 or 4 (from *undamaged* (0) to *maximally damaged* (4)) as described previously by Collins et al.²¹ The total score of DNA damage was calculated by the following equation

Total DNA damage (TDD) = (percentage of cells in class 0 × 0) + (percentage of cells in class 1 × 1) + (percentage of cells in class 2 × 2) + (percentage of cells in class 3 × 3) + (percentage of cells in class 4 × 4).

Consequently, the total score was ranging from 0 to 400.

The inhibition percentage of tail DNA (%) was calculated relative to DNA damage in the control group cells treated with H₂O₂ only, using the following formula

The inhibition percentage of tail DNA (%) = [1 – (TDD of cells treated with the sample and H₂O₂ – TDD of untreated cells)/(TDD of H₂O₂ treated cells – TDD of untreated cells)] × 100

Statistical analysis

Data were collected and expressed as a mean ± SD of three independent experiments. Statistical analyses were performed by means of analysis of variance test followed by Duncan's multiple comparison test using Statistica (Version 6.0, Statsoft, Inc.) to compare data on DNA damage in cells treated with different concentrations of the tested samples and the genotoxic agent H₂O₂ in the antigenotoxic assay. In the genotoxic assay, damage data of cells treated with different concentrations of rutin and its oligomer fractions were compared with those of the negative control (untreated cells). Statistical differences were determined at $p < 0.05$.

Results

Oligorutin fractions obtaining

Solubility study. The dissolution kinetics of rutin and its oligomer fractions presenting different weight-average molecular mass (\bar{M}_w), polydispersity index (PDI) and weight-average molecular mass index (I_M) (Table 1) was carried out in order to evaluate their limit of solubility. These values are of great importance when realizing the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic tests. Oligorutin fractions exhibited a high solubility compared with monomeric rutin. This solubility increased with increasing \bar{M}_w of

AQ2

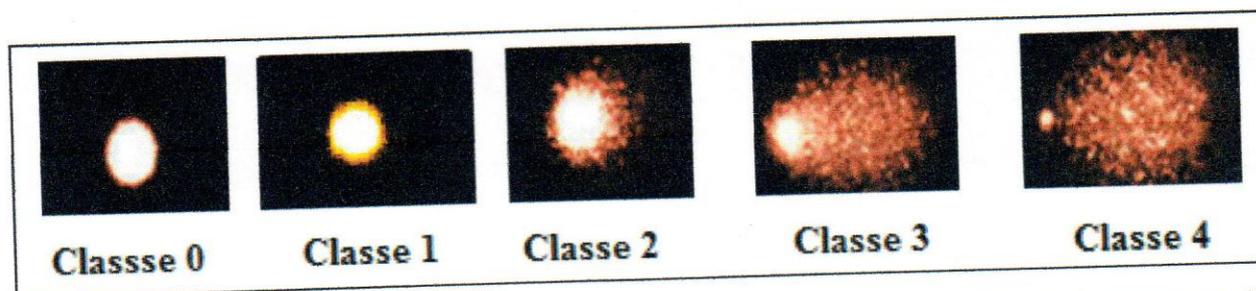


Figure 1. Pictures of different classes of comet in human chronic myelogenous leukaemia K562 cells after treatment with different tested extracts. These comets illustrate examples of the visual scoring classification.

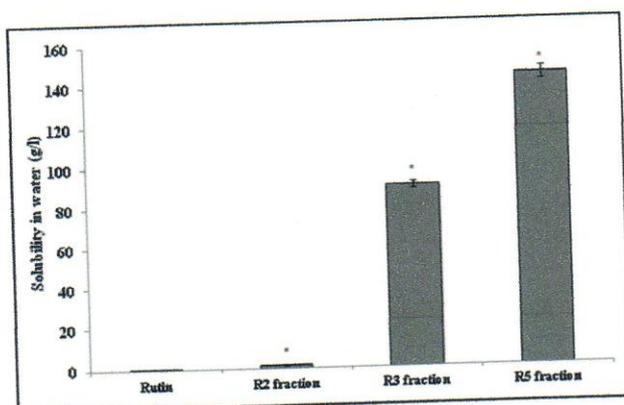


Figure 2. Solubility of rutin and oligorutin fractions in water. R2: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 3-kDa membrane; R3 fraction: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 5-kDa membrane; R5: retentate obtained after diafiltration of oligorutin on a 15-kDa membrane. Values were expressed as mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$ as compared to rutin using ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test. ANOVA: analysis of variance.

oligomer fractions. The oligorutin fraction R5 revealed the highest solubility (144.16 g/l), while rutin solubility was only 0.41 g/l (Figure 1).

Cell viability assay. The relationship between the concentrations of tested flavonoids and their effects on K562 cell viability were investigated by MTT assay. MTT is a yellow water-soluble tetrazolium salt. Metabolically active cells are able to convert the dye to water-insoluble dark blue formazan by reductive cleavage of the tetrazolium ring. Cells were treated with rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) at the concentrations ranging from 50 to 800 $\mu\text{g/ml}$ for 48 h. The results are summarized in Figure 2. Oligorutin fractions exhibited low inhibition of K562 cells viability, which did not exceed 32% at the highest tested dose (800 $\mu\text{g/ml}$) compared with rutin, which showed a considerable cytotoxicity towards K562 cells at the

highest tested dose (800 $\mu\text{g/ml}$) with a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 400 $\mu\text{g/ml}$. We observed a weak relationship between the inhibition of K562 cell viability and the molecular weight of oligorutin fractions (Figure 2). However, rutin and its oligomer fractions inhibit K562 cells viability in a dose-dependent manner.

Comet assay. The induction of DNA damage in human leukaemia K562 cells after exposition to different concentrations of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) for 24 h was studied using the comet assay. This method was reported to be sensitive for detecting DNA strand breaks in individual eukaryotic cells.⁴ Quantification of the comet data is reported as TDD in Table 2. No significant difference was detected between the TDD obtained by incubation with the monomer or its oligomer fractions (TDD ranges from 106 to 110.5) at any tested concentrations (from 50 to 400 $\mu\text{g/ml}$) on one hand, and the negative control (vehicle-treated cells; TDD = 108) on the other hand. In contrast, a significant increase in the TDD (TDD = 223.5) was observed with the positive control corresponding to K562 cells exposed to 75 μM of H_2O_2 compared with the vehicle-treated cells. This result indicated that tested molecules induced no genotoxicity in K562 cells. The alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay was also performed in order to elucidate the antigenotoxicity potential of the rutin and its oligomers fractions, against H_2O_2 -induced DNA damage in K562 cells. It appears that oligorutin fractions were more effective in reducing the genotoxicity induced by 75 μM of H_2O_2 than the corresponding monomer. Rutin decreased the TDD of H_2O_2 -stressed cells in a dose-dependent manner, with a maximum inhibitory percentage of 26% at the highest tested concentration (400 $\mu\text{g/ml}$). Likewise, R2, R3 and R5 fractions decrease the TDD of H_2O_2 -stressed cells to an extent of 39, 45 and 60%. It

Table 2. Genotoxic study of rutin and polyrutin fractions (R2, R3, and R5) against K562 cells.^a

Molecules	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Total DNA Damage
T		108 \pm 6
H ₂ O ₂	75 μM	223.5 \pm 8 ^b
Rutin	100	108.5 \pm 3
	200	107 \pm 4
	400	109.5 \pm 3
R2	100	107.5 \pm 5
	200	106.5 \pm 2
	400	107 \pm 4
R3	100	109 \pm 7
	200	109.5 \pm 4
	400	110.5 \pm 8
R5	100	106 \pm 3
	200	108.5 \pm 4
	400	109.5 \pm 2

R2: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 3-kDa membrane; R3 fraction: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 5-KDa membrane; R5: retentate obtained after diafiltration of oligorutin on a 15-KDa membrane; T: untreated control group; ANOVA: analysis of variance; H₂O₂: hydrogen peroxide.

^aComet assay of genomic DNA of K562 cells treated with different concentration of rutin and polyrutin fractions and H₂O₂. Values were expressed as means \pm SD of three experiments.

^b $p < 0.05$ as compared to the control group using ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test.

appears that R5 fraction is the most efficient in reducing H₂O₂-induced DNA damages on human lymphocytes (Figure 3).

Discussion

Larger molecules such as the flavonol oligomers, which are also present in significant amounts in food and beverages, have only recently attracted attention.^{22,23} In a recent study, grape procyanidins such as B5-3'-gallate were shown to possess strong antioxidant activity.²⁴

Many of these compounds are already used in pharmaceutical, cosmetic and food preparations. Unfortunately, the use of some of them is limited by their low solubility and stability in both lipophilic and aqueous media. Therefore, to improve these properties, different techniques of derivatization are suggested, among them is the enzymatic polymerization.

Our study showed that oligomerization of rutin increases its solubility in water. Anthoni et al.¹³ reported that this solubility reached 4200-folds that of rutin in water. Unlike Anthoni et al.,¹³ who studied the solubility of total obtained oligorutin without

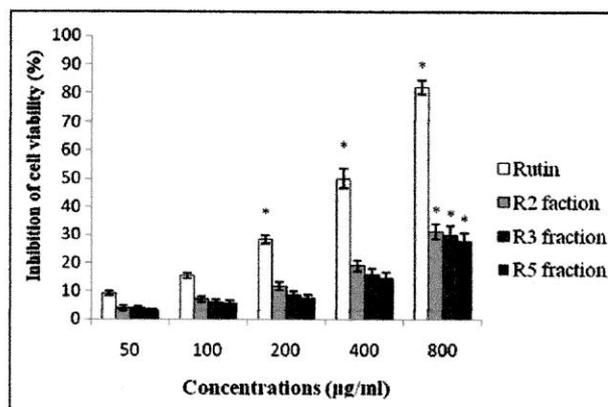


Figure 3. Effect of different concentrations of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) on K562 cell viability. R2: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 3-kDa membrane; R3 fraction: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 5-KDa membrane; R5: retentate obtained after diafiltration of oligorutin on a 15-KDa membrane. The percentage of cell viability was measured by MTT assay. Results are represented by the means \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ as compared to the control group using ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test. ANOVA: analysis of variance; MTT: 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide.

separation, we tried to elaborate the study of oligorutin solubility by focusing on the effect of oligorutin fractions \bar{M}_w . Indeed, we demonstrated that the solubility increased with increasing \bar{M}_w of oligomer fractions.

The high water solubility of oligorutin may be due to the structure of oligorutin; in fact, it has been shown through a molecular modelling study that, in water, rutin showed a folded structure where the rhamnose and the ring A became closer together, while oligorutin (hexamer) revealed an unfolded structure where sugars offer a large contact with the surrounding solvent.¹³

The biological activities of monomeric rutin and in particular its cytotoxicity were well established by many authors.^{9,25,26} The objective of the present study was to evaluate the effect of polymerization of flavonoids on their solubility in water in a first step, then on their capacity to protect biological systems against oxidative DNA damages. In fact, free radicals are frequently associated with DNA damage induction in cells, and thus with carcinogenesis processing. We chose to evaluate whether oligomerization of flavonoids should imply better antigenotoxicity than monomer and thus better roles in cancer chemopreventive. In fact, different flavonoids were reported to modulate DNA repair in cells treated with a genotoxicant^{6,27-29} at non-toxic concentrations. The mutagenic and

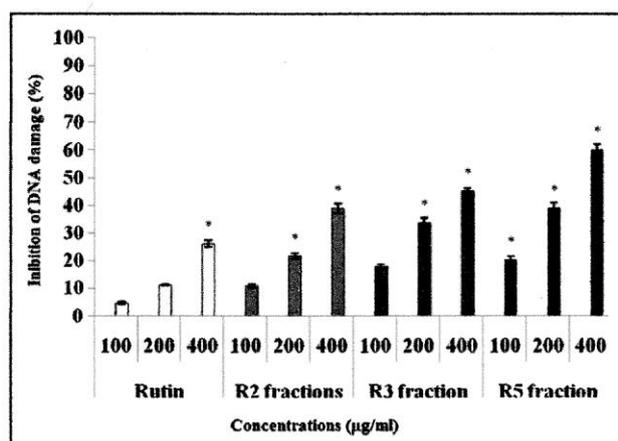


Figure 4. Inhibitory effects of rutin and oligorutin fractions R2, R3 and R5 on the genotoxicity induced by H_2O_2 in K562 cells. R2: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 3-kDa membrane; R3 fraction: permeate obtained after diafiltration of oligorutin on a 5-kDa membrane; R5: retentate obtained after diafiltration of oligorutin on a 15-kDa membrane. Values were expressed as mean \pm SD of three experiments. * $p < 0.05$ as compared to the control group using ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test. ANOVA: analysis of variance; H_2O_2 : hydrogen peroxide.

antimutagenic activities of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) were studied in our laboratory using the Ames' test on a prokaryotic system.¹⁶ This study demonstrated an interesting antimutagenic activity in the presence of oligorutin fractions on two *Salmonella* strains TA104 and TA102.¹⁶ However, it seems essential to confirm these results on a prokaryotic system; therefore, we used the comet test to evaluate the genotoxic and antigenotoxic activities in a eukaryotic system. Our purpose of this study is to ameliorate protective capacities of flavonoids by increasing their solubility using polymerization process. As continuous cell lines represent an attractive easy-to-use model, we adopted this eukaryotic system to evaluate non-toxic range concentrations of both the tested monomer and its corresponding oligomer fractions. It appears from the results obtained in this study that more the \bar{M}_w of the tested oligomer fractions is elevated, more its cytotoxicity using a eukaryotic system, is weak and more its protective effect against radical inducing DNA damages in the same system is important, suggesting that these compounds may possess anticarcinogenic activity by suppressing DNA damaging.

In accordance to previously reported studies,^{9,25,26,30} we showed that the monomer rutin exhibited a cytotoxic effect especially at the highest tested dose (800 $\mu\text{g/ml}$).

The cytotoxicity of flavonoids was studied by Plochmann et al.³¹ These authors had established the structure-activity relationship of flavonoids cytotoxicity. They reported that the presence of a $C_2=C_3$ double bond on C-ring of flavonoids structure could increase 3- to 10-fold the cytotoxicity compared with flavonoids without a $C_2=C_3$ double bond. The important role of the $C_2=C_3$ double bond in enhancing the cytotoxicity was also supported by other authors.³²⁻³⁵ Moreover, flavonoids with a C4 carbonyl group were found to be 30-fold more cytotoxic than flavonoids without this functional group.^{33,34} Decrease in cytotoxicity in the presence of oligorutin fractions compared to the monomeric rutin could be attributed to the fact that the $C_2=C_3$ double bond and/or the C4 carbonyl group were affected during the rutin oligomerization.

Flavonoids are known to protect cellular compounds due to their antioxidant and free radical scavenging effects.^{1,12,13} However, we can not exclude the existence of flavonoids with pro-oxidant properties.²

Rutin and its oligomer fractions (R2, R3 and R5) did not damage DNA at different tested concentrations. Indeed, there is no difference between the tail DNA of the untreated cells and those treated with the monomer or its oligomer fractions; this indicates that DNA does not seem to be relevant target for these flavonoids. The absence of genotoxicity of rutin using the comet assay is in accordance with the results of many studies.^{3,7,31,36}

The protective effect of rutin and oligorutin fractions against the DNA damage induced by H_2O_2 in K562 cells was studied using the comet assay (Figure 4). Oligorutin fractions revealed significant antigenotoxic activity compared with rutin. This activity was dose dependant and proportional to the \bar{M}_w . Barcelos et al.³³ reported an antigenotoxic effect of the monomeric rutin against DNA damage induced by three mutagenic agents (Aflatoxin B1, methyl methanesulfonate and doxorubicin) using the comet test. The observed high-antigenotoxic activity of oligorutin fractions could be explained by the fact that these fractions acted as strong desmutagenic agent (compounds that act directly on mutagens or their precursors and inactivate them). Kurisawa et al.¹⁴ showed that oligorutins obtained after enzymatic oligomerization of rutin by laccase from *Myceliophthora*, exhibited stronger scavenging power against hydroxyl radical compared with rutin. This could explain the significant protective ability of oligorutin fractions against H_2O_2 -inducing DNA damages. In fact, H_2O_2

AQ4

AQ5

AQ3

should act by releasing OH· radicals, which are responsible for macromolecule (as DNA) damages. However, this finding cannot exclude that oligorutin fractions could act as both desmutagenic and bioantimutagenic agents. In fact, it has been demonstrated that the monomeric rutin acts using these two ways.^{37,38}

Several works reported the structure–activity relationship of different flavonoids. Hatch et al.³⁶ indicated that the 4-keto substituent at C4 of the C ring, the presence of a C2=C3 double bond and the planarity of the C ring were required for antimutagenic activity of flavonoids. The structure–activity relationship advanced by Hatch et al.³⁶ was confirmed by Edenharder and Tang,¹⁰ who investigated the antimutagenic effect of 56 flavonoids against the mutagenicity induced by 2-nitrofluorene, 2-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene in *S. typhimurium* TA98. Thus, the high antimutagenic activity of oligorutin fractions against toxicity induced by H₂O₂ reinforces the assumption that the 4-keto substituent at C4 and the C2=C3 double bond were not affected during the rutin oligomerization.

Conclusion

Oligorutin fractions (R2, R3 and R5) were characterized by high solubility in water especially in the presence of oligorutin fractions having the highest M_w . The studied oligomers exhibited low inhibition capacity of the K562 cell proliferation and a high antigenotoxic activity against H₂O₂-induced toxicity. This behaviour seemed to be correlated to the high antioxidant capacity of these fractions. In fact, in our previous study, we revealed that the oligorutins were characterized by high antioxidant activity.¹³ Antigenotoxicity of oligorutin fractions demonstrated using the comet assay, and report in the present study is in accordance with antigenotoxic effect of the same fractions that we tested against prokaryotic systems. Contrarily, Dhawan et al.¹¹ have shown that dimeric polyphenols did not afford any significant protection against the 1mutagenic effect of a range of food carcinogens. It appears that the dimeric polyphenols did not prevent the DNA damage induced in human lymphocytes by Trp-P-2. According to these authors¹¹ it appears unlikely that these compounds may have an anticarcinogenic effect through impairment of the binding of the carcinogen to DNA. However, Zhao et al.²⁴ suggested that these compounds may possess anticarcinogenic activity by suppressing the promotion stage of carcinogenesis.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Lorraine region in France.

Funding

This work was supported by Ministère Français des Affaires Etrangères (Institut Français de Coopération (IFC) and the Ministry of Higher Education and Scientific Research in Tunisia.

Conflict of interest

The authors declared no conflicts of interest.

References

1. Masuoka N, Matsuda M Kubo I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. *Food Chem* 2012; 131: 541–545.
2. Cao G, Sofic E Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 749–760.
3. Ramos AA, Lima CF, Pereira ML, Fernandes-Ferreira M Pereira-Wilson C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. *Toxicol Lett* 2008; 177: 66–73.
4. Aruoma OI. Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radic Res* 1999; 30: 419–427.
5. Lin JP, Yang JS, Lin JJ, Lai KC, Lu HF, Ma CY, et al. Rutin inhibits human leukemia tumor growth in a murine xenograft model in vivo. *Environ Toxicol* 2012; 27: 480–484.
6. Sharma RK Sharma B. In-vitro carbofuran induced genotoxicity in human lymphocytes and its mitigation by vitamins C and E. *Dis Markers* 2012; 32: 153–163.
7. Charles C, Chemais M, Stévigny C, Dubois J, Nachergael A Duez P. Measurement of the influence of flavonoids on DNA repair kinetics using the comet assay. *Food Chem* 2012; 135: 2974–2981.
8. Chulasiri M. Mutagenicity and antimutagenicity of flavonoids extracted from *Millingtonia hortensis* L. *Toxicol Sci* 1998; 23: 224–228.
9. Marcarini JC, Ferreira Tsuboy MS, Cabral Luiz R, Regina Ribeiro L, Beatriz Hoffmann-Campo C Ségio Mantovani M. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63: 459–465.
10. Edenharder R Tang X. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 357–372.

11. Dhawan A, Anderson De Pascual-Teresa DS, Santos-Buelga C, Clifford MN Ioannides C. Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced DNA damage in human lymphocytes using the comet assay. *Mutat Res-Gen Tox Environ* 2002; 515: 39–56.
12. La Casa C, Villegas I, Alarcon de la Lastra C, Motilva V Martin Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 45–53.
13. Anthoni J, Lionneton F, Wieruszkeski JM, Magdalou J, Engasser JM, Chebil L, et al. Investigation of enzymatic oligomerization of rutin. *Rasayan J Chem* 2008; 1: 718–731.
14. Kurisawa M, Chung JE, Uyama H Kobayashi S. Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules* 2003; 4: 1394–1399.
15. Uzan E, Portet B, Lubrano C, Milesi S, Favel A, Lesage-Meessen L, et al. Pycnopus laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90: 97–105.
16. Ben Rhouma G, Chebil L, Krifa M, Ghoul M Chékir-Ghédira L. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of oligorutin and oligoesculin. *Food chem* 2012; 135: 1700–1707.
17. Anthoni J, Humeau C, Maia E, Chebil L, Engasser JM Ghoul M. Enzymatic synthesis of oligoesculin: structure and biological activities characterizations. *Eur Food Res Tech* 2010; 231: 571–579.
18. Lee KT, Sohn IC, Park HJ, Kim DW, Jung GO Park KY. Essential moiety for antimutagenic and cytotoxic activity of hederagenin monodesmosides and bisdesmosides isolated from the stem bark of kalopanax pictus. *Planta Med* 2000; 66: 329–332.
19. Scassellati-Sforzolini G, Villarini LM, Moretti LM, Marcarelli LM, Pasquini R, Fatigoni C, et al. Antigenotoxic properties of *Terminalia arjuna* bark extracts. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1999; 18: 119–125.
20. Moongkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N Neungton N. Antiproliferation, antioxidant and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol* 2004; 90: 161–166.
21. Collins A, Dusinská M, Gedik CM Stětina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 1996; 104: 465–469.
22. de Pascual-Teresa S, Treutter D, Rivas-Gonzalo JC Santos-Buelga C. Analysis of flavanols in beverages by high-performance liquid chromatography with chemical reaction detection. *J Agr Food Chem* 1998; 46: 4209–4213.
23. Catterall F, Souquet JM, Cheyner V, De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Clifford MN, et al. Differential modulation of the genotoxicity of food carcinogens by naturally occurring monomeric and dimeric polyphenolics. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 86–98.
24. Zhao J, Wang J, Chen Y Agarwal R. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1737–1745.
25. Lee CS, Park SY, Ko HH Han ES. Effect of change in cellular GSH levels on mitochondrial damage and cell viability loss due to mitomycin c in small cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1857–1867.
26. Romero I, Páez A, Ferruelo A, Luján M Berenguer A. Polyphenols in red wine inhibit the proliferation and induce apoptosis of LNCaP cells. *Br J Urol* 2002; 89: 950–954.
27. Hayder N, Bouhlel I, Skandrani I, Kadri M, Steiman RG, Guiraud P, et al. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from myrtus communis: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicol in Vitro* 2008; 22: 567–581.
28. Bhouri W, Boubaker J, Kilani S, Ghedira K Chekir-Ghedira L. Flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): kaempferol 3-O-beta-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-beta-isorhamninoside protect against DNA damage in human lymphoblastoid cell and enhance antioxidant activity. *S Afr J Bot* 2012; 80: 57–62.
29. Abdelwahed A, Bouhlel I, Skandrani I, Valenti K, Kadri M, Guiraud P, et al. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from pistacia lentiscus: confirmation by microarray expression profiling. *Chem Biol Interact* 2007; 165: 1–13.
30. Kennedy DO, Kojima A, Moffatt J, Yamagiwa H, Yano Y, Hasuma T, et al. Cellular thiol status-dependent inhibition of tumor cell growth via modulation of retinoblastoma protein phosphorylation by (-)-epigallocatechin. *Cancer Lett* 2002; 179: 25–32.
31. Plochmann K, Korte G, Koutsilieris E, Richling E, Riederer P, Rethwilm A, et al. Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Arch Biochem Biophys* 2007; 460: 1–9.

32. Chang H, Mi M, Ling W, Zhu J, Zhang Q, Wei N, et al. Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells *in vitro*. *Arch Pharm Res* 2008; 31: 1137–1144.
33. Lopez-Lazaro M, Gálvez M, Martin-Cordero C, Ayuso MJ, Attaur R. Cytotoxicity of flavonoids on cancer cell lines. Structure-activity relationship. *Stud Nat Prod Chem* 2002; 27: 891–932.
34. Sahu SC, Gray GC. Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett* 1996; 104: 193–196.
35. Macgregor JT, Jurd L. Mutagenicity of plant flavonoids: structural requirements for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res Envir Mutat* 1978; 54: 297–309.
36. Hatch FT, Lightstone FC, Colvin ME. Quantitative structure-activity relationship of flavonoids for inhibition of heterocyclic amine mutagenicity. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 279–299.
37. Da Silva J, Herrmann SM, Heuser V, Peres W, Possa Marroni N, Gonzalez-Gallego J, et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 941–947.
38. Barcelos GM, Grotto D, Angeli JPF, Serpeloni JM, Rocha BA, Bastos JK, Barbosa FJ. Evaluation of anti-genotoxic effects of plant flavonoids quercetin and rutin on HepG2 cells. *Phytother Res* 2011; 25: 1381–1388.
39. Cristina Marcarini J, Ferreira Tsuboy MS, Cabral Luiz R, Regina Ribeiro L, Beatriz Hoffmann-Campo C, Sagio Mantovani MR. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63: 459–465.

Article N°3

***Comparison of ABTS, DPPH, deoxyribose,
xanthine oxidase inhibition and CUPRAC assays
of polyrutin and polyesculin***

Ghada BEN RHOUMA, Latifa CHEBIL, Leila CHEKIR-GHEDIRA,

Mohamed GHOUL

Article soumis à Food composition and analysis

**Comparison of ABTS, DPPH, deoxyribose, xanthine oxidase inhibition and CUPRAC
assays of polyrutin and polyesculin**

**Ghada BEN RHOUMA^{a,b}, Latifa CHEBIL^{a*}, Leila CHEKIR-GHEDIRA^{b,c}, Mohamed
GHOUL^a**

^a Laboratoire d'Ingénierie des biomolécules, ENSAIA-INPL, Nancy Université, 2 av. de la Forêt de Haye, 54500, Vandoeuvre-lés-Nancy, France.

^b Unity of Pharmacognosy/Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia.

^c Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Dental Medicine, University of Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia.

* Corresponding author: Dr. Latifa CHEBIL, Laboratory of Biomolecular Engineering, National School of Agronomy and Food Industries, National Polytechnics Institute of Lorraine ENSAIA-INPL, 54505 Vandoeuvre les Nancy, France. Tel: +33383595859. E-mail : latifa.chebil@ensaia.inpl-nancy.fr

Abstract

Rutin and esculin have been enzymatically polymerized by laccase from *Trametes versicolor*. Five fractions of polymers were obtained from each monomer. These fractions were characterized by determining their weight-average molecular mass (\overline{M}_w), polydispersity (PDI) and weight average molecular mass index (I_M) of obtained fractions were determined. FTIR analysis showed that polyrutin fractions were composed of phenylene and oxyphenylene units, while polyesculin fractions were obtained through C-C linkages. Antiradical activities polymers were studied against different radicals (ABTS⁺⁺, DPPH[•] and hydroxyl radical). Results showed low antiradicals ability of polyrutin fractions with CI_{50} of 272, 110 and 172 μ M against respectively ABTS⁺⁺, DPPH[•] and hydroxyl radical, compared to 31, 11 and 18.6 respectively in presence of monomeric rutin. However polyesculin fractions illustrated high scavenging radical ability with CI_{50} which reached 10, 12.6 and 17 μ M respectively against ABTS⁺⁺, DPPH[•] and hydroxyl radical, compared to esculin. Both polyrutin and polyesculin fractions exhibited a high Xanthine oxidase inhibition activity (with CI_{50} of 64.1 and 186 μ M respectively for polyrutin and polyesculin), iron chelating (with CI_{50} of 27.5 and 31.5 μ M respectively for polyrutin and polyesculin) and cupric reducing antioxidant capacities (with TEAC of 527 and 498 μ M in presence of polyrutin and polyesculin)

Keywords: Polyrutin and polyesculin polymerization; antiradical activity; Xanthine oxidase inhibition; Iron chelating activity; CUPRAC activity.

Abbreviation: AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride ; ATR: Attenuated Total Reflectance; CuCl₂: Copper (II) chloride; DMF: dimethylformamide; DMSO: dimethyl sulfoxide;; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; FTIR: Fourier Transformed InfraRed analysis;; HOMO: Highest occupied molecular orbital; HRP: Horseradish peroxidises; I_M :

weight average molecular mass index; LiBr: Lithium bromide; \overline{M}_n : Number-average molecular mass; \overline{M}_w : Weight-average molecular mass; NH₄Ac: Ammonium acetate; NH₄Ac: Ammonium acetate; TBA: Thiobarbitulic acid; TCA: Trichloroacetic; TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity; XO: Xanthine oxidase

1. Introduction

The last years polyphenols have gained great attention due to their biological and pharmacological activities. Their anti-inflammatory, antioxidant, antimutagenic, anticarcinogenic and antiviral properties were studied in many in vivo and in vitro systems (Bhourri et al., 2011; Bordoni et al., 2002; Chen et al., 2011; Nakagawa et al., 1999; Takano et al., 2004; Yamamoto & Gaynor, 2001; Yoshino et al., 2004). It seemed that these properties were potentially beneficial in preventing diseases and protecting genome stability. In fact, many of these activities were related to the antioxidant activities of polyphenols (Ben Sghaier et al., 2011; Bhourri et al., 2011; Jovanovic et al., 1994; Yen & Chen., 1995). However, depending on their structure, the processability of these compounds was limited by their weak stability and low solubility in organic or aqueous solvents (Bruno et al., 2010; Tommasini et al., 2004). With a view to improve these properties, derivatization of phenolic compounds by enzymatic polymerization was reported by several authors (Kurisawa et al., 2003 a; Kurisawa et al., 2003 b; Racicot et al.). So, it is a useful alternative to chemical catalysis because it can be realized without less hazardous. The two principal enzymes family used in phenolic compounds polymerization process were the laccases and peroxidases. Horseradish peroxidases (HRP) are H₂O₂ dependent. HRP are used in several work to catalyze the polymerization of catechin (Bruno et al., 2005; Kurisawa et al., 2003 a; Mejias et al., 2002), catechol (Nabid et al., 2011), quercetin, rutin, isoflavone daidzein, 5, 6, 4'-trihydroxyisoflavone (Mejias et al., 2002), 4-hydroxybiphenol (Angerer et al., 2005; Tseitlin, Beksaev & Medzhitov, 2006), 4-[(4-phenylazo-phenylimino)-methyl]-phenol (Turac & Sahmetlioglu, 2010), and phenols in various solvents, solvent-aqueous buffers mixture, buffers (Akita et al., 2001) and in ionic liquids at room temperature (Eker et al., 2009).

Laccase are also indicated as an efficient catalyst for polymerization of phenolic compounds (Kobayashi et al., 2001). Compared to HRP, laccase-catalyzed polymerization, in air, without

the use of hydrogen peroxide as an oxidizing agent. Laccase from different origin (*Trametes versicolor*, *Myceliophthora*, *Agaricus bisporus*, *Ustilago maydis*, *Trametes pubescens*, *Pycnoporus coccineus*, *Pycnoporus sanguineus*) have been described for the polymerization of phenolic compounds as rutin (Anthoni et al., 2008; Desentis-Mendoza et al., 2006; Kurisawa et al., 2003 b; Uzan et al., 2011), esculin (Anthoni et al., 2010), methoxyphenols, gallic acid, caffeic acid, vanillin, Kaempferol, quercetin (Desentis-Mendoza et al., 2006).

As it has been mentioned previously one of the problem in the use of phenolic compound, was their weak solubility. The first results of enzymatic polymerization reported that the obtained polymers of rutin and esculin were 4200-folds and 189-folds more water soluble than rutin and esculin, respectively (Anthoni et al., 2008; Anthoni et al., 2010). The solubility of polyrutin was also increased in dimethylformamide (DMF) and dimethyl sulfoxide (DMSO) (Kurisawa et al., 2003 b).

Enzymatic polymerization of phenolic compounds affected also their biological properties. These properties, including antioxidant activities, might be dependent on the molecular weight of the synthesized polymers and the type and the position of the linkages (\overline{M}_w , PDI, C-C or C-O bridges). Moreover, depending on the used method for determining antiradical activity (AAPH, DPPH, ...) of polyphenols, results were controversial.

As an example, rutin polymerized by laccase from *Pycnoporus coccineus*, *Pycnoporus sanguineus* or *Myceliophthora* led to polymers with a better inhibition of AAPH radical, compared to its monomer (Kurisawa et al., 2003 b; Uzan et al., 2011). However, Anthoni *et al.* (Anthoni et al., 2008) reported that polyrutin, obtained by laccase from *Trametes versicolor* polymerization, had a weaker DPPH radical scavenging activity compared to rutin. This behavior could be due either to the used method of antioxidant activity determination or the degree of polymerization. For other phenolic compounds, like catechin, kaempferol, esculin and 8-hydroquinoline, polymerization enhanced inhibition effects against free radicals

including-oxidation of low-density lipoprotein (LDL) (Kurisawa et al., 2003 b) and DPPH radical (Desentis-Mendoza et al., 2006).

Using xanthine oxidase inhibition test, it was well established that enzymatic polymerization of phenolic compounds (rutin, esculin, catechin and epigallocatechin gallate) increased antioxidant activity. (Anthoni et al., 2008; Anthoni et al., 2010; Kurisawa et al., 2003 a; Kurisawa et al., 2003 b).

Furthermore, the polymerization of 3-methylcatechol by Kawakita et al. (Kawakita et al., 2009) led to the formation of polymers with high copper ions adsorption power.

The aim of this work was in one hand, to compare the effect of polymerization on the antioxidant activity of rutin and esculin (Figure 1) and in other hand, to discuss the structure-antioxidant activity relationship. Poly rutin and polyesculin were synthesized by laccase from rutin and esculin, respectively, and carefully separated in different fractions by diafiltration process. Antioxidant activity was evaluated by radical scavenging activity, iron chelating capacity, xanthine oxidase inhibition activity, cupric reducing capacity.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Laccase from *Trametes versicolor* (E.C. 1.10.3.2., 21.4 U mg⁻¹), rutin hydrate (98%), esculin hydrate (98%), ascorbic acid, 2-deoxyribose, trichloroacetic acid (TCA), thiobarbitulic acid (TBA), dimethylsulfoxide (DMSO), 2,2'-azino-bis(3methylbenzenothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were purchased from Sigma-Aldrich. All used solvents were HPLC grade from VWR.

2.2. Methods

2.2.1. Polymerization reaction

Polymerization reaction was carried out in the same operating conditions described by Anthoni et al (Anthoni et al., 2008; Anthoni et al., 2010). Rutin or esculin (50 g/L) was suspended in 1L of a methanol/ water (30:70 v/v) reaction medium. Laccase solution (3 U/mL) was added to the mixture. The reaction was stirred at 600 rpm, for 24 h for rutin and 72 h for esculin, at 20 °C. We noticed that rutin polymerization reaction didn't evolve beyond 24 h, whereas, esculin polymerization reaction continued till 72h. The Kinetic of polymerization reaction was followed with size exclusion chromatography (SEC).

2.2.2. Polymers separation and lyophilization

Final reaction media enriched with rutin and esculin polymers was separated, by successive filtration processes on a 15, 5, 3 and 1 KDa membranes in diafiltration process (INSIDE CeRAM™), using a mixture of water/methanol (70:30 v/v) (5 liters) as eluent, at 50°C. The transmembranaire pressure (ΔP) was fixed at 2 bars. The state permeate flux (F) was in the range of 35 l/h/m². Then, the fractions were lyophilized (Christ Alpha 1-2 LD freeze dryer). Five fractions were thus obtained and characterized (Table 1).

2.2.3. Seize exclusion chromatography analysis (SEC)

Relative masses of polymers were evaluated by size exclusion chromatography (SEC) (HPLC LaChrom, UV 280 nm LaChrom L-7400, Tosoh TSKgel α 3000 column, 60 °C). Dimethylformamide (DMF) with 1 % LiBr was used as a mobile phase (0.5 mL/min). Molecular mass calibration was obtained using standards of polystyrene and polystyrene sulfonate. The obtained data allowed the determination of number-average molecular mass (\overline{M}_n), weight-average molecular mass (\overline{M}_w), weight-average molecular mass index (I_M) and polydispersity (PDI) as described by Faix et al. (Faix, Lange & Salud, 1981).

2.2.4. UV analyzes

The UV spectra of rutin, esculin solutions and their obtained polymers fractions were determined using a UV6000LP spectrometer (Spectra System, Thermofinnigan).

2.2.5. FTIR analysis

The IR analyses were conducted by ATR-FT-IR spectroscopy using a FT-IR spectrometer Tensor 27 (Bruker). The analysis was carried out on monomers and polymers lyophilized powders.

2.2.6. Radical scavenging on ABTS^{•+}

The assay was conducted according to protocols presented by Re et al. (Re et al., 1999) and Van den Berg et al. (Van den Berg et al., 2000). To generate the ABTS^{•+} radical, the ABTS stock solution (7 mM) and potassium persulphate (2.45 mM) in water were allowed to stand in the dark at room temperature for 12-16 h before use. For the reaction, 10 µl of each sample at various concentrations (from 800 to 0.25 µM) was added to 990 µl of diluted ABTS^{•+} (absorbance 0.7 at 734 nm) and the absorbance was recorded every min. A standard curve was prepared using a series of concentrations of trolox (from 0 to 15 µM) with 990 µl of diluted ABTS^{•+} solution. The radical scavenging capacity of tested samples was calculated based on the trolox standard curve and expressed as the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and as IC₅₀.

2.2.7. Radical scavenging activity on DPPH[•]

The free radical scavenging capacity of the esculin and rutin and their polymers was determined with 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl as described by Burda et Oleszek (Burda & Oleszek, 2001). A solution of 1 ml of monomers or polymers (from 10² to 4 10⁴ µM, concentrations were calculated from \overline{M}_w) in methanol, was mixed with 2 ml of DPPH (10 mg/L in methanol/water, 80:20, v/v). A reference sample was prepared by adding 1 ml of methanol in 2 mL of DPPH solution. Monomers and polymers absorbance for each concentration was evaluated at 527 nm, after 15 min, at 23 °C. The antiradical activity was calculated as a percentage of DPPH discoloration using the following equation:

$$\text{Antiradical activity} = \left(1 - \frac{\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of polymers}}{\text{absorbance of reference}}\right) \times 100$$

The results were expressed as IC₅₀ and TEAC according to the calibration curve (from 0 to 5 µM)

2.2.8. Inhibitory effect on deoxyribose degradation

Inhibitory effects of tested compounds on deoxyribose degradation were determined by measuring the competition between deoxyribose and these compounds for the hydroxyl radicals generated from the Fe³⁺/ascorbate/EDTA/H₂O₂ system (referred to non site-specific assay) or Fe³⁺/ascorbate/H₂O₂ system (referred to site-specific assay which could indicate the hydroxyl scavenging power of tested molecules by iron chelating power) according to the method described by Halliwell et al (Halliwell, 1991) with slight modifications.

The tested sample was added to the reaction mixture containing deoxyribose (10 mM), Fe(III) chloride (10 mM), EDTA (1 mM), and H₂O₂ (10 mM), ascorbic acid (1 mM), 1mM H₂O₂ and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4). The mixture was incubated for 1 h at 37°C, TBA (1%) and TCA (2.8%) were added to the above mixture, and then heated for 90 min on water bath at 80 °C. The absorbance at 532 nm was then measured against a blank containing deoxyribose and buffer. For site-specific hydroxyl radical scavenging activity, the procedure was similar to the above method, except that EDTA was replaced by the equivalent volume of buffer. The gallic acid was used as a standard. The percentage of deoxyribose degradation inhibition was calculated using the following equation:

$$PI (\%) = (1 - A_S/A_C) \times 100$$

where A_C = absorbance of negative control and A_S = absorbance of sample solution.

Results of deoxyribose assay in the presence and the absence of EDTA are expressed as IC₅₀ and as TEAC

2.2.9. Xanthine oxidase inhibition assay

The tested samples were solubilized in phosphate buffer (pH 7.5, 50 mM), except rutin which was dissolved in a minimum of DMSO (5 µl) and then in buffer. The assay was conducted as

described by Kong et al. (Kong et al., 2000). Tests solutions were prepared by adding 1600 μL of buffer, 300 μL of tested solutions (from 4×10^{-6} to 10^{-3} M), 1000 μL of a solution of xanthine (0.15 mM) and 100 μL of a solution of xanthine oxidase (0.2 U/mL). The reaction was monitored for 6 min at 295 nm. Two samples were prepared, the first without tested solutions to determine the total uric acid production, and the second without enzyme to measure the absorbance of tested solutions at 295 nm for the range of concentrations. Results were expressed as the final concentration that results in half-maximal enzyme velocity (IC50) and calculated by standard curve regression analysis and as TEAC according to the calibration curve (from 1×10^{-3} to 5×10^{-1} μM)

2.2.10. Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

The cupric reducing antioxidant capacity was determined according to the method of Apak et al. (Apak et al., 2004). To each tube containing 20 μl of tested substrate concentration, we added CuCl_2 to a final concentration of 3.12 mM, ethanolic neocuproine solution and NH_4Ac buffer solution (pH=7) to final concentrations of 2.34×10^{-3} M and 312 mM, respectively. The total volume was then adjusted with distilled water to 2 ml and mixed well. Absorbance against a reagent blank containing all reagents except CuCl_2 and neocuproine was measured at 450 nm after 1h. The results were expressed as equivalent of Trolox according to the calibration curve (from 10 to 10^3 μM).

3. Results

3.1. Polymers synthesis, separation and characterization

Kinetics of esculin and rutin polymerization were monitored by SEC-UV at 280 nm and reported successively in figure 2 and S1 in supplementary data. Once the polymerization was achieved, polymers were separated, by successive diafiltration process. Weight-average molecular mass \overline{M}_w , polydispersity (PDI) and weight average molecular mass index (I_M) of obtained fractions (R1-5 and E1-5) were summarized in table 1.

These results indicated clearly that the polymerization of the two substrates was occurred and led to polymers of rutin and esculin with high molecular weight.

3.2. FTIR and UV investigations

The UV-visible spectrum of rutin, in methanol/water (30/70 v/v), presented two maxima of absorption at 282 and 359 nm due to the π - π^* transition of the aromatic electrons. For polyrutin fractions (R1, R3 and R5) the 359 nm band was larger and presented a hypsochromic shift of 5 nm. Such results could be due to the implication of the B ring of rutin in the formation of polymers. In fact, Anthoni *et al.*, (Anthoni *et al.*, 2008) and Markham (Markham, 1982) observed a similar behavior. The latter stated that the presence of a substitution on the 5, 7 and 4' positions of the phenolic rings led to a hypsochromic shift.

The UV spectra of esculin and polyesculin fractions E2, E3, E4 and E5 presented the same peaks with a maximum of absorption at 345 nm while the peaks correspondent to E5 were broader than those of esculin, which could be attributed to conjugated oligomeric structure (Bilici *et al.*, 2010; Kurisawa *et al.*, 2003 b). The same profile was reported by Anthoni *et al.* for the esculin polymerization (Anthoni *et al.*, 2010).

FTIR spectra of rutin and polyrutin fractions (R1, R3 and R5), showed a new peaks at 1220 cm^{-1} and at 1465 cm^{-1} . The peak at 1220 cm^{-1} indicated the formation of new ether bonds C-O. The signal at 1465 cm^{-1} could be attributed to a bond C-C while the absence of a peak at 1747 cm^{-1} on the R1 spectra compared to rutin spectra could be explained by the disappearance of C-H bonds. These results showed that obtained polyrutin fractions were formed through C-C and C-O linkages. In fact, many authors reported that flavonoid polymers were composed of phenylene units and/or oxyphenylene units (Anthoni *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2001 ; Uyama & Kobayashi, 2002). Uzan *et al.* (Uzan *et al.*, 2011) reported that the nucleophilicity of the aromatic A-ring seemed to play a major role as the reactive hydroxylated ring in coupling reactions for the formation of a new bond. They suggested that polymerization of

rutin by *Pycnococcus* laccases led to formation of polymers through C-C and C-O bonds and more precisely through C8-C8, C6-O4' and C8-C5' linkages. A study of the polymerization of quercetin by Bruno et al. (Bruno et al., 2010) with Horseradish peroxidase (HRP) showed that the highest occupied molecular orbital (HOMO) was concentrated on the catechol group. Therefore, these authors expected the polymerization reaction to take place in the two more negative carbons of that group 2' and 5'.

As of the rutin the FTIR spectra of polyesculin fraction E2, E3, E4 and E5 showed a new peak at 1400 cm^{-1} compared to the spectra of esculin. That could be due to a formation of C-C bonds. In fact Anthoni et al. (Anthoni et al., 2010) reported the formation of C-C and C-O linkages, involving both the phenolic and the glucosidic part of the coumarin during the esculin polymerization. Moreover, an *in silico* structure investigation of oligoesculin by the same authors suggested the preferential formation of C8-C8 linkage between esculin units during the polymerization reaction.

The obtained and reported data of UV and FTIR suggested that different linkages (C-C, C-O) could be achieved depending to monomer, enzyme and operating conditions (pH, temperature, medium). This might affect the antioxidant activity of the polymer.

3.3. Evaluation of antioxidant activity of rutin and polyrutin fractions

Different methods were used to evaluate the antioxidant activity (free radicals scavenging activity, iron chelating capacity, xanthine oxidase inhibition activity and cupric reducing capacity) of esculin, rutin and their derivatives. Results were summarized in table 2.

3.3.1. Free radicals scavenging activity of rutin and polyrutin fractions

Results in table 2 showed that IC_{50} , related to polyrutins, increased progressively versus $\overline{M_w}$. The fraction R5, presenting the highest $\overline{M_w}$, led to highest IC_{50} values (276, 110 and 172 μM) compared to IC_{50} values obtained in presence of rutin (32, 11 and 18.6 μM) respectively for ABTS, DPPH and hydroxyl radical. These results suggested that higher was the

\overline{M}_w lower was the antiradical activity. The low antiradical activity of polyrutin fractions observed in this study was in accordance with reported by other authors (Anthoni et al., 2008; Kurisawa et al., 2003 b; Uzan et al., 2011).

3.3.2. Xanthine oxidase inhibition activity of rutin and polyrutin fractions

For XO inhibition activity (Table 2), the IC_{50} values of polymer fractions appeared to be lower than the IC_{50} value of rutin (962 μ M). The results indicated that IC_{50} decreased when the \overline{M}_w arised, which traduced the better ability of polyrutins to inhibit Xanthine oxidase compared to monomeric rutin. The fraction R5 illustrated the highest XO inhibition power, 15-folds better than monomeric rutin. The strong xanthine oxidase inhibition observed for polyrutin fractions was in accordance with other studies dialled in enzymatic flavonoid polymerisation (Anthoni et al., 2008; Desentis-Mendoza et al., 2006; Kurisawa et al., 2003 a ; Kurisawa et al., 2003 b; Uyama, 2007).

3.3.3. Iron chelating properties of rutin and polyrutin fractions

All polyrutin fractions exhibited higher degree of iron chelating ability (Table 2). This activity grow with the increase of \overline{M}_w . The polyrutin fraction R5 presented the highest iron chelating power with an IC_{50} value of 27.5 μ M compared to 58.3 μ M in presence of the monomer.

3.3.4. CUPRAC of rutin and polyrutin fractions

The cupric ion (Cu^{2+}) reducing abilities of rutin and polyrutin fractions (R2, R3 and R5) were shown in Table 2. It appeared that the cupric ion (Cu^{2+}) reducing powers of different tested compounds were in the following order R5 (TEAC of 527 μ M)>R3 (TEAC of 483 μ M)>R2 (TEAC of 411 μ M)> rutin (TEAC of 315 μ M), meaning that cupric ion (Cu^{2+}) reducing ability increased with the increase of \overline{M}_w .

3.4. Evaluation of antioxidant activity of esculin and polyesculin fractions

3.4.1. Free radicals scavenging activity of esculin and polyesculin fractions

Polyesculin fractions presented lower IC_{50} values than those of monomeric esculin which indicated their stronger antiradical activity (Table 2). Polyesculin fraction E5 was the most potent fraction. It was respectively for ABTS, DPPH and hydroxyl radicals 15, 4 and 11 folds more active than esculin (150, 72, 56 μM). Unlike rutin, the antiradical activities increased with \overline{M}_w when ABTS and hydroxyl radicals methods were used. However, for DPPH the IC_{50} remained constant, about 0.7 μM , for all tested fractions. So, DPPH scavenging activity seemed to be independent to the degree of polymerisation.

3.4.2. Xanthine oxidase inhibition activity of esculin and polyesculin fractions

Results in Table 2 showed that for all polyesculin fractions, IC_{50} were lower than that of the monomer (1954 μM). This activity was linked to \overline{M}_w and decreased as \overline{M}_w increased. The fraction E5 presented the lowest IC_{50} and therefore the highest xanthine oxidase inhibition activity, 10-folds higher than monomer.

3.4.3. Iron chelating properties of esculin and polyesculin fractions

Polyesculin fractions exhibited high degree of iron chelating activity, according to the site-specific hydroxyl radical-scavenging assay (Table 2). Results showed that iron chelating capacity was high as the \overline{M}_w increases. The best iron chelating power was observed in the presence of the E5 fraction ($IC_{50}=31.5 \mu\text{M}$), which was 5-folds better than esculin ($IC_{50}= 168 \mu\text{M}$).

3.4.4. CUPRAC of esculin and polyesculin fractions

Table 2 indicated that polyesculin fractions presented higher TEAC than esculin (TEAC= 49 μM). This activity rose as the \overline{M}_w increased. Therefore, the best cupric reducing antioxidant capacity was seen with the E5 fraction which was 10-folds more active than esculin.

3.5. Structure-antioxidant activity relationship

The structure-antioxidant activity relationship of monomeric flavonoids and coumarins was well investigated. According to many authors (Seyoum, Asres & El Fiky, 2006) free hydroxyl

groups on C4', C3' and C7 played a major role in antiradical activity of rutin and esculin. However, few data were available about the behaviour of these activities with polymerization. In this work we observed a decrease of polyrutin antiradical activities with \overline{M}_w increase. This decrease could be attributed to the loss of these groups during the rutin polymerization reaction.

For high iron chelating power and CUPRAC, hydroxyl groups on C5, C3 and the 4 oxo (for flavonoids), hydroxyl groups and catechol moiety (for coumarins) were essential. So, high iron chelating and cupric reducing antioxidant capacities observed with polyrutin and polyesculin fractions suggested that these groups were not implicated in the linkage occurred in rutin polymerization reaction (Fernandez et al., 2002; Guo et al., 2007; Heim, Tagliaferro & Bobilya, 2002; Mladenka et al., 2010).

For high xanthine oxidase inhibition activity, several works reported the importance of the presence of a double bond between C2 and C3 and free hydroxyl groups on C5 and C7 (Anthoni et al., 2008; Hayashi et al., 1988; Lin et al., 2002; Nagao, Seki & Kobayashi, 1999). High inhibition of the xanthine oxidase obtained in the presence of polyrutin and polyesculin fractions implicated that these groups were not affected during the polymerization reaction.

4. Conclusion

Polyphenolic polymers of rutin and esculin were synthesized using a laccase from *Trametes versicolor*. These polymers were fractioned by diafiltration process.

The analyses of rutin polymers by FTIR showed the presence of new C-C and C-O bonds and the disappearance of a C-H bond on monomer. These results suggested that polyrutin were synthesized through phenylene and oxyphenylene units. For polyesculin fraction, FTIR analyses indicated the presence of only C-C bond.

The antiradical activity of rutin was decreased by the enzymatic polymerization while polyesculin fractions showed a high antiradical activity compared to monomeric esculin. This

behaviour suggested that the antioxidant activity depend on the position of linkage through the polymerization reaction. For esculin, it seemed that the polymerization didn't affect groups implicated in the antioxidant activity. This could explain the high antioxidant activity values observed for polyesculin.

Both polyrutin and polyesculin fractions exhibited a high XO inhibition activity, iron chelating and cupric reducing antioxidant capacities.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Lorraine region in France, the French Ministry of Foreign Affairs (French Institute of Cooperation (IFC)), and to the Ministry of Higher Education and Scientific Research in Tunisia for the financial assistance of this study.

References

- Akita, M., Tsutsumi, D., Kobayashi, M., Kise, H., 2001. Structural change and catalytic activity of horseradish peroxidase in oxidative polymerization of phenol. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65, 1581-1588.
- Angerer, P.S., Studer, A., Witholt, B., Li, Z., 2005. Oxidative Polymerization of a Substituted Phenol with Ion-Paired Horseradish Peroxidase in an Organic Solvent. *Macromolecules* 38, 6248-6250.
- Anthoni, J., Lionneton, F., Wieruszkeski, J.-M., Magdalou, J., Engasser, J.-M., Chebil, L., Humeau, C., Ghoul, M., 2008. Investigation of enzymatic oligomerization of rutin. *Rasayan Journal of Chemistry* 1, 718-731.
- Anthoni, J., Humeau, C., Maia, E., Chebil, L., Engasser, J.-M., Ghoul, M., 2010. Enzymatic synthesis of oligoesculin: structure and biological activities characterizations. *European Food Research and Technology* 231, 571-579.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7970-7981.
- Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Skandrani, I., Bouhlel, I., Limem, I., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2011. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of phenolic-

- enriched extracts from *Teucrium ramosissimum*: Combination with their phytochemical composition. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 31, 220-232.
- Bhourri, W., Sghaier, M.B., Kilani, S., Bouhlel, I., Dijoux-Franca, M.-G., Ghedira, K., Ghedira, L.C., 2011. Evaluation of antioxidant and antigenotoxic activity of two flavonoids from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): Kaempferol 3-O-[beta]-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-[beta]-isorhamninoside. *Food and Chemical Toxicology* 49, 1167-1173.
- Bilici, A., Kaya, I., Yildirim, M., Dogan, F., 2010. Enzymatic polymerization of hydroxy-functionalized carbazole monomer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64, 89-95.
- Bordoni, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Giordano, E., Guarnieri, C., Calderera, C.M., Biagi, P.L., 2002. Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 103-111.
- Bruno, F.F., Nagarajan, S., Nagarajan, R., Kumar, J., Samuelson, L.A., 2005. Biocatalytic synthesis of water-soluble oligo(catechins). *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry* 42 A, 1547-1554.
- Bruno, F.F., Trotta, A., Fossey, S., Nagarajan, S., Nagarajan, R., Samuelson, L.A., Kumar, J., 2010. Enzymatic synthesis and characterization of polyquercetin. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* 47, 1191-1196.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2774-2779.
- Chen, H.-J., Chung, C.-P., Chiang, W., Lin, Y.-L., 2011. Anti-inflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran. *Food Chemistry* 126, 1741-1748.
- Desentis-Mendoza, R.M., Hernandez-Sanchez, H., Moreno, A., Rojas del C, E., Chel-Guerrero, L., Tamariz, J., Jaramillo-Flores, M.E., 2006. Enzymatic Polymerization of Phenolic Compounds Using Laccase and Tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules* 7, 1845-1854.
- Eker, B., Zagorevski, D., Zhu, G., Linhardt, R.J., Dordick, J.S., 2009. Enzymatic polymerization of phenols in room-temperature ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59, 177-184.
- Faix, O., Lange, W., Salud, E.C., 1981. The use of HPLC for the determination of average molecular weights and molecular weight distributions of milled wood lignins from *Shorea polysperma* (Blco.). *Holzforschug* 35, 3-9.
- Fernandez, M.T., Mira, M.L., Florêncio, M.H., Jennings, K.R., 2002. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry* 92, 105-111.
- Guo, M., Perez, C., Wei, Y., Rapoza, E., Su, G., Bou-Abdallah, F., Chasteen, N.D., 2007. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Transactions*, 4951-4961.
- Halliwell, B., 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine* 91, 14S-22S.
- Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shimizu, M., Morita, N., 1988. Inhibition of Cow's Milk Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Journal of Natural Products* 51, 345-348.

- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G., 1994. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of the American Chemical Society* 116, 4846-4851.
- Kawakita, H., Hamamoto, K., Ohto, K., Inoue, K., 2009. Polyphenol polymerization by horseradish peroxidase for metal adsorption studies. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 48, 4440-4444.
- Kobayashi, S., Uyama, H., Tonami, H., Oguchi, T., Higashimura, H., Ikeda, R., Kubota, M., 2001. Regio- and chemo-selective polymerization of phenols catalyzed by oxidoreductase enzyme and its model complexes. *Macromolecular Symposia* 175, 1-10.
- Kong, L.D., Cai, Y., Huang, W.W., Cheng, C.H.K., Tan, R.X., 2000. Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 199-207.
- Kurisawa, M., Chung, J.E., Kim, Y.J., Uyama, H., Kobayashi, S., 2003 a. Amplification of Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization. *Biomacromolecules* 4, 469-471.
- Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., Kobayashi, S., 2003 b. Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin). *Biomacromolecules* 4, 1394-1399.
- Lin, C.-M., Chen, C.-S., Chen, C.-T., Liang, Y.-C., Lin, J.-K., 2002. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 167-172.
- Markham, K., 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic Press. London, 36-93.
- Mejias, L., Reihmann, M.H., Sepulveda-Boza, S., Ritter, H., 2002. New Polymers from Natural Phenols Using Horseradish or Soybean Peroxidase. *Macromolecular Bioscience* 2, 24-32.
- Mladenka, P., Zatloukalová, L., Filipický, T., Hrdina, R., 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 963-975.
- Nabid, M.R., Zamiraei, Z., Sedghi, R., Nazari, S., 2011. Synthesis and characterization of poly(catechol) catalyzed by porphyrin and enzyme. *Polymer Bulletin* 64, 855-865.
- Nagao, A., Seki, M., Kobayashi, H., 1999. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63, 1787-1790.
- Nakagawa, K., Ninomiya, M., Okubo, T., Aoi, N., Juneja, L.R., Kim, M., Yamanaka, K., Miyazawa, T., 1999. Tea Catechin Supplementation Increases Antioxidant Capacity and Prevents Phospholipid Hydroperoxidation in Plasma of Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3967-3973.
- Racicot, K., Favreau, N., Fossey, S., Grella, A.R., Ndou, T., Bruno F.F., 2012. Antioxidant potency of highly purified polyepicatechin fractions. *Food Chemistry* 130, 902-907.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.
- Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 67, 2058-2070.

- Takano, K., Nakaima, K., Nitta, M., Shibata, F., Nakagawa, H., 2004. Inhibitory Effect of (-)-Epigallocatechin 3-Gallate, a Polyphenol of Green Tea, on Neutrophil Chemotaxis in Vitro and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4571-4576.
- Tommasini, S., Raneri, D., Ficarra, R., Calabro, M.L., Stancanelli, R., Ficarra, P., 2004. Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with beta-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35, 379-387.
- Tseitlin, G.M., Beksaev, S.G., Medzhitov, D.R., 2006. Enzymatic polymerization of phenols. *Polymer Science - Series A* 48, 798-802.
- Turac, E., Sahmetlioglu, E., 2010. Oxidative polymerization of 4-[(4-phenylazo-phenylimino)-methyl]-phenol catalyzed by horseradish peroxidase. *Synthetic Metals* 160, 169-172.
- Uyama, H., 2007. Artificial Polymeric Flavonoids: Synthesis and Applications. *Macromolecular Bioscience* 7, 410-422.
- Uyama, H., Kobayashi, S., 2002. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20, 117-127.
- Uzan, E., Portet, B., Lubrano, C., Milesi, S., Favel, A., Lesage-Meessen, L., Lomascolo, A., 2011. Pycnoporus laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 97-105.
- Van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., Van den Berg, H., Van der Vijgh, W., Bast, A., 2000. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry* 70, 391-395.
- Yamamoto, Y., Gaynor, R.B., 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 107, 135-142.
- Yen, G.-C., Chen, H.-Y., 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 27-32.
- Yoshino, K., Ogawa, K., Miyase, T., Sano, M., 2004. Inhibitory Effects of the C-2 Epimeric Isomers of Tea Catechins on Mouse Type IV Allergy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4660-4663.

Table 1: IM, PDI \overline{M}_w of obtained polyrutin^a and polyesculine^b fractions

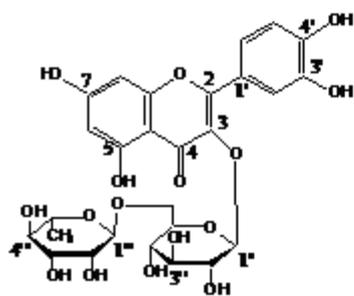
Fractions	\overline{M}_w (g/mol) ^c	PDI ^c	I _M ^c
Rutin (R)	611.21 ± 80.54	1.00 ± 0.01	1 ± 0.01
R1 (permeate on Mb 1KD)	2127.42 ± 67.12	1.17 ± 0.03	3.48 ± 0.14
R2 (permeate on Mb 3 KD)	4301.80 ± 102.72	1.37 ± 0.07	7.05 ± 0.16
R3 (permeate on Mb 5 KD)	5069.93 ± 116.2	1.36 ± 0.04	8.30 ± 0.18
R4 (retentate on Mb 5 KD)	7106.54 ± 96.62	1.35 ± 0.08	11.64 ± 0.14
R5 (retentate on Mb 15 KD)	8331.85 ± 146.24	1.42 ± 0.12	13.65 ± 0.22
Esculin (E)	339.36 ± 43.46	1.00 ± 0.09	1 ± 0.02
E1 (permeate on Mb 1KD)	688.12 ± 40.66	1.31 ± 0.11	2.02 ± 0.12
E2 (retentate on Mb 1KD)	1021.33 ± 48.51	1.48 ± 0.06	3.01 ± 0.14
E3 (retentate on Mb 3 KD)	3042.1 ± 86.24	1.39 ± 0.13	8.96 ± 0.25
E4 (retentate on Mb 5 KD)	5080.43 ± 70.96	1.41 ± 0.07	14.97 ± 0.20
E5 (retentate on Mb 15 KD)	6973 ± 68.10	1.54 ± 0.10	20.54 ± 0.20

^a R1, R2, R3, R4, R5 represent the polyrutin fractions, ^b E1, E2, E3, E4, E5 represent the polyesculin fractions. ^c Results are represented by the means ± SD of three experiments.

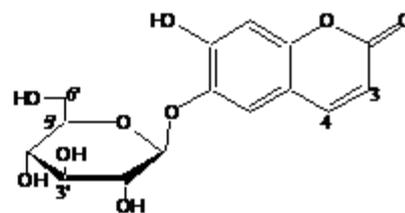
Table 2- Antiradicals, xanthine oxidase inhibition, iron chelating and CUPRAC activities of rutin, esculin and their polymer fractions

	ABTS ^a		DPPH ^a		Hydroxyl radical ^a		XO inhibition ^a		Iron chelation ^a		CUPRAC ^a
	IC ₅₀ ^b (μ M)	TEAC ^c (μ M)	IC ₅₀ ^b (μ M)	TEAC ^c (μ M)	IC ₅₀ ^b (μ M)	TEAC ^c (μ M)	IC ₅₀ ^b (μ M)	TEAC ^c (μ M)	IC ₅₀ ^b (μ M)	TEAC ^c (10 ⁻¹ μ M)	TEAC ^c (μ M)
R	32±2	3.9±0.2	11±0.1	1.2±0.3	18.6±1.6	2.1±0.1	962±16	0.5±0.1	58.3±5	1±0.1	315±18
R2	54±1	2.3±0.2	39±0.2	0.9±0.2	47.7±4	0.8±0.1	419±14	1.2±0.2	44.7±6	1.3±0.1	411±27
R3	97±8	1.3±0.4	70±0.9	0.7±0.2	89.6±5.5	0.4±0.2	129.7±7	3.8±0.6	35.3±1	1.7±0.2	483±13
R5	276±18	0.5±0.1	110±0.2	0.6±0.1	172±8	0.2±0.1	64.1±1.5	8.3±0.4	27.5±4	2.1±0.1	527±29
E	150±2	0.8±0.1	72±9	0.2±0.1	56±4	0.7±0.1	1954±33	0.2±0.1	168±9	0.2±0.1	49±1.5
E2	90±9	1.4±0.2	19±4	0.7±0.2	16±3	2.4±0.5	601±21	0.8±0.3	121±5	0.5±0.2	89±4
E3	50±1	2.5±0.3	19±3	0.7±0.1	13±2	3.1±0.7	260±9	1.9±0.5	65±9	0.9±0.1	228±10
E4	21±3	6.0±0.8	17±2	0.8±0.3	9±0.8	4.4±0.5	224±14	2.2±0.4	40±12	1.5±0.5	338±4
E5	10±2	12.6±0.4	17±3	0.8±0.2	5±0.5	8.1±0.9	186±6	2.6±0.6	31.5±5	1.85±0.5	498±34

^a Results are represented by the means \pm SD of three experiments. ^b IC₅₀: effective concentration which induced 50% of activity. ^c TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.



1a



1b

Figure 1-Molecular structure of rutin (1a) and esculin (1b)

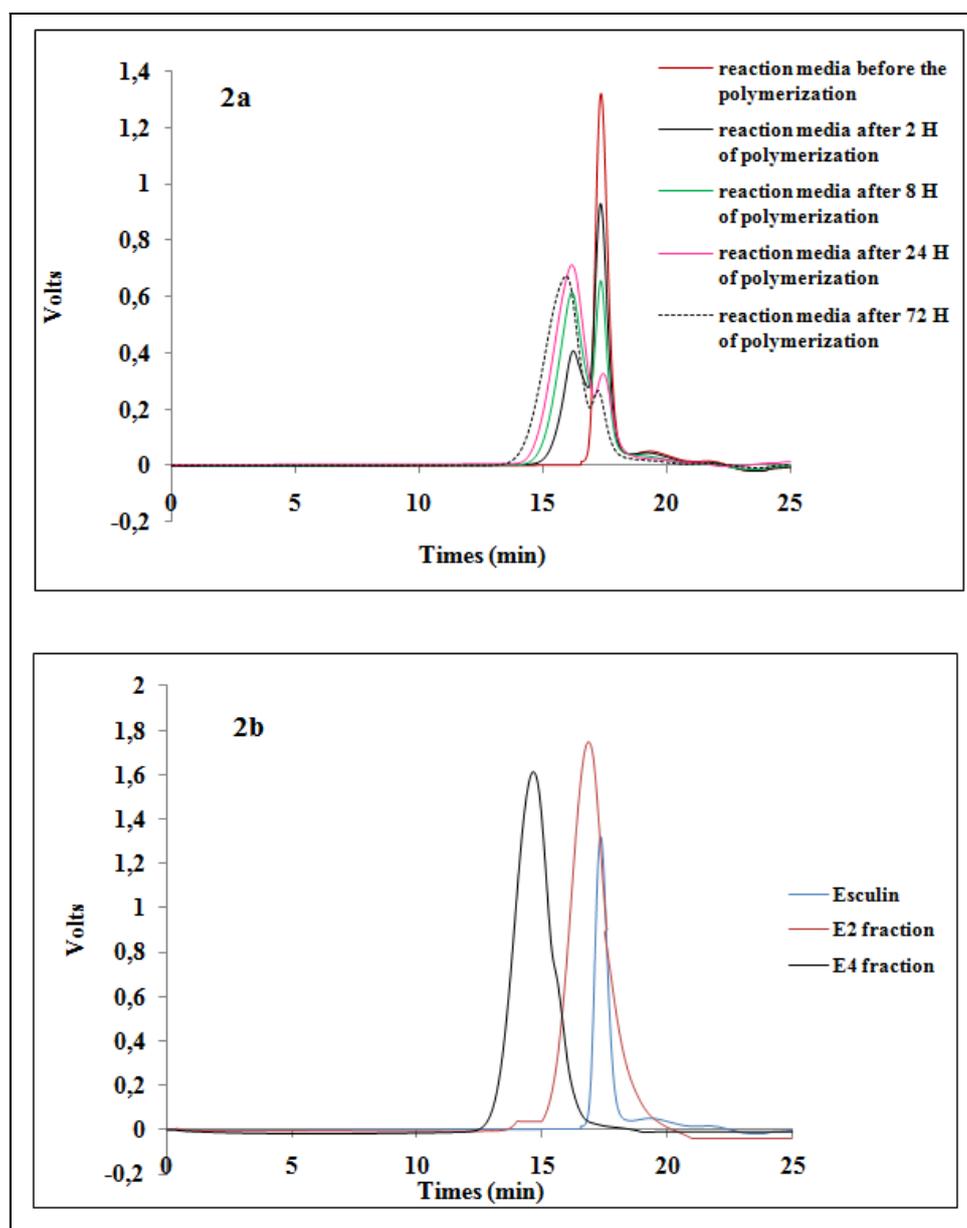
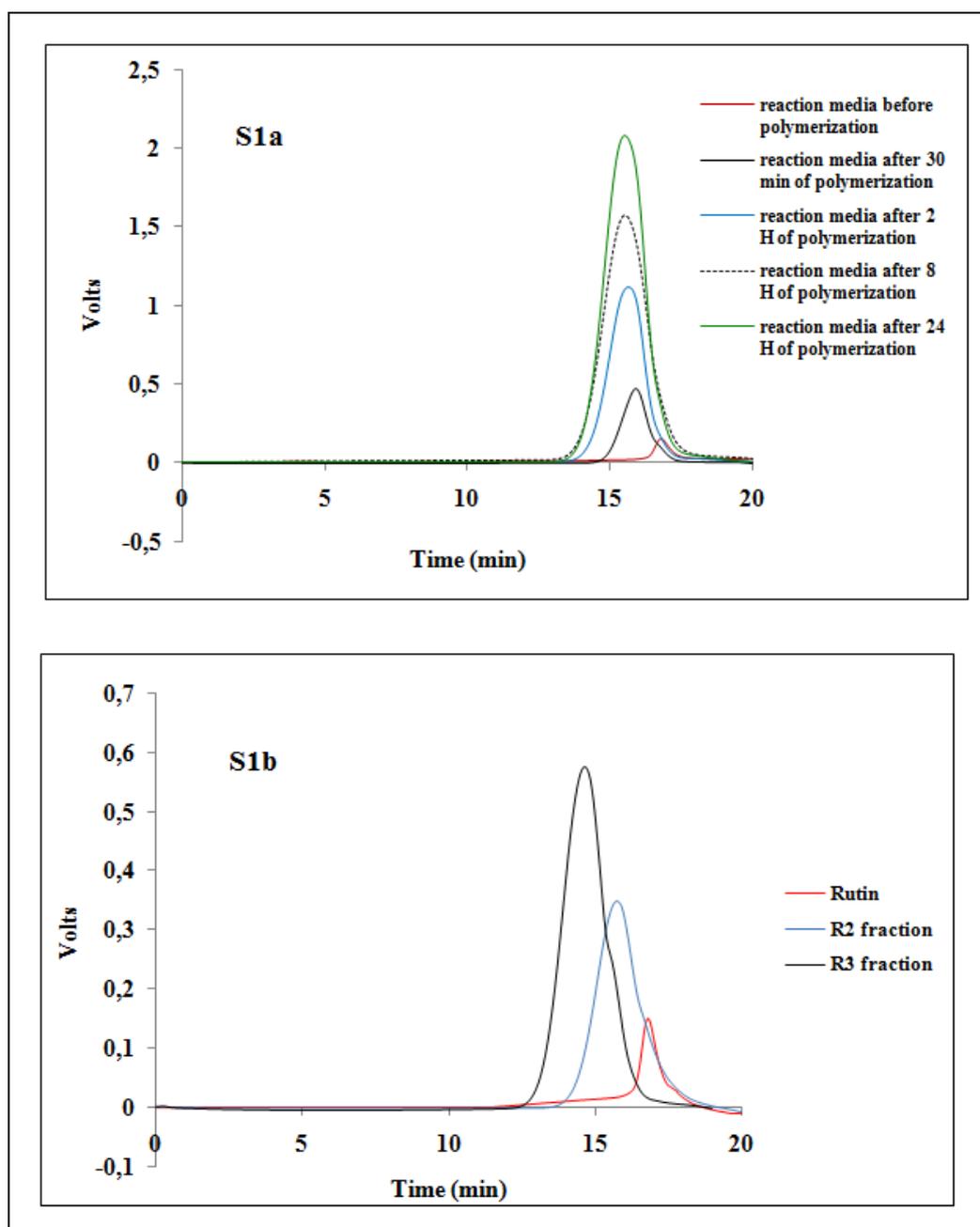


Figure 2. Kinetic of esculin polymerization determined by SEC-UV using dimethylformamide (DMF) with 1 % LiBr as a mobile phase (0.5 ml/min) (2a). SEC-UV analyses of esculin and polyesculin fractions E2 and E4 using dimethylformamide (DMF) with 1 % LiBr as a mobile phase (0.5 ml/min) (2b).



S1. Kinetic of rutin polymerization by laccase from *Trametes versicolor* determined by SEC-UV using dimethylformamide (DMF) with 1 % LiBr as a mobile phase (0.5 ml/min) (S1a). SEC-UV analyses of rutin and polyrutin fractions R2 and R3 using dimethylformamide (DMF) with 1 % LiBr as a mobile phase (0.5 ml/min) (S1b)

Article N°4

Oligorutin fractions induce anti-inflammatory activity and immune cell responses

Ghada Ben Rhouma-Martin, Latifa Chebil, Mounira Krifa,
Mohamed Ghoul, Leila Chekir-Ghedira.

Article soumis Immunopharmacology and Immunotoxicology

Oligorutin fractions induce anti-inflammatory activity and immune cell responses

Ghada Ben Rhouma-Martin^{a,b}, Latifa Chebil^a, Mounira Krifa^b, Mohamed Ghoula^a, Leila Chekir-Ghedira^{b,c}

^a Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, ENSAIA-INPL, Université de Lorraine, 2 av. de la Forêt de Haye, 54500, Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

^b Unité de recherche pharmacognosie/ Biologie moléculaire et cellulaire, Faculté de Pharmacie, Université de Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisie.

^c Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire, Faculté de Médecine Dentaire, Université de Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisie.

Corresponding authors: Pr. Leila Chekir-Ghedira, Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Dental Medicine, University of Monastir, Rue Avicenne, Monastir 5000, Tunisia. Tel: +21673461150. Fax: +21673461150. E-mail: Leila.chekir@laposte.net

Abstract

Rutin has been enzymatically oligomerized by laccase from *Trametes versicolor*. Five fractions of oligomers were obtained from the monomer. *In vitro*, the effects of rutin and its oligomer fractions on lysosomal enzyme activity and proliferation of, respectively, freshly isolated peritoneal macrophages and splenic lymphocytes were assessed. Oligorutin fractions alone clearly affected macrophage function more than monomeric rutin, as evidenced by a significant modulation of cell lysosomal enzyme activity and ability to form/and or release nitric oxide. These same oligomer fractions were also found to be able to significantly modify the proliferation of splenocytes, even when lipopolysaccharide or lectin mitogens were absent. Further, these results fortify the importance of the use of natural products as rutin and oligorutin fractions as anti-inflammatory agents. Nevertheless, ongoing/further studies are needed to clarify more precisely mechanisms underlying effects on lymphocyte and macrophage functionality, as well as the causative agents.

Keywords: Oligorutin; anti-inflammatory activity; immunomodulation

1. Introduction

Flavonoids are a large class of polyphenolic compounds widely distributed in the plant kingdom. Their basic nucleus contains 15 carbons arranged in a C6-C3-C6 configuration [1]. These natural compounds have gained increasing interest as potential therapeutic agents. Years of research have now clearly affirmed the ability of monomeric flavonoids to exhibit some pharmacological activities including beneficial effects on inflammation, cancer and cardiovascular diseases [2-4]. The anti-inflammatory effect of monomeric flavonoids is assumed to result mainly from the inhibition of some key enzymes involved in inflammation and/or cell signalling pathways such as cyclooxygenase and lipoxygenase [5], protein kinase C (PKC) and phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) [6-8]. Rutin, or quercetin-3-O-rhamnosylglucoside, is a natural flavone derivative and one of the major representative flavonoids, which has been shown to have many biological and pharmacological effects. In fact the rutin have been described to have antioxidant, anticancer, antiulcer effect [9-11]. The anti-inflammatory effect of rutin has been demonstrated by many authors [12-15]. Borissova et al. [15] reported that rutin prevented oedema formation in rats induced by histamine and serotonin. The anti-inflammatory effect of rutin may be attributed, at least in part, to its capacity to inhibit inflammatory mediators production, which play an important role in neutrophil recruitment and activation. Indeed, it has been reported that rutin inhibited PLA2 activity, the initial enzyme in arachidonic acid cascade, from human synovial fluid [16].

On the other hand, some works have indicated that the enzymatic polymerization of rutin might improve its biological activities [17-19]. In fact, rutin polymerization by laccase from *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* engendered polymers with improved superoxide radical activity [20]. Moreover, oligorutin, obtained by laccase from *Myceliophthora*, presented a better inhibition of 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH) radical, responsible of cell damage, compared with

its monomer [18]. Furthermore, oligorutin obtained through enzymatic polymerization by laccase from *Trametes versicolor* showed a high antimutagenic activity on two *Salmonella typhimurium* strains TA102 and T104 [19].

Data showing the anti-inflammatory effect of rutin in one hand, and the beneficial activity of enzymatic polymerization of rutin on many biological activities, encouraged us to investigate the immunomodulatory activities of oligorutin obtained by enzymatic polymerization of rutin by laccase from *Trametes versicolor*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Laccase of *Trametes versicolor* (E.C. 1.10.3.2., 21.4 U mg⁻¹), rutin hydrate (98%), Dimethylsulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), NH₄Cl, Tris base, lipopolysaccharide (LPS), lectin, sulphanilamide, naphthylenediamine, phosphoric acid, Triton-X100, p-nitrophenyl phosphate, citric acid and boric acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). RPMI (1640), fetal bovine serum, gentamycin and L-glutamine were purchased from Gibco BLR (Paisley, UK)

2.2. Methods

2.2.1. Oligorutin fractions obtaining

Oligorutin fractions was carried out in the same operating conditions described as described by Anthoni *et al.*[21, 22] and by Ben Rhouma *et al.*[19]. Rutin (50 g/L) was suspended in 1L of a methanol/ water (30:70 v/v) reaction medium. Laccase solution (3 U/ mL) was added to the mixture. The reaction was stirred at 600 rpm, for 24 h.

2.2.2. Size exclusion chromatography analysis (SEC)

Relative masses of polymers were evaluated by size exclusion chromatography (SEC) (HPLC LaChrom, UV 280 nm LaChrom L-7400, Tosoh TSKgel α 3000 column, 60 °C). Dimethylformamide (DMF) with 1 % LiBr was used as the mobile phase (0, 5 mL/min).

Molecular mass calibration was obtained by using standards of polystyrene (with peak molecular weight (Mp) from 500 to 10000 Da) and polystyrene sulfonate (with peak molecular weight (Mp) from 1100 to 31000 Da). The obtained data allowed the determination of number-average molecular mass (\overline{M}_n), weight-average molecular mass (\overline{M}_w), weight-average molecular mass index (I_M) and polydispersity (PDI) as described by Faix et al. 1981 (Faix, Lange & Salud, 1981). Table 1 presented the characterization of rutin and obtained oligorutin fractions, determined by size exclusion chromatography (SEC).

2.2.3. Fourier Transformed InfraRed analysis (FTIR)

The infrared analyses were conducted by Attenuated Total Reflectance- Fourier Transformed InfraRed (ATR-FTIR) spectroscopy using a Fourier Transformed InfraRed (FTIR) spectrometer Tensor 27 (Bruker). The analysis was carried out on monomer and oligomer lyophilized powders.

2.2.2. Cell preparation from mice

Specific pathogen-free BALB/c mice (6–8 week-old males, 18–22 g) were obtained from the Pasteur Institute (Tunis, Tunisia). Mice were housed under standard conditions of temperature, humidity, and light. All animal experiments were performed in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals published by the US National Institutes of Health.

Spleen BALB/c lymphocytes were obtained as we have previously reported [23]. Briefly, mice were sacrificed by cervical dislocation. Spleen was isolated aseptically removed and homogenized by mincing with a sterile forceps. Splenocytes were isolated by centrifugation (1500 rpm, for 10 min), and red blood cells were lysed with buffer (144 mM NH_4Cl , 1.7 mM Tris Base). Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine (4%), and gentamycin (1%). Some BALB/c mice were used to provide peritoneal macrophages as we

have previously reported [23]. For that purpose, peritoneal cells were obtained after lifting of the peritoneal wall and injection of 4 ml of sterile PBS, massage of the peritoneum, and drawing back of the fluid (4 ml) into the syringe. Cells were washed twice and resuspended in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum and 100 µg/ml gentamycin. The cell viability was tested by trypan-blue dye exclusion technique.

2.2.3. Nitrite assay

Nitrite levels were measured using the diazotization method based on the Griess reaction, which is an indirect assay for nitric oxide (NO) production as previously described by Green et al. [24]. Cells were incubated with lipopolysaccharide 5 µg/ml (LPS, rough strain, *Escherichia coli* EH100; positive control) or in the presence of increasing concentrations (25, 50, 100, 200 µg/ml) of rutin and its oligomer fractions for 48 h min in humidified incubator at 37°C and an atmosphere enriched with 5% CO₂. Nitrite was measured by adding 100 µl Griess reagent (1% sulphanilamide and 0.1% naphthylenediamine in 5% phosphoric acid) to 100 µl culture supernatant, the mixture was incubated 10 to 15 min in humidified incubator at 37°C and an atmosphere enriched with 5% CO₂. The optical density at 540 nm (OD₅₄₀) was then measured with a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany). The concentration of nitrite production induced in each sample was calculated by comparison with the OD₅₄₀ of standard solutions of sodium nitrite that were prepared in parallel in culture medium.

2.2.4. Assessment of lysosomal enzyme activity

The cellular lysosomal enzyme activity was evaluated by determining acid phosphatase activity (AP), a lysosomal enzyme, in macrophages as previously described by [25] with some modifications. Briefly macrophage suspensions (100 µl at 6×10^6 cells/ml) were seeded in flat bottom 96-well plate, and 100 µl aliquot of tested molecules (dissolved in 0,5 % of DMSO) at each concentration, was added . The culture was incubated at 37°C in 5% CO₂

humidified atmosphere for 48 h. The medium was removed by aspiration and 20 μl of 0.1% Triton-X100, 100 μl p-nitrophenyl phosphate solution (100 mM) and 50 μl citrate buffer (pH 5.0, 0.1 M) were added in each well. The plate was further incubated for 30 min at 37°C; 150 μl borate buffer (pH 9.8, 0.2 M) was then added and the absorbance was measured at 405 nm. The percentage of lysosomal enzyme activity was calculated as previously reported [7] by the following equation:

$$\text{Lysosomal enzyme activity (\%)} = \left(\frac{\text{OD sample} - \text{OD control}}{\text{OD control}} \right) \times 100$$

2.2.5. In vitro proliferation assay

Lymphocyte proliferation assay was carried out according to the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] method [26]. One hundred microliter of splenocyte suspension (5×10^6 cells/mL) in 96-well plate were pre-incubated in RPMI 1640 medium (Control) for 24 h before the addition of mitogens; lectin or Lipopolysaccharide (LPS) at 5 $\mu\text{g/ml}$ alone or with increasing concentrations (0, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$) of rutin and rutin oligomer fractions (R2, R3 and R5) solubilized in 0,5 % of DMSO in RPMI. Cells were incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere for additionally 48 h. After centrifugation at 1500 rpm for 10 min, the cell pellet was resuspended in 50 μl of MTT (5 mg/ml) in RPMI media and incubated for 4 h. The culture medium was removed after centrifugation and dimethylsulfoxide was added. The absorbance was measured at 570 nm. The percentage of proliferation was calculated as was previously reported [7] by following equation:

$$\text{Proliferation (\%)} = \left(\frac{\text{OD sample} - \text{OD control}}{\text{OD control}} \right) \times 100$$

2.2.6. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and the results were expressed as mean \pm SD. A Student's *t*-test was used to analyze statistical significance of the differences between the control and the treated values. *p* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Fourier Transformed InfraRed analysis (FTIR)

FTIR spectra of oligorutin fraction R1 showed a new peak at 1220 cm^{-1} . This peak indicated the formation of new ether bonds C-O. The absence of a peak at 1747 cm^{-1} on the R1 fraction spectra compared to rutin spectra was noted. This could be explained by the disappearance of a C-H bond. Another new peak was detected on the spectra of R5 at 1465 cm^{-1} which could be attributed to the appearance of a C-C bond. A new peak was detected at 1674 cm^{-1} on the spectra of R3 and R5 fractions which could be attributed to the presence of a C=O bond. No other new peaks were noticed on the spectra of other oligorutin fractions.

To test whether rutin and its oligomer fractions promoted or inhibited cell proliferation, we isolated splenocytes and cultured them with either the monomer or one of its oligomer fractions in the presence or in the absence of mitogens i.e. lipopolysaccharide (LPS).

3.1. Effect of the rutin and oligorutin fractions on NO production

The anti-inflammatory activity of rutin and rutin oligomer fractions (R2, R3 and R5) was studied *in vitro* by analyzing their inhibitory effect on the release of chemical mediators like NO from macrophages. Treatment of peritoneal macrophages with LPS ($5\text{ }\mu\text{g/ml}$) for 24 h induced NO production (assessed by measuring accumulation of nitrite, a stable metabolite of NO, using the Griess reaction) in the media. The beneficial anti-inflammatory effect of rutin and oligorutin fraction (R2, R3 and R5) on the inhibition of production of NO by macrophages is shown in figure 1. Incubation of peritoneal macrophages with monomeric rutin and oligorutin fractions induced a significant inhibitory effect on LPS induced NO production in a dose-related manner. Oligorutin fractions (R2, R3 and R5) were more

effective in inhibiting NO production compared to their monomer. The oligorutin fraction R5 showed the highest NO production inhibitory power, with a percentage value of NO production reaching 29.1% compared to NO production with LPS alone (98,9%) at the highest tested concentration (200 $\mu\text{g/ml}$). Rutin and Oligorutin fractions, even up a concentration of 200 $\mu\text{g/ml}$, were not cytotoxic to macrophages; cell viability percentages were higher than 85% with each tested sample.

3.2. Assessment of cellular lysosomal enzyme activity

As macrophages play a critical role in immune defense against various infectious agents because of their secretory and phagocytic functions, mouse peritoneal macrophages were used to analyze effects of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) on the secretory endpoint. As shown in figure 2, all tested concentrations of rutin and oligorutin fractions markedly stimulated macrophage lysosomal enzyme activity in a dose-related manner. Use of 200 $\mu\text{g/ml}$ of oligorutin fractions (R2, R3 and R5) stimulated lysosomal enzyme activity by respectively 64.8, 78.6 and 94.1 % compared to 54.8% in the presence of rutin at the same concentration (200 $\mu\text{g/ml}$). The oligorutin fraction R5 was the most effective fraction in stimulating lysosomal enzyme activity. Rutin and oligorutin fractions seemed to be a potent immunostimulators.

3.3. Splenocyte proliferation assay

The relationship between concentration of tested flavonoids and their effects on splenocyte proliferation were investigated by MTT assay. MTT is a yellow water-soluble tetrazolium salt. Metabolically active cells are able to convert the dye to water-insoluble dark blue formazan by reductive cleavage of the tetrazolium ring. Spleen cells were treated with rutin, and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) at concentrations ranging from 25 to 200 $\mu\text{g/ml}$ for 48 h.

As shown in figure 3A, rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5), demonstrated a significant ($P < 0.05$) stimulatory effect when the concentration was higher than 50 $\mu\text{g/ml}$ in a dose-depending manner. Oligorutin fractions showed a better splenocytes stimulation than their monomer. The highest proliferation percentage of splenocytes was observed at the highest concentration (200 $\mu\text{g/ml}$) of oligorutin fraction which reached 56.9 % in the presence of oligorutin fraction R5, while rutin showed a percentage of 28.8% at the same concentration.

3.4. Mitogen-induced splenocyte proliferation

Lymphocyte-mediated immunity plays an important role in cellular and humoral immune responses. As the capacity to elicit an effective T- and B-lymphocyte response is ultimately dependent of the proliferative capacity of these cells, the effects of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5), on lymphocyte proliferation in presence of two different mitogens (lectin and Lipopolysaccharide (LPS)) was evaluated using splenocytes from untreated mice. Mitogen induced proliferation of splenocytes seems to be enhanced by rutin and oligorutin fractions in a dose-depending manner (figure 3B and 3C).

Oligorutin fractions exhibited higher mitogen-induced splenocyte proliferation than monomeric rutin. The oligorutin fraction R5 showed the most important splenocyte proliferation when associated to LPS or Lectin with a percentage of proliferation equal to 180.3% (when associated to LPS) and 95.8% (when associated with lectin) at the highest concentration (200 $\mu\text{g/ml}$) while this percentages where 66.5% and 40.2% in the presence of respectively LPS and lectin only.

4. Discussion

This study focused on the anti-inflammatory effect. How oligorutin fractions (R2, R3 and R5), obtained through enzymatic polymerization of rutin can modulate immune cell functions, such as macrophage secretory function and lymphocyte proliferation, to bring about reported

anti-inflammatory effects? During inflammatory responses, both as part of normal anti-pathogen [25] and in some cases aberrant responses (i.e., allergy) [27], macrophages release a slew of toxic products, including free radicals and NO, as well as lysosomal enzymes, including AP. Compared with LPS, which is a potent inducer of macrophage NO release [28], it was shown that rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) inhibited macrophage release of NO.

Comalada et al. [13] studied the effect of several flavonoids on the NO production, using primary bone marrow derived macrophages activated by LPS, as cellular model. These authors demonstrated that some flavonoids inhibited NO production in LPS-activated macrophages, an effect that has been associated with the inhibition of the NF- κ B pathway. Moreover, the anti-inflammatory activity of monomeric rutin has been demonstrated by many authors [12, 14, 29, 30]. In fact, the NO production inhibitory power of rutin has been studied by Shen et al. [31] who demonstrated that this flavonoid is able to reduce NO production on macrophages.

The inhibitory effect of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) on NO production may be associated to their interference with the ability of the macrophages to interact with/respond to LPS or that they have a directly scavenger effect on NO, or by impacting on the nitric oxidase synthase system (NOS). All this mechanisms of NO production inhibition was already described for flavonoids inhibiting NO production [31, 32].

The structure-activity relationship of different flavonoids has been reported by Comalada et al.[13] who indicated that hydroxyl groups at positions 5, 7, 3' and 4', together with the double bond at C2–C3 are necessary for the anti-inflammatory effect. This structure activity relationship was supported by Kim et al. [33]. So the stronger NO production power and oligorutin fractions (R2, R3 and R5), compared to their monomer, indicated that these groups

(hydroxyl groups at positions 5, 7, 3' and 4' and double bond at C2–C3) were not affected during the rutin polymerization.

Oligorutin fractions (R2, R3 and R5) showed a higher power to increase the lysosomal activity. Similar ability to increase lysosomal activity, induced by isoproterenol, was obtained in the presence of various flavonoids [34-36]. In fact, Bae et al.[37] demonstrated the immunostimulatory effect of rutin when tested in hemocytes of the fleshy shrimp. Hsieh et al. [38] confirmed the finding advanced by Bae et al. [37]. Moreover, Stanely-Mainzen and Priya [39] reported that the high lysosomal effect of rutin was due to its ability to increase some lysosomal enzymes as β -glucuronidase, β -N-acetylglucosaminidase, β -galactosidase, cathepsin-B and D. This let suggest that oligorutin fractions (R2, R3 and R5) reduce the lysosomal activity according to the same mechanism.

The capacity to elicit an effective T- and B-lymphocyte response is ultimately dependent of the proliferative capacity of each of these cells. These cells, especially T-lymphocytes, are also key to triggering inflammatory responses, in part, by their abilities to release factors that ultimately activate macrophages. Mitogens have routinely been used to determine the effects of agents like the flavonoids to impact on lymphocytic functions [31]. LPS is used for B-lymphocyte proliferation whereas lectin is used for T-lymphocyte proliferation. We showed that rutin and its oligomer fractions (R2, R3 and R5) - with and without LPS or lectin-produced different effects on splenocytes proliferation. As rutin and oligorutin fractions enhanced cell proliferation activity, as well as when they were incubated simultaneously with LPS or with lectin, we conclude that both B and T-lymphocytes were sensitive to these flavonoids.

Zaho et al. [3] confirmed the stimulatory effect of rutin on splenocyte proliferation. They reported that the double bond at C2-C3, hydroxyl in position 5, as well as hydroxyl groups on the B ring, were important for the anti-inflammatory activity. In the light of this observation

and as far as we obtained high splenocyte proliferation in the presence of oligorutin fractions, we can advance that these groups (C2-C3 double bond and hydroxyl groups on the position 5 and on the B ring) were not affected during rutin polymerization.

5. Conclusion

In this study, we have described the anti-inflammatory effect of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) in *ex vivo* experiments. These flavonoids revealed a capacity to stimulate splenocytes as well as in the presence as in the absence of lectin or LPS mitogens. Since the C2-C3 double bond and hydroxyl groups at positions 5, 7, 3' and 4' were reported to be important for induction of splenocyte proliferation by flavonoids (i.e rutin) [40]. We suggest that polymerization of rutin did not affect these structures.

It have been also demonstrated that rutin and especially oligorutin fractions suppressed the NO production and induced the lysosomal activity of macrophages. These results indicated that oligorutin fractions exhibit remarkable immunomodulatory effects. The C2-C3 bonds, the hydroxyl groups on the B ring and at the position 5 were reported to be responsible for the NO production and lysosomal activity inhibition, therefore, the important anti-inflammatory effect in presence of oligorutin fraction compared to the rutin, indicated that these important groups were not affected during rutin polymerization. The investigation of such structure-activity relationship could yield important informations, with regard to developing superior protocols for anti-inflammatory therapy. Our study provides evidence that polymerization of rutin enhanced its anti-inflammatory activity. Finally, the information presented here could be used as preliminary data, and biologically more relevant experiments that will examine the therapeutic potential of obtained oligorutin fractions will be designed.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- [1] Harborne JB. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. In: Inc CP, editor. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986/1993. p. 241-5.
- [2] Struckmann JR. Clinical efficacy of micronized purified flavonoid fraction: an overview. . Journal of Vascular research 1999;36:37-41.
- [3] Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, Agarwal R. Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin. Carcinogenesis. 2000;21:811-6.
- [4] Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. Pharmacological Reviews. 2000;52:673-751.
- [5] You K, Jong H-G, Kim H. Inhibition of cyclooxygenase/lipoxygenase from human platelets by polyhydroxylated/methoxylated flavonoids isolated from medicinal plants. Archives of Pharmacal Research. 1999;22:18-24.
- [6] Martelli AM, Nyakern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. Leukemia. 2006;20:911-28.
- [7] Gamet-Payraastre L, Manenti Sp, Gratacap M-P, Tulliez J, Chap H, Payraastre B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. General Pharmacology: The Vascular System. 1999;32:279-86.
- [8] Selloum L, amp, x, Reichl S, MÃ¼ller M, Sebihi L, et al. Effects of Flavonols on the Generation of Superoxide Anion Radicals by Xanthine Oxidase and Stimulated Neutrophils. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2001;395:49-56.
- [9] La Casa C, Villegas I, AlarcÃ³n de la Lastra C, Motilva V, MartÃ±n Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. Journal of Ethnopharmacology. 2000;71:45-53.
- [10] Yang J, Guo J, Yuan J. In vitro antioxidant properties of rutin. LWT - Food Science and Technology. 2008;41:1060-6.
- [11] Guerrero CPR, MartÃ±n MJ, Marhuenda E. Prevention by Rutin of gastric lesions induced by ethanol in rats: role of endogenous prostaglandins. General Pharmacology: The Vascular System. 1994;25:575-80.
- [12] Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. Experimental and Toxicologic Pathology. 2003;54:313-8.
- [13] Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. Biochemical Pharmacology. 2006;72:1010-21.
- [14] Guardia T, Rotelli AE, Juarez ArO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. Il Farmaco. 2001;56:683-7.
- [15] Borissova P, Valcheva S, A. B. Antiinflammatory effect of flavonoids in the natural juice from Aronia melanocarpa, rutin and rutin-magnesium complex on an experimental model of

inflammation induced by histamine and serotonin. *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica*. 1994;20:25-30.

[16] Lindahl M, Tagesson C. Flavonoids as Phospholipase A₂ Inhibitors: Importance of Their Structure for Selective Inhibition of Group II Phospholipase A₂. *Inflammation*. 1997;21:347-56.

[17] Anthoni J, Lionneton F, Wieruszeski J-M, Magdalou J, Engasser J-M, Chebil L, et al. Investigation of enzymatic oligomerization of rutin. *Rasayan J Chem*. 2008;1:718-31.

[18] Kurisawa M, Chung JE, Uyama H, Kobayashi S. Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin). *Biomacromolecules*. 2003;4:1394-9.

[19] Ben Rhouma G, Chebil L, Krifa M, Ghoul M, Chekir-Ghedira L. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of oligorutin and oligoesculin. *Food Chemistry*. 2012;135:1700-7.

[20] Uzan E, Portet B, Lubrano C, Milesi S, Favel A, Lesage-Meessen L, et al. *Pycnoporus* laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011;90:97-105.

[21] Anthoni J, Lionneton F, Wieruszeski J-M, Magdalou J, Engasser J-M, Chebil L, et al. Investigation of enzymatic oligomerization of rutin. *Rasayan Journal of Chemistry*. 2008;1:718-31.

[22] Anthoni J, Humeau C, Maia E, Chebil L, Engasser J-M, Ghoul M. Enzymatic synthesis of oligoesculin: structure and biological activities characterizations. *European Food Research and Technology*. 2010;231:571-9.

[23] Harizi H, Juzan M, Grosset C, Rashedi M, Gualde N. Dendritic Cells Issued in Vitro from Bone Marrow Produce PGE₂ That Contributes to the Immunomodulation Induced by Antigen-Presenting Cells. *Cellular Immunology*. 2001;209:19-28.

[24] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*. 1982;126:131-8.

[25] Manosroi A, Saraphanchotiwitthaya A, Manosroi J. In vitro immunomodulatory effect of *Pouteria cambodiana* (Pierre ex Dubard) Baehni extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;101:90-4.

[26] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65:55-63.

[27] Benjamini E, Coico R, Sunshine G. *Immunology: a short course*. 4 the Edition ed. New York: Willy; 2000.

[28] MacMicking J, Xie Q-w, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function *Annual Review of Immunology*. 1997;15:323-50.

[29] de Medina FS, Posadas RL, Romero-Calvo I, Molina CM, Daddaoua A, Perez RG, et al. The intestinal antiinflammatory activity of the flavonoid rutin requisoral administration may involve effects on mucosal lymphocytes *Clinical Nutrition Supplements*. 2009;4:49.

[30] Lee W, Ku S-K, Bae J-S. Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*. 50:3048-55.

[31] Shen S-C, Lee W-R, Lin H-Y, Huang H-C, Ko C-H, Yang L-L, et al. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric

oxide and prostaglandin E2 production. *European Journal of Pharmacology*. 2002;446:187-94.

[32] Lopez-Posadas R, Ballester I, Abadia-Molina AC, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. *Biochemical Pharmacology*. 2008;76:495-506.

[33] Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*. 1999;58:759-65.

[34] Al-Numair K, Chandramohan G, Veeramani C, Alsaif MA. Morin, a flavonoid, prevents lysosomal damage in experimental myocardial ischemic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2012;6:3445-9.

[35] Decharneux T, Dubois F, Beauloye C, De Coninck SW, Wattiaux R. Effect of various flavonoids on lysosomes subjected to an oxidative or an osmotic stress. *Biochemical Pharmacology*. 1992;44:1243-8.

[36] Stanely Mainzen P. P, Priya S. Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: Biochemical, histological and in vitro evidences. *European Journal of Pharmacology*. 2010;649:229-35.

[37] Bae S-H, Kim B-R, Kang BJ, Tsutsui N, Okutsu T, Shinji J, et al. Molecular cloning of prophenoloxidase and the effects of dietary Beta-glucan and rutin on immune response in hemocytes of the fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2012;33:597-604.

[38] Hsieh T-J, Wang J-C, Hu C-Y, Li C-T, Kuo C-M, Hsieh S-L. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish & Shellfish Immunology*. 2008;25:581-8.

[39] Stanely-Mainzen P. P, Priya S. Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: Biochemical, histological and in vitro evidences. *European Journal of Pharmacology*. 2010;649:229-35.

[40] Zhang H-Y, Wang L-F. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2004;673:199-202.

Table 1. \overline{M}_w , IM and PDI of obtained polyrutin fractions

Fractions	\overline{M}_w (g/mol)	PDI	I_M
Rutin (R)	611.21 ± 80.54	1.00 ± 0.012	1 ± 0.0
R1 (Permeate on membrane 1KDa)	2127.42 ± 67.12	1.17 ± 0.03	3.48 ± 0.14
R2 (Retentate on membrane 1KDa)	4301.8 ± 102.72	1.37 ± 0.07	7.05 ± 0.16
R3(Permeate on membrane 3 KDa)	5069.93 ± 116.2	1.36 ± 0.04	8.30 ± 0.18
R4 (Retentate on membrane 5 KDa)	7106.54 ± 96.62	1.35 ± 0.08	11.64 ± 0.14
R5 (Retentate on membrane 15 KDa)	8331.85 ± 146.24	1.42 ± 0.12	13.65 ± 0.22

With: \overline{M}_w : weight-average molecular mass, PDI: polydispersity index, I_M: weight-average molecular mass index, R1, R2, R3, R4, R5 represent the polyrutin fractions. Results are represented by the means ± SD of three experiments.

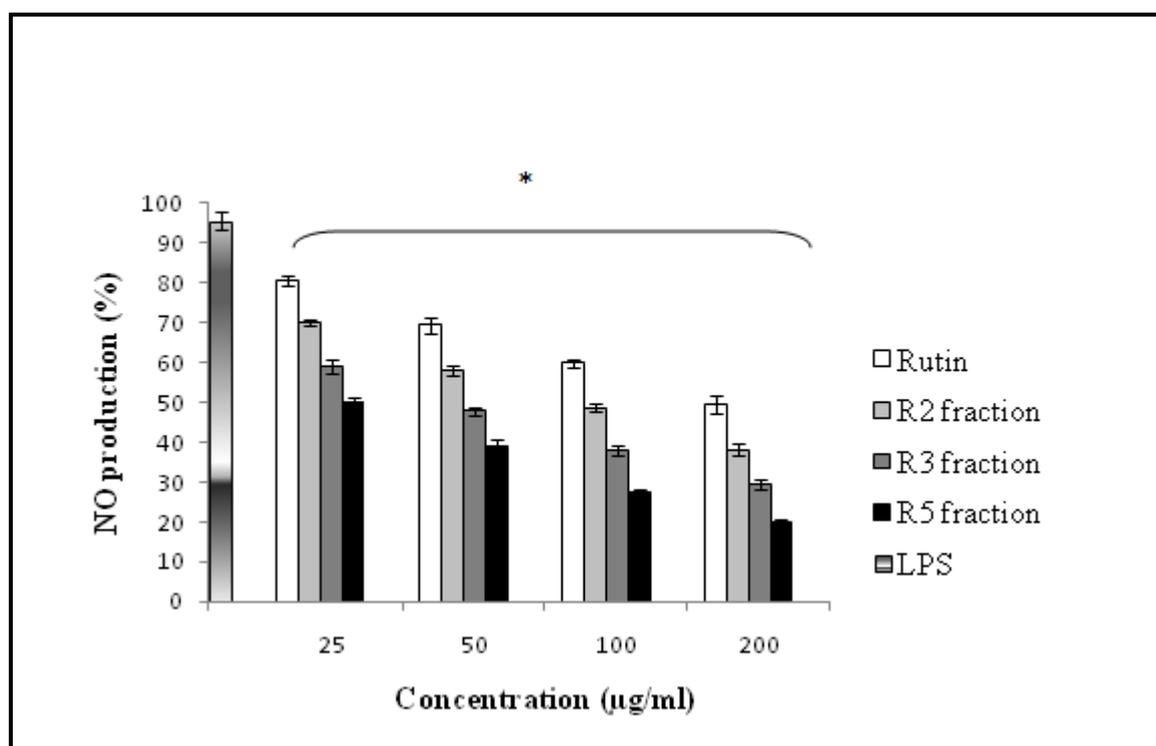


Figure 1 . Production of nitrite by mouse peritoneal macrophages in response to tested rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5). Macrophages ($6 \cdot 10^6$ cells/well) were incubated in microtiter plates in RPMI 1640 medium in the presence of increasing concentrations of rutin and oligorutin fractions for 24h. Cells treated with lipopolysaccharide ($5 \mu\text{g}$ LPS/ml) alone were used as a positive control. Each value represents the mean (\pm SD) of triplicate samples compared to the control. Each value represents the mean (\pm SD) of triplicate samples compared to the control; * $p < 0.05$ using a student's *t*-test

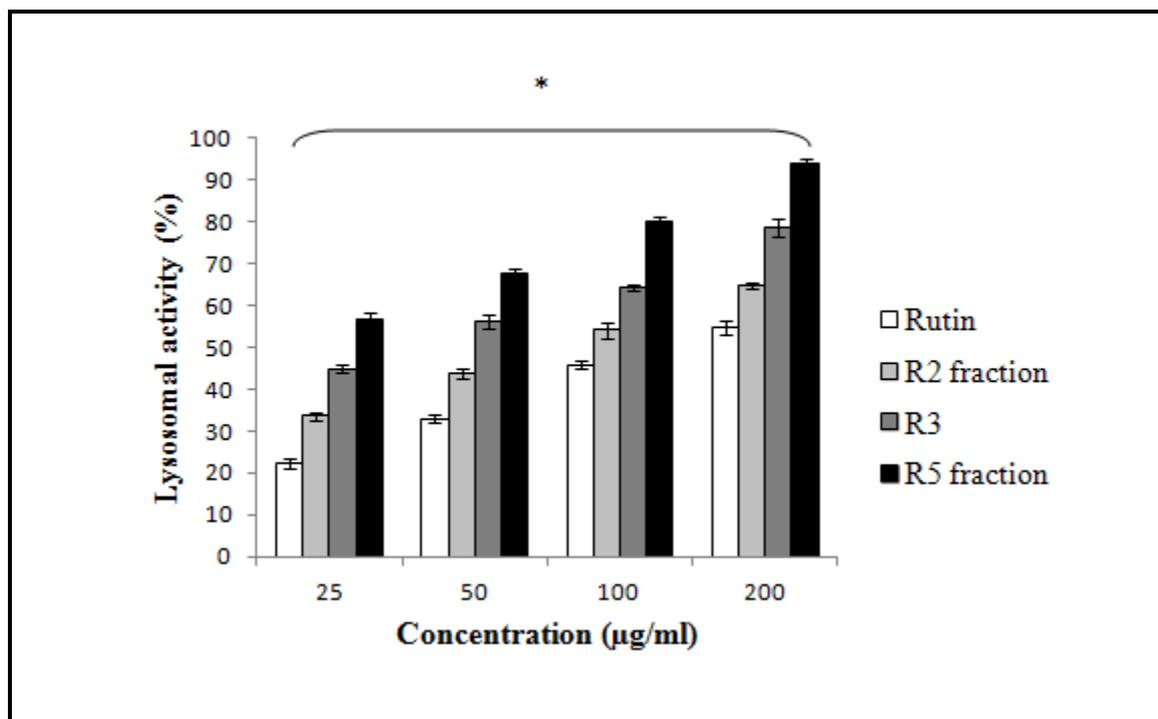


Figure 2. Stimulation of mouse peritoneal macrophages lysosomal enzyme activity by rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5). Macrophages ($6 \cdot 10^6$ cells/well) were incubated in microtiter plates in RPMI 1640 medium in the presence of increasing concentrations of rutin and oligorutin fractions for 24h. Controls included cells incubated with RPMI 1640 medium only. Data plotted represent the mean (\pm SD) percentage of lysosomal enzyme activity of three independent experiments. Each value represents the mean (\pm SD) of triplicates samples compared to the control. * $p < 0.05$ using a student's *t*-test.

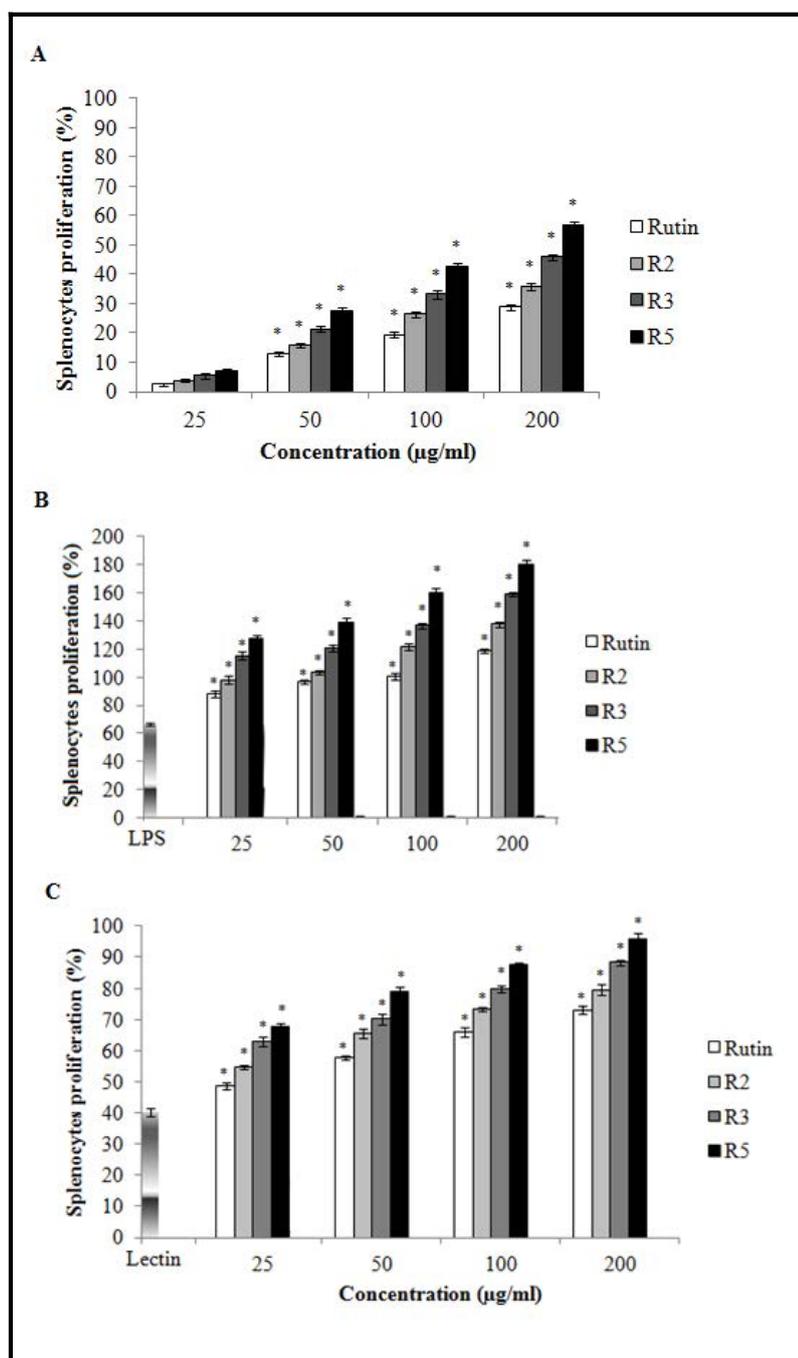


Figure 3. *In vitro* effects of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) on proliferation response of splenocytes : (A) cells incubated with increasing concentrations of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) without mitogens for 24h, (B) cells incubated with lipopolysaccharide (5µg LPS/ml) in the absence and presence of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) for 24h, and (C) cells treated with lectin (5 µg/ml) in the absence and the presence of rutin and oligorutin fractions (R2, R3 and R5) for 24 h. Controls for the LPS or lectin only groups were cells incubated in RPMI 1640 medium only; controls for the tested flavonoids were the LPS or lectin groups. Cell proliferation was assessed by MTT test. Data plotted represent the mean (\pm SD) percentage of proliferation. * $p < 0.05$: percentages of proliferation that is significantly different compared with mitogen (LPC or lectin) only treated using a student's *t*-test.



**AUTORISATION DE SOUTENANCE
DU DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur SLIMANE Naceur, Professeur, Faculté de Médecine de Monastir (Tunisie),
Madame HUSSON Florence, Maître de Conférences, Université de Bourgogne.**

Le Président de l'Université de Lorraine, autorise :

Mademoiselle BEN RHOUMA Ghada

à soutenir devant un jury de l'UNIVERSITE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Oligomérisation enzymatique de flavonoïdes et évaluation des activités biologiques de oligomères synthétisés"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : **"Procédés Biotechnologiques et Alimentaires"**

Fait à Vandoeuvre, le **21 Janvier 2013**

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pierre MUTZENHARDT

Pour le Président et par délégation,
La Vice-Présidente du CS



Clotilde BOULANGER

Titre de thèse : Oligomérisation enzymatique de flavonoïdes et évaluation des activités biologiques des oligomères synthétisés

Résumé : L'oligomérisation enzymatique de la rutine et esculine a donné lieu à cinq fractions d'oligomères de masse moléculaire moyenne entre 2127,42 et 8331,85 g/mol pour la rutine et 688,12 et 6973 g/mol pour l'esculine. L'analyse de ces fractions par FTIR montre que les fractions d'oligorutines sont obtenues à travers des liaisons C-C, C-O et C=O. Les fractions d'oligoesculines sont obtenues à travers des liaisons C-C.

Une meilleure solubilité des oligorutines et des oligoesculines dans l'eau et une plus faible solubilité de ces oligomères dans l'éthanol comparé à leurs monomères a été mis en évidence.

Une diminution de l'activité antiradicalaire vis-à-vis de DPPH[•], ABTS^{•+} et OH[•] proportionnelle à la masse moléculaire moyenne des fractions d'oligorutines a été observé, contrairement aux fractions d'oligoesculines qui montrent un important pouvoir chélateur de ces mêmes radicaux comparé à leurs monomère.

Une augmentation du pouvoir chélateur de fer, inhibiteur de la xanthine oxydase, réducteur du cuivre (CUPRAC), de l'activité antigénotoxique, ainsi que de l'activité stimulatrice de la prolifération des splénocytes, et des lymphocytes (B et T) proportionnelle au degré d'oligomérisation des oligomères étudiées a été noté.

L'effet des fractions d'oligorutines et oligoesculines étudiées sur les macrophages en suivant la production de monoxyde d'azote (NO) montre un pouvoir anti-inflammatoire comparé à leurs monomères. L'étude de l'activité lysosomale induite par les fractions d'oligorutine révèle un pouvoir immunostimulateur proportionnelle à la masse moléculaire moyenne des oligorutines, et inversement proportionnelle à celle-ci pour les oligoesculines.

Mots clés : Rutine, esculine, oligomérisation, activités antioxydante et antiradicalaire, activité chélatrice de fer, activités immunomodulatrice, cytotoxicité, activités génotoxique et antigénotoxique, solubilité.

Title: Enzymatic oligomerization of flavonoids and evaluation of the biological activities of synthesized oligomers.

Abstract: Rutin and esculin have been polymerized by laccase. Five fractions with \overline{M}_w between 2127.42 and 8331.85 g/mol for oligorutins, and between 688.12 and 6973 g/mol for oligoesculins, were obtained. Fourier transformed infrared analysis showed that oligorutins were formed through C-C, C-O and C=O linkages, while oligoesculins were obtained through C-C linkages.

Oligorutins and oligoesculins show a higher solubility in water and a lower solubility in ethanol compared to their monomers.

The oligomerization of rutin decrease its antiradical capacity, while oligoesculin fractions demonstrated a high antiradical activity compared to monomeric esculin.

Oligomer fractions showed a better iron chelating power, xanthine oxidase inhibition, copper reducing power (CUPRAC), antigenotoxic activity, and splenocytes stimulator activity compared to their monomers.

Oligorutin and oligoesculin exhibited an important anti-inflammatory capacity through the nitric oxide inhibition.

Moreover, oligorutin fractions demonstrated an immunostimulatory effect proportional to their degree of oligomerization, while oligoesculin fractions showed an immunostimulatory effect inversely proportional to their degree of oligomerization.

Key Words: Rutin, esculin, Oligomerization, antiradical and antioxidant activities, Iron chelating power, cytotoxic power, genotoxic and antigenotoxic activities, immunomodulatory activities, solubility.